

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



Klára Habartová

Biologické účinky nanočástic stříbra

Bakalářská práce

Studijní obor: Bioorganická chemie B1407

Vedoucí práce: Ing. Adéla Galandáková, Ph.D.

Olomouc 2013

Prohlášení:

Já Klára Habartová, prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod odborným dohledem Ing. Adély Galandákové, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstaná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 7. 5. 2013

.....

Podpis

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce Ing. Adéle Galandákové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, cenné rady a trpělivost při zpracování bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Ústavu lékařské chemie a biochemie za vytvoření příjemného pracovního prostředí. RNDr. Radku Novotnému, Ph.D. z Laboratoře mikroskopických metod LF UP, děkuji za charakterizaci nanočástic metalického a iontového stříbra. Ing. Ivu Überalloví, Ph.D. z Ústavu klinické a molekulární patologie děkuji za pomoc při práci s fluorescenčním mikroskopem. Děkuji i MUDr. Bohumilu Zálešákovi z Oddělení plastické a estetické chirurgie za odběry biologického materiálu pro izolaci lidských kožních fibroblastů.

Práce byla vypracována v rámci řešení projektu Ministerstva průmyslu a obchodu FR -TI2/208.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Klára Habartová
Název práce:	Biologické účinky nanočástic stříbra
Typ práce:	Bakalářská práce
Pracoviště:	Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	Ing. Adéla Galandáková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2013

Abstrakt:

Nanočástice stříbra jsou fenoménem posledních několika let. Využívají se k impregnaci oblečení, jako katalyzátory nebo na čištění vody. Nedávno se díky svým unikátním antibakteriálním vlastnostem začaly využívat v medicíně. Zvýšený zájem o nanočástice a jejich použití všude kolem nás vedl k obavám o jejich účinky na buňky lidského těla. Úkolem této bakalářské práce bylo zhodnotit cytotoxicitu a genotoxicitu vzorků nanočástic metalického a iontového stříbra a jejich vliv na markery zánětu.

Výsledky práce prokázaly, že nanočástice iontového stříbra vykazují srovnatelnou toxicitu při 10× nižší koncentraci než nanočástice metalického stříbra. Genotoxicita nanočástic metalického a iontového stříbra nebyla v testovaných koncentracích prokázána. Z hlediska zapojení částic do zánětlivého procesu bylo prokázáno, že obě formy nanočástic stříbra snižují bazální hladinu interleukinu 6 v primární kultuře lidských kožních fibroblastů.

Klíčová slova:	nanočástice, stříbro, cytotoxicita, genotoxicita, markery zánětu
Počet stran:	51
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Klára Habartová
Title: Biological effect of silver nanoparticles
Type of thesis: Bachelor
Department: Department of Medical Chemistry
and Biochemistry, Faculty of Medicine
and Dentistry Palacky University,
Czech Republic
Supervisor: Ing. Adéla Galandáková, Ph.D.
The year of presentation: 2013

Abstract:

Silver nanoparticles became a phenomenon of last several years. They are used for impregnation of textile fibres, as a catalyst or in water purification proces. Due to their unique antibacterial properties they have been used in medicine as an antibacterial agent. Popularity of nanoparticles and their presence everywhere leads to a concern about its effect on human body cells. This thesis is focused on toxicity of metallic and ion silver nanoparticles and their ability to DNA damage.

Results of this thesis demonstrate, that cytotoxicity of ion silver nanoparticles is 10 times higher than metallic silver nanoparticles. Genotoxicity of ion and metallic silver nanoparticles wasn't prove in tested concentrations. As to the effect of silver nanoparticles on inflammation, our tests prove that silver nanoparticles reduce basal level of IL-6 in primary cultures of human dermal fibroblasts.

Keywords: nanoparticles, silver, cytotoxicity,
genotoxicity, inflammation
Number of pages: 51
Language: Czech

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Cíle práce.....	8
3. Teoretická část.....	9
3.1. Historie používání stříbra.....	9
3.2. Nanočástice a jejich odlišnosti od klasických chemických látek.....	14
3.3. Příprava nanočástic stříbra.....	16
3.4. Absorpce, distribuce a metabolismus nanočástic stříbra.....	17
3.4.1. Gastrointestinální absorpce.....	18
3.4.2. Absorpce vdechováním.....	19
3.4.3. Absorpce kůží.....	20
3.4.4. Další způsoby absorpce.....	20
3.4.5. Metabolismus.....	20
3.5. Antibakteriální vlastnosti.....	21
3.5.1. Rezistence bakterií.....	21
3.5.2. Mechanismus účinku nanočástic stříbra.....	21
3.6. Využití nanočástic stříbra.....	22
3.7. Toxické účinky nanočástic stříbra.....	24
3.7.1. Oxidativní stres.....	24
3.7.2. Genotoxicita nanočástic stříbra.....	25
3.7.3. Zánět a nanočástice stříbra.....	26
3.8. Onemocnění spojené s nanočásticemi stříbra.....	27
3.8.1. Argýrie.....	27
3.8.2. Argyrosis conjunctivae.....	27
4. Experimentální část.....	29
4.1. Buněčný model.....	29
4.2. Chemikálie, roztoky, přístroje a materiál.....	29
4.2.1. Testovaný materiál.....	29
4.2.2. Chemikálie.....	29
4.2.3. Roztoky.....	30
4.2.4. Přístroje.....	31
4.2.5. Spotřební materiál.....	31
4.3. Metody.....	31
4.3.1. Izolace a kultivace buněk.....	31
4.3.2. Pasážování buněk.....	32
4.3.3. Stanovení toxicity (MTT test).....	32
4.3.4. Stanovení poškození DNA (Comet assay).....	33
Vyhodnocení.....	34
4.3.5. Stanovení koncentrace IL-6.....	35
5. Výsledky.....	36
5.1. Stanovení toxicity nanočástic stříbra.....	36
5.2. Stanovení poškození DNA.....	38
5.3. Vliv nanočástic stříbra na hladinu IL-6.....	41
6. Diskuze.....	43
7. Závěr.....	47
8. Použitá literatura.....	48
9. Seznam zkratk.....	51

1. Úvod

Stříbrné ionty a sloučeniny se k léčbě používají již od nepaměti. Už na konci 19. století byly poprvé popsány jejich antibakteriální vlastnosti a začaly se hojně využívat při léčbě ran a popálenin nebo pro hygienické účely. Po objevu antibiotik však zájem o stříbro opadl.

V posledních letech došlo k rozvoji studia nanomateriálů a u nanočástic stříbra byly objeveny silné antibakteriální vlastnosti. Díky tomu se tyto nanočástice rychle staly fenoménem a začaly se používat ve všech možných průmyslových odvětvích, např. při výrobě moderních obvazových materiálů na léčbu popálenin, ve vodních filtrech, osvěžovačích vzduchu nebo v různých doplňcích stravy.

Mezi problémy spojené s používáním nanočástic stříbra patří jejich vysoká toxicita a ne zcela dobře popsáný mechanismus účinku, protože jen málo studií bylo provedeno na celých organismech. Další komplikací je, že studie zabývající se cytotoxicitou a genotoxicitou nanočástic stříbra nemají jednotné výsledky. Jejich toxicita se totiž liší podle velikosti nanočástic stříbra, způsobu výroby a řady dalších faktorů.

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium toxicity nanočástic stříbra a jejich vliv na poškození molekul DNA ve formě jednovláknových zlomů. Byl také sledován jejich vliv na hladinu markerů zánětu v lidských kožních fibroblastech.

2. Cíle práce

Záměrem předkládané bakalářské práce bylo porovnat biologické účinky nanočástic metalického a iontového stříbra, o jejichž bezpečnosti a možných nežádoucích účincích se v současné době vedou stálé diskuze.

Konkrétní cíle byly:

- a) studium toxicity nanočástic metalického a iontového stříbra
- b) studium genotoxicity nanočástic metalického a iontového stříbra
- c) vliv nanočástic metalického a iontového stříbra na hladinu IL-6

Všechny experimenty byly provedeny na primárních kulturách lidských kožních fibroblastů.

3. Teoretická část

3.1. Historie používání stříbra

K prvnímu zaznamenanému použití sloučenin stříbra pro lékařské účely došlo v 8. století. Kolem roku 980 se sloučeniny stříbra používaly k čištění krve, palpitaci srdce nebo jako prevence proti špatnému dechu. Nejčastěji byl používán dusičnan stříbrný, který měl v každé zemi svůj vlastní název. V anglických zemích to byl lunar caustic, ve Francii pierre infernale a u německy hovořících Höllenstein.[1 – 4]

Ve středověku byl dusičnan stříbrný používán v tuhé formě, která se připravovala smícháním dusičnanu stříbrného s kyselinou chlorovodíkovou a chloridem sodným nebo dusičnanem draselným.[1] Vzniklá bílá krystalická látka se tvarovala do malých kuželů (obsah dusičnanu stříbrného 94,5 %), které se vsazovaly do kovových násadek. Výsledný vzhled připomínal tužku. Aplikace na rány probíhala povrchově po ponoření do vody a byla spojena s velkou bolestí pro pacienta.

Příprava tzv. lassis infernalis, jak se později dusičnan stříbrný nazýval, se v průběhu desetiletí v podstatě nezměnila. Čistý dusičnan stříbrný se rozpustil v ledku a odpařil do sucha nad malým plamenem. Podle publikace „The Surgions mate“ Johna Woodalla (1617) měl být takto připravený lassis infernalis součástí výbavy každého lékaře.

Ve druhé polovině 18. století skotský chirurg John Hunter aplikoval dusičnan stříbrný při léčbě primárních syfilitických vředů. V této době se zkoušel používat i na popáleniny, záněty, píštěle, vředy způsobené tuberkulózou nebo abscesy. U posledního zmíněného postižení bývala bohužel léčba neúspěšná a hnisání pokračovalo i po drenáži.

Do 19. století byl dusičnan stříbrný dobře znám díky svým vlastnostem, ale vždy byl používán spíše jako alternativa k již existujícím léčebným postupům. Hojně používat se začal až na přelomu 18. a 19. století při léčbě popálenin. Před objevem metody kožních štěpů byl velký problém s léčbou hlubokých a rozsáhlých popálenin, kde na povrchu nezůstala vrstva zdravého epitelu. A právě tady našel své využití dusičnan stříbrný, který odstraňoval granulační tkáň a urychloval tvorbu strupu. Slabý roztok dusičnanu stříbrného (65 mg : 28 g vody) byl používán na čerstvé popáleniny

3. stupně, které byly pokryty velkými puchýři a zánětem dosahujícím až do dermis. Popáleniny byly očištěny vodou, usušeny a potom potírány tužkou z dusičnanu stříbrného, dokud nedošlo ke vzniku bílého zbarvení. Dusičnan stříbrný byl aplikován znovu po odloupení strupu a znovu před vznikem nové kůže.

Od roku 1870 bylo využíváno roztoku dusičnanu stříbrného jehož koncentrace byla přizpůsobována rozsahu popálenin a věku pacienta. Popáleniny byly nejprve omyty roztokem dusičnanu stříbrného a poté byly pokryty bavlnou.[1] V roce 1874 byly poprvé popsány antibakteriální vlastnosti dusičnanu stříbrného. Bylo zjištěno, že i hodně zředěné roztoky mají účinek na bakterii *Staphylococcus aureus*. [2, 5]

Od roku 1880 Credé začal používat 2% roztok dusičnanu stříbrného při léčbě zánětů spojivek u novorozenců způsobených bakteriemi z rodu *Gonococci*. Léčba se rozšířila po celém Německu a snížila počet infikovaných dětí z 13,6 % na 0,5 %. Roku 1895 navštívil Credé nemocnici Johna Hopkinse v Baltimoru, kde viděl doktora Halsteda používat stříbrné fólie k léčbě ran. Po návratu do vlasti nemohl najít žádné Halstedovy publikace týkající se využití stříbra při léčbě ran a začal svůj vlastní výzkum s Beyerem.[1, 2]

Halsted však publikoval svou práci o léčbě kýly ve stejný rok, ve kterém ho Credé navštívil. Po operaci byly k šití používány stříbrné dráty a rána byla pokryta stříbrnou fólií. U všech pacientů bylo pozorováno hojení incizí bez komplikací. Halsted také popsal účinek stříbra na zastavení růstu bakterie *Staphylococcus aureus*.

Credé a Beyer mezitím pozorovali účinky kovového stříbra na růst stafylokoků a streptokoků za laboratorních podmínek. Zjistili, že po 24 hodinách nebyly na miskách se stříbrem žádné mikroby. Dospěli k předpokladu, že stříbro reaguje s metabolickými produkty bakterií a vznikají sloučeniny s protizánětlivým efektem. Po nasazení stříbra také docházelo ke snížení koncentrace kyseliny mléčné v ranách, proto se domnívali, že stříbro reaguje s kyselinou mléčnou.

Dále se předpokládalo, že k růstu bakterií byla potřeba kyselina mléčná, takže prvním krokem v procesu hubení bakterií byla tvorba stříbrné soli. Mezi takto účinné soli se řadily látky jako např. laktát, citrát a dusičnan stříbrný. Pozorovali, že sůl laktátu (popřípadě citrátu) a stříbra ve vodném roztoku zabíjela stafylokoky i streptokoky po 10 minutách a při koncentraci 1 : 80000 zamezovala růstu již zmíněných bakterií.

Nakonec byly formulovány 2 druhy solí *Argentum lacticum* a *Argentum citricum*.

Credé vytvořil i vlastní druhy obvazů tzv. „white silver dressing“ a „grey silver dressing“. Jako „white silver dressing“ byl nazýván široký pás bavlny, na kterém byla připevněna stříbrná fólie. „Grey silver dressing“ byla označována sterilizovaná bavlna impregnovaná stříbrným práškem. Výhodou těchto nových obvazů bylo, že se na rány nepřilepovaly a absorbovaly vlhkost z rány.

V roce 1916 prezentoval Wilms na konferenci Německých vojenských chirurgů svůj názor na léčbu popálenin. Podle něj se měly čerstvé rány po operaci nebo zanícené rány oplachovat 1% roztokem dusičnanu stříbrného, čímž by se zabránilo růstu bakterií. Bohužel se mu nedostalo většího ohlasu a ve 20. století došlo k ústupu používání stříbrných solí k léčbě popálenin.

Stříbrné fólie mající analgetické účinky a dobrý kosmetický efekt však zájem lékařů neztratily a v roce 1919 Lochtius doporučoval jejich používání pro léčbu vyčištěných popálenin 3. stupně a 2. stupně po odstranění puchýřů až do zahojení. Nedochovaly se ovšem žádné zmínky o tom, jak stříbrné fólie byly drženy na jednom místě.

Později začal Davidson léčit popáleniny pomocí kyseliny gallové. I na čerstvé popáleniny aplikoval sterilní gázu a obvazy namočené v 2,5% roztoku kyseliny gallové. Poté co rány dostaly světle hnědou barvu byly obvazy odstraněny a bylo pracováno s otevřenou ranou. I přes své nevýhody (strup se vytvářel pomalu) se léčba rozšířila celosvětově.

Shillitio navštívil roku 1928 přednášku o léčbě ekzému pomocí UV lampy a stříbra a došel k závěru, že podobná procedúra by mohla být použita i při léčbě popálenin jako protiklad k léčbě pomocí kyseliny gallové. Za použití spreje aplikoval 1 – 5% roztok dusičnanu stříbrného na ránu, kterou potom osvětlil 1 – 5 min wolframovou obloukovou lampou. Vzdálenost pacienta od lampy byla 6 – 20 palců a závisela na kvalitě lampy, věku pacienta a rozsahu popáleniny. Shillitio došel k předpokladu, že dusičnan stříbrný je světlem ionizován a potom může reagovat s buněčnými proteiny. Léčba pomocí dusičnanu a světla byla srovnatelná s léčbou pomocí kyseliny gallové a měla i jisté výhody např. lepší úleva od bolesti, protože UV světlo mělo analgetický účinek na nervy v ráně.[1]

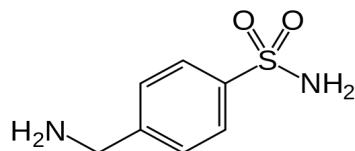
Roku 1920 přijalo FDA (US Food and Drug Administration) koloidní stříbro jako oficiální lék na popáleniny.[5] Ve 30. letech 19. století Bettman modifikoval léčbu kyselinou gallovou přidávkem dusičnanu stříbrného. Nejprve byl houbou nanesen 10% roztok dusičnanu stříbrného a potom 5% roztok kyseliny gallové, čímž došlo k významnému urychlení léčebného procesu.

Později začal Kissmayer používat na malé popáleniny mast z dusičnanu stříbrného, destilované vody, olivového oleje a lanolin. Tuto mast doporučoval aplikovat denně.

V průběhu 2. světové války doporučovaly ozbrojené síly Spojených států amerických pro léčbu popálenin 2. a 3. stupně 10% roztok dusičnanu stříbrného a kyseliny gallové. Po ukončení války a objevu antibiotik však zájem o stříbro při léčbě popálenin rychle opadl.[4, 5]

Nový zájem o stříbrné soli přišel se vzrůstající rezistencí bakterií a potřebou najít další látku s protizánětlivými účinky. Bylo testováno několik koncentrací dusičnanu stříbrného, přičemž jako nejnižší koncentrace účinná proti bakteriím, která zároveň neměla toxický efekt na zdravé buňky, byla stanovena na 0,5%. Výhodou používání dusičnanu stříbrného bylo, že nevedlo ke zvyšování rezistence bakterií. Naproti tomu nevýhodou léčby pomocí dusičnanu stříbrného bylo, že všechny objekty, které s ním přišly do styku po vystavení světlu černaly. Mezi další nevýhody také patřilo hromadění stříbra v ledvinách, játrech a svalech.

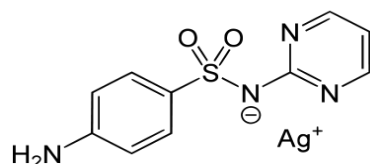
Ve stejné době se v Německu začal používat na léčbu povrchových zranění a popálenin 10% roztok sulfamylonu (obr. 1). Později se začal používat v kombinaci s 0,5% roztokem dusičnanu stříbrného.



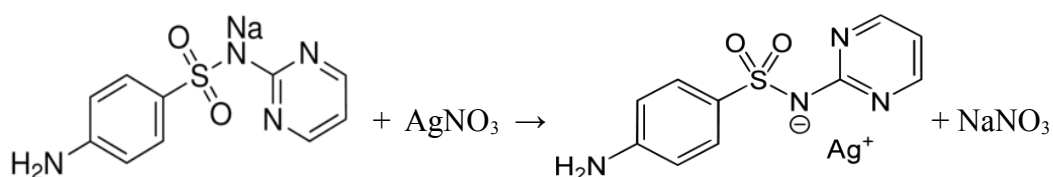
Obr. 1: Strukturální vzorec Sulfamylonu

Krátce na to představil Fox sulfadiazin stříbrný (obr. 2), který se začal prodávat pod komerčními názvy Flamazin a Silvaden. Sulfadiazin stříbrný vzniká smícháním dusičnanu stříbrného a sulfadiazinu sodného, kdy dochází v molekule sulfadiazinu

k substituci sodíkového atomu atomem stříbra (obr. 3). Používal se ve formě masti, později 1% krému. Účinnost sulfadiazinu stříbrného závisela na pomalé reakci se sérem a ostatními tělními tekutinami obsahujícími NaCl. Díky tomu docházelo k pomalému průběžnému uvolňování stříbrných iontů do rány. Na množství vyloučených stříbrných iontů a antimikrobiální aktivitu měl také vliv druh masti.



Obr. 2: Strukturální vzorec sulfadiazinu stříbrného



Obr. 3: Rovnice vzniku sulfadiazinu stříbrného

Jedna z mála komplikací, která se během léčby sulfadiazinem stříbrným objevila byla leukopenie (zvýšení koncentrace leukocytů v krvi nad 10 000). Projevila se kolem třetího dne léčby a následně samovolně vymizela. Aplikace na popáleniny se prováděla 1× až 3× za 48 hodin (záleželo na tom, jestli byla rána překryta nebo ne) a byla pro pacienty nebolestivá. Rány se nechávaly buď volné nebo bývaly překryty jemnou gázou.

Při používání sulfadiazinu stříbrného docházelo méně často k sepsi a frekvence pozitivních výsledků kultivací na bakterie z rodu *Pseudomonas* a ostatní gramnegativní bakterie se snížila. Nevýhodou použití sulfadiazinu stříbrného bylo zpomalení hojení rány a vytváření strupu. Byl také neúčinný na gramnegativní bakterie u pacientů, kteří měli popáleniny na více než 50 % těla. Proto byla představena nová léčba pomocí sulfadiazinu stříbrného a dusičnanu ceritého ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$). Výsledky byly ale méně uspokojivé, než při použití samotného sulfadiazinu stříbrného.

Po několika letech se začala objevovat rezistence bakterií na sulfadiazin stříbrný. Problém byl vyřešen objevem nových aktivních látek např. FPQC (1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7(1-piperaziny) chinolinkarboxylová kyselina) nebo používáním sulfadiazinu stříbrného v kombinaci s dalšími látkami s antibakteriálním účinkem.

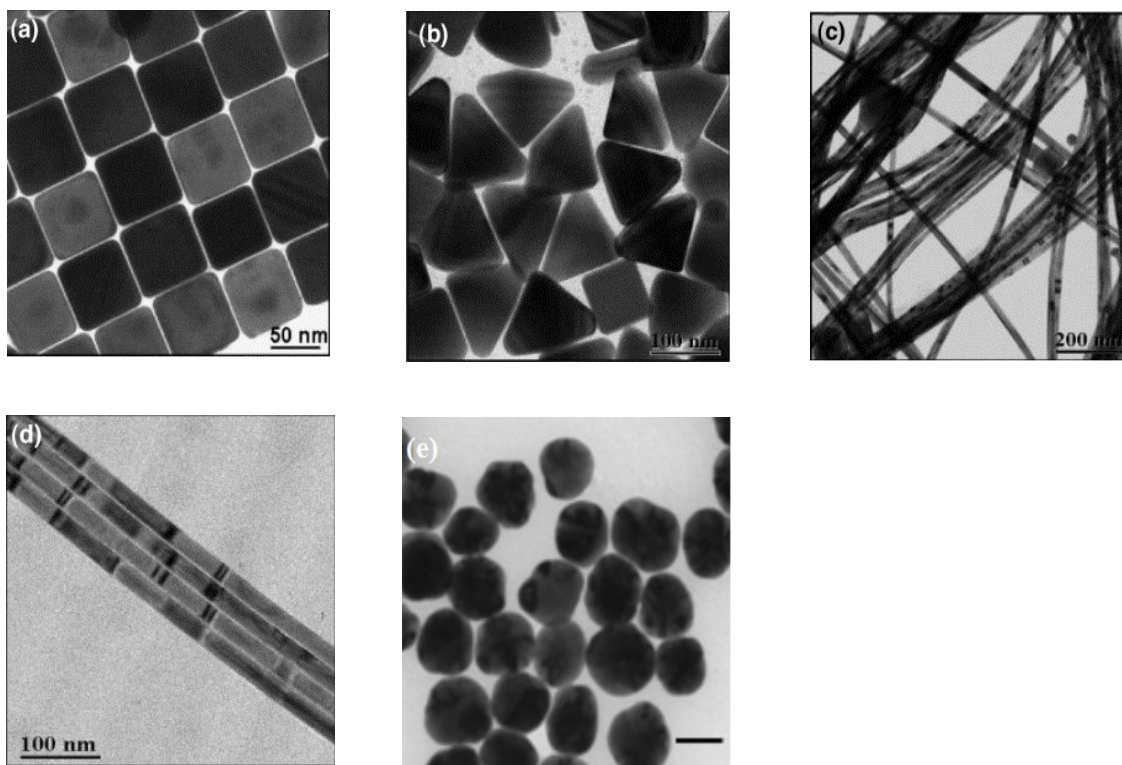
Kvůli časté výměně obvazů byla snaha o vytvoření nových syntetických obvazů např. ze směsi polyethylenglykolu 400, poly-2-hydroxyethyl metakrylátu a sulfadiazinu stříbrného, které měly dobré antibakteriální účinky.[6]

Před objevem antibiotik bylo stříbro přidáváno do kapek do nosu (1% Argyrol), kterých se využívalo při zánětu dutin a nachlazení. Používalo se také při léčbě pohlavních chorob (např. kapavka nebo syfilis).[2, 3]

S rozvojem nanotechnologie se v posledních letech začaly pro podobné účely využívat nanočástice stříbra.

3.2. Nanočástice a jejich odlišnosti od klasických chemických látek

Nanomateriál je materiálem, který má nejméně jeden rozměr mezi 1 až 100 nm. Přeměna látek z mikro nebo makro forem na částice o velikosti nano vede ke změnám fyzikálně – chemických vlastností (optických, mechanických, magnetických). Dochází také ke změně toxicity a toxikologického profilu látek. S klesající velikostí nanočástic roste jejich plocha a zvyšuje se volná Gibbsova energie, která odráží reaktivitu nanočástic. Reaktivita závisí na počtu atomů na povrchu nanočástic, na povrchovém náboji, tvaru (obr. 4), chemickém složení a na porositě nanočástic. Vlastnosti nanočástic nezávisí pouze na velikosti, ale souvisí také s metodou přípravy. Nanočástice mohou na svém povrchu obsahovat zbytky látek, které nezreagovaly během syntézy nebo zbytky stabilizátorů a disperzních činidel.[7]



Obr. 4: Tvary nanočástic stříbra – a) čtverce; b) trojúhelníky; c) nitky; d) vyrovnané nitky; e) kruhy [8, 9]

Nanočástice můžeme rozdělit podle způsobu vzniku na:

- a) Primární – jedná se o cíleně syntetizované nanočástice. Všechny mají stejnou velikost a tvar a biologicky specifické vlastnosti.
- b) Sekundární – jde o nechtěné produkty při spalovacích fyzikálních nebo chemických procesech. Jsou přítomny např. v tabákovém kouři nebo ve spalinách z dieslových motorů.

V prostředí může docházet k transformaci primárních i sekundárních nanočástic na jiné formy, čímž dochází ke změně jejich distribuce a toxicity. Například může docházet ke vzniku aglomerátů (částice jsou mezi sebou slabě vázané pomocí van der Waalsových sil) nebo agregátů (mezi částicemi vzniká kovová nebo kovalentní vazba). Takto mohou nanočástice dosahovat větších rozměrů, které mají jiné povrchové vlastnosti. Tyto změny mohou mít za následek i nové vlastnosti z hlediska toxicity, ale souvisí také s jejich transportem a osudem v životním prostředí a v lidském těle.[7]

3.3. Příprava nanočástic stříbra

Nanočástice kovů se nejčastěji připravují pomocí metod dispergačních a kondenzačních. Dispergační metody jsou založené na dispergaci makroskopického materiálu na částice koloidních nebo nano rozměrů. K dispergaci nedochází samovolně, ale musíme vynaložit určitou práci. Při použití fyzikálních postupů se jedná o mechanickou práci (např. ultrazvuk, mlýny). Nejnovější metodou přípravy je laserová ablace, při které působíme na látku vysoce fokusovaným paprskem elektromagnetického záření.

Při použití kondenzačních metod se dají snadno připravit vysoce dispergované a poměrně monodisperzní koloidní soustavy. Kondenzace můžeme dosáhnout chemickými reakcemi nebo fyzikálními metodami (např. ochlazování par kovů, změna rozpustnosti látky). Mezi nejpoužívanější chemické postupy patří redukce rozpustné sloučeniny kovu, při které vznikají zárodky nové pevné fáze. Po dosažení kritické velikosti vznikají ze zárodků stabilní nanočástice. Pro přípravu nanočástic stříbra se v současné době používají převážně kondenzační redukční metody (např. borhydridová metoda, citrátová metoda).[10, 11]

Borhydridová metoda navržená Creightonem, Blatchfordem a Albrechtem

Nanočástice stříbra se připravují redukcí roztoku dusičnanu stříbrného silným redukčním činidlem borohydrátem sodným (NaBH_4). Vznikají malé (5 – 20 nm) až několik měsíců stabilní nanočástice stříbra. Tyto nanočástice nejsou vhodné pro použití v medicíně, protože na jejich povrchu dochází k adsorpci borátového aniontu, který způsobuje denaturaci cytochromu P450.

Citrátová metoda navržená Lee, Meiselem

Při přípravě nanočástic stříbra je jako redukční činidlo použit citrátový aniont, který je mnohem mírnější než NaBH_4 . Výhodou citrátového aniontu je, že stabilizuje vznikající nanočástice stříbra, jejichž velikost se pohybuje mezi 30 – 120 nm.

Tollensova metoda

Tato metoda vychází z Tollensova postupu přípravy stříbrného zrcátka, který se používá jako důkaz aldehydické vazby u cukrů. Amoniakální komplexní kationt ($[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]$) je zde redukován redukujícími cukry (maltosa, laktosa). Díky vazbě

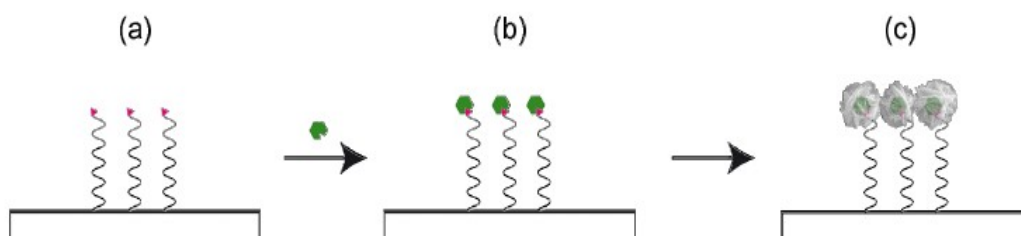
Ag^+ v komplexu můžeme připravit nanočástice v jediném kroku a zároveň změnou koncentrace ligandu ovlivňovat jejich velikost. Vznikající nanočástice mají velikost v rozmezí 25 – 400 nm.[10]

Hydroxylamin – hydrochloridová metoda

Stříbrné nanočástice o velikosti 23 – 67 nm, můžeme připravit pomocí redukce dusičnanu stříbrného hydroxylamin-hydrochloridem v zásaditém prostředí za laboratorní teploty. Tyto nanočástice jsou velmi stabilní a vysoce aktivní při použití v SERS (povrchově zesílený ramanův rozptyl).[12]

Enzymatická metoda

Jednou z nejnovějších metod přípravy nanočástic stříbra je indukce pomocí enzymu. Nejprve je modifikovaná jednovláknová DNA navázána na substrát. Potom je na vlákno DNA navázána křenová peroxidáza a dochází k aktivaci enzymatické reakce vedoucí ke vzniku nanočástic. Během reakce se z peroxidu vodíku odštěpuje kyslík, naváže se na hem křenové peroxidasy a dochází ke změně oxidačního stavu železa. Následně se uvolňují elektrony, které redukují stříbro. Celý proces je schématicky zobrazen na obr. 5.[13]



Obr. 5: Schéma přípravy nanočástic stříbra enzymatickou metodou – a) imobilizovaný substrát, na němž je navázána jednovláknová DNA; b) navázání křenové peroxidázy na DNA; c) enzymem indukovaný růst nanočástic stříbra [13]

3.4. Absorpce, distribuce a metabolismus nanočástic stříbra

Stříbro a ostatní kovy se do těla dostávají nejčastěji vdechováním, přijímáním potravy nebo kůží. Sříbro, které se dostane do těla se váže na vazebná místa transportních proteinů (albuminy, globuliny). Pokud dojde k selhání ochranných mechanismů, může nastat toxická reakce.

Bylo prokázáno, že stříbro se nejvíce ukládá v játrech (16,75 mg/g) a ledvinách (8 mg/g), dále také v mozku, plicích nebo slezině (méně než 5 mg/g). Nebyly však nalezeny žádné důkazy o toxicitě uloženého stříbra na dané orgány.[2, 14]

3.4.1. Gastrointestinální absorpce

Gastrointestinální a bukalní absorpce je ovlivňována ionizací stříbra a dostupností volného Ag^+ ve zdroji, který může interagovat s proteinovými receptory na buněčných membránách.

Nejčastěji je způsobena:

- a) kontaminovaným jídlem
- b) vodou čištěnou stříbrno – měděnými filtry
- c) užíváním doplňků stravy, které obsahují koloidní stříbro
- d) užíváním dusičnanu stříbrného a koloidního stříbra při infekcích
- e) chronickým vystavením prachu a aerosolům obsahujícím částice stříbra v práci
- f) amalgámovými zubními plombami
- g) protikuřáckou terapií pomocí octanu stříbrného
- h) náhodným užitím sloučenin obsahujících stříbro

Absorpce biologicky aktivního Ag^+ je značně snížena jeho ochotou vázat se na organické (např. vláknina) a anorganické (např. Cl^-) složky potravy.[2] Největším absorpčním povrchem trávicího traktu, kudy mohou nanočástice dále prostupovat do těla je střevní stěna. Transport nanočástic do krevního oběhu probíhá přes M – buňky Peyerových plátů (útvary obsahující nahromadění lymfatické tkáně ve sliznici střeva). M – buňky mohou transportovat široké množství materiálů včetně nanočástic. Nanočástice menší než 1 μm jsou M – buňkami fagocytovány a následně přeneseny do bazálního regionu. Částice větší než 5 μm jsou však zachyceny v Peyerových plátech.

Při průchodu zažívacím traktem nanočástice interagují s trávicími enzymy a dochází ke změně jejich fyzikálně – chemických vlastností, včetně všech specifických vlastností nanomateriálů.[7]

Většina volně dostupných produktů pro orální použití obsahujících stříbro byla kvůli riziku argýrie stažena z prodeje. Jednalo se o produkty (např. osvěžovače dechu, potravinové doplňky), ve kterých bylo blíže nespecifikované množství koloidního stříbra a jejich účinky nebyly podloženy žádnými studiemi.[2]

3.4.2. Absorpce vdechováním

Dýchací systém představuje pro nanočástice nejpravděpodobnější a nejsnadnější cestu do organismu. Plíce jsou totiž svou stavbou přizpůsobeny k efektivní výměně plynů mezi krví a vdechovaným vzduchem. Interakce nanočástic se sliznicí v dýchacích cestách nastává v různých částech dýchací soustavy a je závislá jak na vnějších tak vnitřních faktorech. Velikost nanočástic je rozhodujícím parametrem určujícím jejich průnik a depozici v dýchacím traktu. Podle toho, kam až jsou nanočástice schopny v dýchací soustavě proniknout rozlišujeme několik velikostí:

- a) Respirabilní – nanočástice do velikosti 5 μm . Mohou být transportovány až do plicních sklípků.
- b) Thorakální – velikost do 10 μm . Částice jsou schopné proniknout do plic.
- c) Inhalovatelné – částice s velikostí do 100 μm . Tyto nanočástice jsou schopné vstoupit do respiračního systému nosem nebo ústy.[7]

Po proniknutí nanočástic do plic jsou Ag^+ za pomoci plicních surfaktantů absorbovány alveolárním epitelem. Není ovšem jasné, jestli Ag^+ samo o sobě interaguje s fosfolipidy obsaženými v surfaktantech nebo se jedná pouze o ochranu proti absorpci velkého množství Ag^+ do krevního oběhu. Časté vdechování stříbrného prachu nebo dusičnanu stříbrného může být příčinou bronchitidy, metaplázie a pigmentace dýchacích cest připomínající antrakózu nebo siderózu.

Příjem nanočástic vdechováním je způsoben chronickým vystavením stříbrnému prachu a dusičnanu stříbrnému (např. šperkařský průmysl) nebo dlouhodobým vdechováním přípravků, které obsahují koloidní stříbro.[2]

3.4.3. Absorpce kůží

I když většina produktů obsahujících stříbro se dostává do styku s kůží, množství, které se přes ni dostane do těla je velmi malé. Pokud kůže není porušena, představuje totiž velmi účinnou bariéru proti nanočásticím. Pasivnímu transportu nanočástic přes nepoškozenou kůži je zabraňováno pomocí zrohovatělých buněk na povrchu pokožky a lipidové dvojvrstvy, kde dochází k tvorbě ireverzibilní vazby mezi volnými Ag^+ ionty a sulfanovými skupinami fosfolipidů a keratinu.[2, 7]

Předpokládalo se, že časté nošení oblečení impregnovaného nanočásticemi stříbra povede díky absorpci kůží ke zvýšenému obsahu Ag^+ v krvi a tkáních a k ukládání sraženin stříbra v kůži. Riziko vzniku argýrie je ale zanedbatelné, protože přes kůži je do těla absorbováno méně než 4% celkového obsahu stříbra.[2]

3.4.4. Další způsoby absorpce

Mezi další možnosti, jak se stříbro dostává do těla je uvolňování Ag^+ z kardiovaskulárních náhrad (např. srdeční chlopně s obsahem nanočástic stříbra) a z močových katetrů používaných např. při akutním selhání ledvin. Bylo zaznamenáno několik na sobě nezávislých případů zvýšené hladiny volného Ag^+ v krvi a tkáních, ale nedošlo k žádnému poškození.[2]

3.4.5. Metabolismus

Volné Ag^+ absorbované do těla se váží na intracelulární proteiny, jako je sérový albumin a makroglobuliny, na kterých dochází k metabolismu nebo transportu do tkání a kostí. Mnohé studie prokázaly, že Ag^+ se váže hlavně na proteiny bohaté na cystein (metalothiony). Tyto proteiny na sebe váží toxické kovové ionty, čímž chrání buňky a snižují riziko poškození tkání.

Největší rozpory jsou v určení hlavní metabolické dráhy, pomocí které dochází k metabolizaci stříbrných iontů, jejich přechodnému nebo trvalému ukládání (ledviny, játra, kosti) a vylučování (moč, žluč, vlasy, nehty,). Bylo prokázáno, že největší množství Ag^+ je z těla vylučováno žlučí.

Celkový obsah Ag^+ v těle (hladina v krvi do 100 $\mu\text{g/l}$) se dá nejlépe určit stanovením jejich koncentrace v moči. U vysokých koncentrací stříbrných iontů v krvi je však obsah iontů v moči zavádějící.

Při klinických studiích u osob chronicky vystavených stříbrným iontům byla zjištěna jejich zvýšená hladina v krvi, vlasech a moči. Bylo také prokázáno, že nedochází k absorpci Ag^+ do mozkové tkáně, ale k navázání stříbrných sraženin na lysozomy u buněk v hematoencefalické bariéře.[2]

3.5. Antibakteriální vlastnosti

Bakterie se svou rychlostí reprodukce jsou schopné rychle rozvíjet svou rezistenci vůči antibiotikům. Kvůli tomu byla potřeba úplně nového přístupu při vývoji látek s antibakteriální aktivitou. Dobrou alternativou k antibiotikům se zdají být díky svému naprosto odlišnému mechanismu účinku nanočástice.[15, 16]

3.5.1. Rezistence bakterií

Bakterie si vyvinuly několik mechanismů rezistence vůči antibiotikům:

- a) modifikace a inaktivace antibiotik
- b) modifikace metabolických drah antibiotik
- c) modifikace cílového místa
- d) snížení kumulace léčiva minimalizováním jeho přístupu do buňky

Tyto mechanismy rezistence jsou používány buď samostatně nebo v kombinaci s dalšími účinky. Např. u penicilinu je štěpen β -laktamový kruh pomocí enzymu β -laktamasa, kterou produkují bakterie, čímž dochází k jeho inaktivaci.[15]

3.5.2. Mechanismus účinku nanočástic stříbra

Mechanismus účinku se liší podle typu nanočástic. Některé závisí na jejich struktuře, jiné na uvolňování iontů z jejich povrchu. Může také docházet ke spojování několika typů mechanismů. Antibakteriální aktivitu nanočástic nejvíce ovlivňuje tvar, velikost povrchu a zeta potenciál.

Stříbro bylo pro léčebné účely používáno už v historii, proto bylo testování nanočástic stříbra na antibakteriální účinky logickým krokem. Jelikož se jedná o kov s antibakteriálními účinky, jeho nanočástice mohou spojovat několik antibakteriálních mechanismů. Nejeftivnější při inhibici růstu gramnegativních bakterií (např. rodu *Salmonella* nebo *Escherichia coli*) se ukázaly být nanočástice o velikosti 21 nm.

Asi nejdůležitějším mechanismem je interakce stříbrných nanočástic s cytoplazmatickou membránou bakterií a s intracelulárními proteiny (membránové proteiny s obsahem síry a DNA). Tím zasahují do buněčného dělení a způsobují smrt. Schopnost vstoupit do cytoplazmatické membrány a následně do buňky bakterie je typická pro malé nanočástice s průměrem do 30 nm a nanočástice s kladným zeta potenciálem. Elektrostatická interakce mezi nanočásticemi s kladným zeta potenciálem a negativně nabitým povrchem bakterie přitahuje nanočástice k bakterii a následně podporuje průnik nanočástic do membrány.

Dalším důležitým mechanismem je uvolňování stříbrných iontů z povrchu nanočástic. Při uvolňování iontů bakterie spustí obranné mechanismy, kterými se snaží chránit svou DNA před toxickým prostředím. Během tohoto stavu však dochází ke znemožnění replikace DNA.

Podle studií byla, po vystavení stříbru, jak u gramnegativních tak grampozitivních bakterií pozorována kondenzace DNA, docházelo k oddělení buněčné stěny od cytoplazmatické membrány a jejímu zničení.[15]

3.6. Využití nanočástic stříbra

V posledních letech se začaly hodně využívat nanočástice stříbra. Díky svým unikátním vlastnostem našly své uplatnění v chemické syntéze (katalyzátory) nebo elektronice. Používají se i při čištění pitné vody.[2]

Nanočástice stříbra pronikly v posledním desetiletí i do textilního průmyslu, kde se hledala netoxická látka s antibakteriálními účinky. Bylo vyvinuto několik druhů tkanin obsahujících nanočástice. Testy prokázaly, že nanočástice navázané na povrchu tkanin jsou účinnější, než ty které jsou uvnitř vláken. V dřívějších letech často docházelo k uvolnění nanočástic po několika vypráních. V dnešní době by měly být nanočástice navázané lépe.[4]

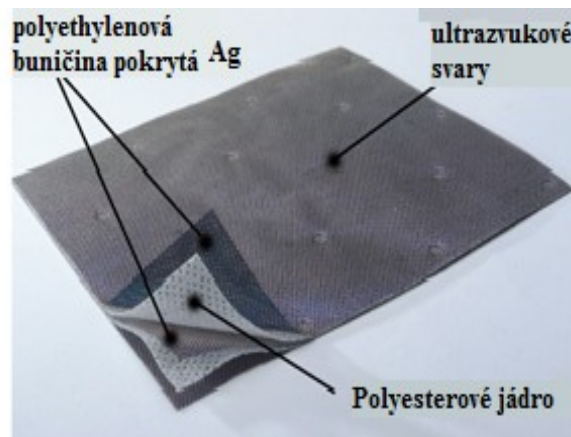
Nanočástice stříbra se dále využívají např. v modifikované Ramanově spektroskopii, která je známá jako povrchově zesílený Ramanův rozptyl (SERS). Molekuly měřené látky jsou adsorbovány na vhodné kovové nanosubstráty, díky čemuž je možné v některých případech měřit spektra v jednotkách molekul. Další výhodou této metody je, že povrch nanočástic zhasí fluorescenci, která u silně fluoreskujících látek

překrývá signál Ramanova rozptylu.[8, 17]

Nedávno se nanočástice stříbra díky svým antibakteriálním vlastnostem začaly užívat v medicíně. Vrstvičkou z nanočástic stříbra se pokrývají např. akupunkturní jehly, močové a žilní katetry. Využívají se také při výrobě moderních srdečních chlopní.[2, 5]

Díky svým inhibičním účinkům na růst gramnegativních bakterií se začínají používat na výrobu moderních obvazů na léčbu ran, popálenin a vředů. Oproti dřívějším obvazům, které byly impregnované sulfadiazinem stříbrným v kombinaci buď s dusičnanem ceritým nebo chlorhexidinem, snižují nové obvazy s navázanými nanočásticemi frekvenci výměny obvazů, riziko nákazy nozokomiální infekcí a poškození tkání.[5, 15, 18]

Byly vyvinuty obvazy z různých materiálů a s odlišnými mechanismy uvolňování nanočástic stříbra do rány. Na trhu se prodávají např. **Acticoat 7** (obr. 6) od společnosti Smith and Nephew. Jedná se o buničinu z polyethylenu pokrytou nanočásticemi stříbra o velikosti do 20 nm. Fungují na principu první vysoké dávky Ag^+ , po které dochází k pomalému konstantnímu uvolňování iontů do rány. Dalším typem je **Actisorb Silver 220** od společnosti Johnson and Johnson. Jedná se o buničinu naplněnou aktivním uhlím s navázanými nanočásticemi stříbra. Dochází k adsorpci bakterií na uhlí, které jsou následně zabity stříbrnými ionty).[5, 18]



Obr. 6: Jednotlivé vrstvy Acticoatu 7 [19]

V internetových obchodech jsou dostupné roztoky koloidního stříbra, které byly povýšeny na „lék na všechno“. Jedná se o různé přípravky proti špatnému dechu, na hubnutí, léčbu artrózy a dalších chorob. Účinky koloidního stříbra však ve většině těchto případů nejsou doloženy žádnými studiemi. Tyto přípravky také často obsahují

nespecifikované množství stříbra, což může vést k různým nežádoucím reakcím např. šedé zbarvení kůže.[2]

3.7. Toxické účinky nanočástic stříbra

Nanočástice, které se dostanou do těla mohou poškozovat řadu biologických struktur např. DNA. V závislosti na své velikosti se mohou do jádra dostávat několika způsoby:

- a) difúzí přes jadernou membránu (velmi malé nanočástice)
- b) transportem přes komplexy jaderných pórů
- c) náhodným uzavřením v jádře během mitózy

Po jejich vstupu do jádra dochází k interakci s molekulami DNA (přímé ovlivnění) nebo proteiny, které jsou spojeny s DNA (nepřímé ovlivnění), což vede k poškození genetického materiálu buňky.

Nanočástice se dostávají také do mitochondrie (může dojít ke ztrátě potenciálu mitochondriální membrány) a lysozomu. Při vstupu do buňky dochází ke zvýšené produkci přenašečů (např. vápníku) a aktivaci signálních drah, které mohou vést až ke vzniku zánětu nebo oxidativního stresu. Později může docházet např. k fragmentaci DNA, autofagocytóze, apoptóze nebo nekróze.[7]

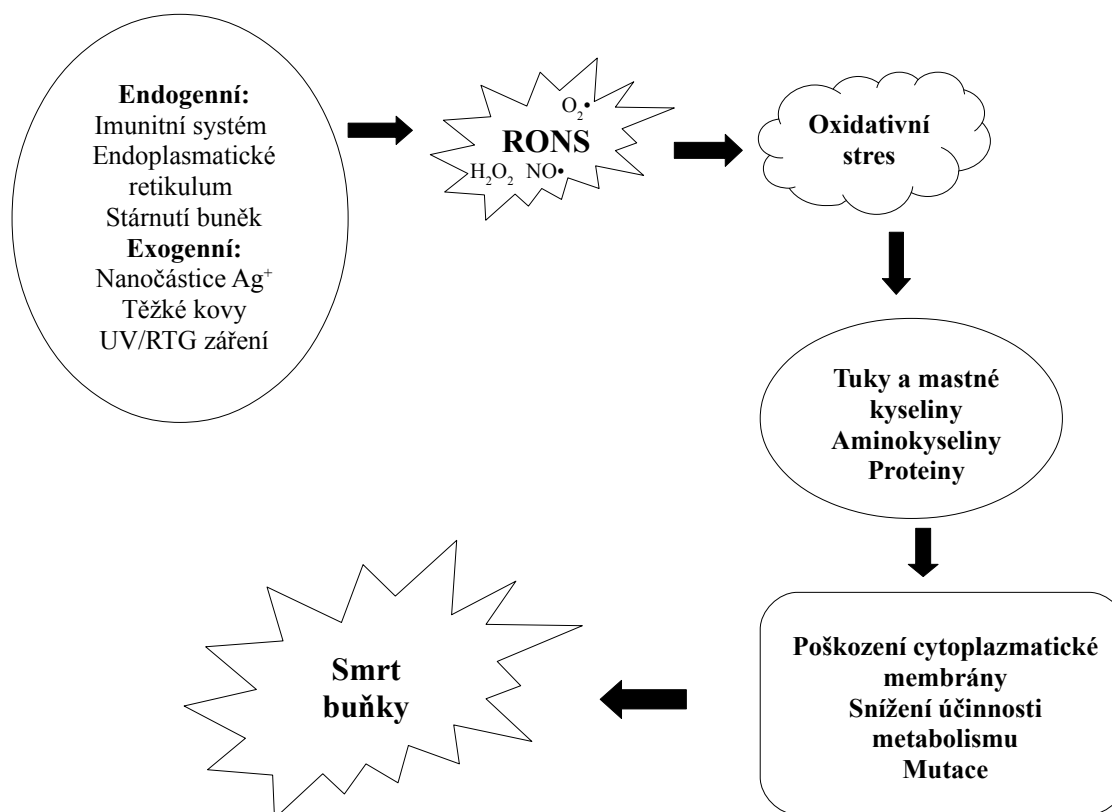
3.7.1. Oxidativní stres

Za fyziologických podmínek existuje v buňce rovnováha mezi produkcí volných radikálů a reaktivních forem O_2 a N_2 (RONS) a celkovou antioxidační kapacitou.[7] Jejím porušením dochází ke vzniku oxidativního stresu (obr. 7). Porušení rovnováhy může způsobit zvýšení produkce RONS nebo snížení kapacity antioxidačního systému.

K nadprodukci RONS dochází účinkem:

- a) exogenních faktorů – UV a RTG záření, výfukové plyny, kovy a jejich nanočástice, polutanty v ovzduší
- b) endogenních faktorů – dýchací řetězec mitochondrií, endoplasmatické retikulum, peroxizomy, specializované buňky obrany imunitního systému (makrofágy)

Produkce RONS může být pro organismus žádoucí, protože mají důležitou roli v některých biochemických procesech (např. metabolismus cizorodých látek). Dochází ke kontrolovanému uvolňování RONS, není porušena homeostáza a nevzniká oxidativní stres. V případě nadprodukce RONS je buňka vystavena oxidativnímu stresu a aktivuje signalizační dráhy a transkripční faktory, díky kterým dochází k transkripci příslušných genů jako jsou antioxidační/prooxidační enzymy nebo při vážném poškození buňka spouští signalizační dráhy vedoucí k apoptóze buňky.[7, 20]



Obr. 7: Schéma produkce RONS a jejich negativní účinky[7]

3.7.2. Genotoxicita nanočástic stříbra

Genotoxicita je schopnost chemických látek pozměnit genetický materiál buňky, což může vést až ke karcinogenezi. Genotoxický potenciál nanočástic souvisí s oxidačním stresem vyvolaným RONS a jejich schopností poškozovat DNA.[7]

Mechanismy genotoxicity dělíme na:

- a) Přímé klastogenní mechanismy – dochází k modifikaci bazí a zlomům řetězců DNA. Tyto změny mohou vést až ke vzniku nádorového bujení.

- b) Nepřímé klastogenní mechanismy – následek peroxidace lipidů účinkem RONS. Vznikající produkty (např. malondialdehyd) reagují s DNA za vzniku DNA aduktů.
- c) Aneugenické mechanismy – vznikají proteinové oxidativní léze, které ovlivňují komponenty mitotického aparátu, což vede k nefunkčnosti jednotlivých komponent během mitózy (např. segregace chromozomů).

Nanočástice stříbra mají mnohem vyšší potenciál vyvolávat oxidativní stres (zvyšují produkci RONS v buňce) a zánětlivou reakci než ostatní druhy nanočástic. V buňkách se většinou kumulují v jádře a lysozomu. Mohou působit genotoxicky a způsobovat např. vznik zlomů u řetězců DNA a vznik DNA aduktů. Při takovémto poškození DNA dochází k zastavení buněčného cyklu a opravě poškozeného řetězce DNA. Tyto účinky závisí na typu, velikosti a dalších vlastnostech nanočástic.[7, 20]

3.7.3. Zánět a nanočástice stříbra

Jako zánět označujeme souhrn fyziologických reakcí na porušení integrity organismu, které vedou k ochraně proti infikování poškozeného místa, k lokalizaci poškození a následné regeneraci nebo reparaci zničených tkání. Může být vyvolán infekčními mikroorganismy, působením chemických (např. jedy) nebo fyzikálních (např. operace, trauma) vlivů, ischemií nebo autoimunitně. Odpověď organismu na poškození je nejprve lokální (např. aktivace koagulačního systému) a následně systémová (např. horečka). [7, 21]

Podle časového projevu dělíme zánět na:

- a) Akutní – jedná se o fyziologickou obranu organismu. Většinou odeznívá bez následků a poraněná tkáň je kompletně zahojena.
- b) Chronický – Dochází k destrukci napadené tkáně a jejímu nahrazení vazivem.

Pokud není možné dostat cizí předmět z těla, přechází akutní zánět v chronický. Výsledkem zánětu jsou léze, kde buňky, které byly v zánětu zahrnuty zůstávají více nebo méně aktivované. Za počáteční signál zánětu je považována změna redoxního potenciálu buňky. K těmto změnám dochází vlivem nadprodukce RONS v monocytech a sentinelových buňkách. Vysoká produkce RONS může být vyvolána přímo (např. nanočástice kovů) nebo nepřímo (např. makrofágy).[7]

Vliv nanočástic stříbra na zánět není úplně jasný. Podle některých studií mají nanočástice stříbra protizánětlivé účinky, protože svým působením potlačují tvorbu cytokinů u pacientů s popáleninami a pooperačními srůsty. Další studie prokázaly vliv nanočástic stříbra na indukci zánětlivých cytokinů u krysích alveolárních a peritoneálních makrofágů a u lidských mezenchimálních kmenových buněk.[22]

3.8. Onemocnění spojené s nanočásticemi stříbra

3.8.1. Argýrie

Název pochází z řeckého slova argyros (stříbro) a byl poprvé použit v roce 1840. Jedná se o vzácnou reakci, kterou způsobuje chronické vystavení produktům obsahujícím stříbro nebo jeho sloučeniny. Argýrie vzniká při dlouhodobém vdechování (několik měsíců až let) nebo požívání vysokých dávek stříbra.

Projevuje se hromaděním stříbra v kůži, sliznicích, orgánech a centrální nervové soustavě. V kůži dochází nejčastěji k hromadění stříbra kolem nehtů nebo vlasů (chlupů). Stříbro nahromaděné v těle způsobuje zvýšenou produkci kožního barviva melaninu, která je ještě umocněna slunečními paprsky. Proto mají části těla, které jsou vystavené slunci (např. obličej, ruce) typický modrošedý až břidlicově šedý odstín. Tento efekt byl pozorován i na nehtech a ústních sliznicích. Stupeň zbarvení kůže je přímo uměrný dávkou stříbra a době působení slunečního záření.

Ani u pacientů s vysokým stupněm změny zbarvení kůže se nejedná o život ohrožující stav. Argýrie je pouze kosmetický problém, který není spojován s buněčným či jiným poškozením.

Šedý odstín kůže je nezvratný, ale následky se dají zmírnit laserovou terapií a zkrácením pobytu na slunci na minimum. Argýrie bývá často zaměňována s cyanózou (modré až modrofialové zbarvení kůže a sliznic vlivem nedostatečného okysličení krve), což vede k drahým, invazivním a zbytečným diagnostickým procedurám.[2, 3]

3.8.2. Argyrosis conjunctivae

Jedná se o lokální druh argýrie, postihující oko, které dostává vlivem usazování sraženin obsahujících stříbro špinavě šedé až hnědé zbarvení. K argyróze může docházet vlivem chronického vystavení stříbru a jeho sloučeninám např. v práci

(šperkařství) nebo v životním prostředí. Argyróza také vzniká při užívání vysokých dávek koloidního stříbra a dusičnanu stříbrného při léčbě některých chorob nebo při častém používání produktů obsahujících sloučeniny stříbra (některé druhy očních kapek, make up).

V 2. polovině 19. století byl dusičnan stříbrný používán jako ochrana proti vzniku zánětu spojivek u novorozenců. Později bylo zjištěno, že vystavení vysokým dávkám stříbra způsobuje rozvoj očních infekcí a argyrózy.

U pacientů byla prokázána přítomnost sulfidů stříbra v rohovce, čočce a slzných kanálcích. Stejně jako u argýrie nedochází k závažným změnám tkání a k poškození buněk.[2, 3]

4. Experimentální část

4.1. Buněčný model

Jako buněčný model byla použita primární kultura lidských kožní fibroblastů. Fibroblasty byly izolovány z kožních explantátů získaných s povolením etické komise na Oddělení plastické a estetické chirurgie Fakultní nemocnice Olomouc.

4.2. Chemikálie, roztoky, přístroje a materiál

4.2.1. Testovaný materiál

- Vzorek nanočástic metalického stříbra (1000 ppm); velikost 5 – 60 nm
- Vzorek nanočástic iontového stříbra (2000 ppm); velikost 5 – 30 nm a 80 – 90 nm

Nanočástice metalického a iontového stříbra byly poskytnuty společností NanoTrade.

Charakterizace nanočástic stříbra:

Nanočástice metalického a iontového stříbra byly charakterizovány v Laboratoři mikroskopických metod LF UP RNDr. Radkem Novotným, Ph.D. Vzorky byly nakápnuty na EM měděnou síťku s formovanou blankou a následně prohlíženy v mikroskopu JEOL JEM 2011 s urychlovacím napětím 100 kV a foceny pomocí kamery Morada a programu iTEM (SYS, Olympus).

Nanočástice metalického stříbra jsou převážně monodispersní, s velikostí 5 – 60 nm. Jsou kulatého nebo protáhlého tvaru a byly zachyceny i ve shlucích. Velikost nanočástic iontového stříbra je ve dvou rozsazích 5 – 30 nm a 80 – 90 nm. Částice jsou především kulatého tvaru a ve shlucích zachyceny nebyly.

4.2.2. Chemikálie

Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM), Ham's F12 Nutrient Mixture, fetální hovězí sérum (FBS), adenin, trypsin – EDTA (0,25% roztok), apo-transferin, 3,3,5'-trijodo-L-thyronin, hydrokortizon, insulin, amphotericin B, penicilin, streptomycin, epidermální růstový faktor, vysokotuhnoucí a nízkotuhnoucí agaróza, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT), dimethylsulfoxid (DMSO), amoniak, Triton X – 100, ethydium bromid, disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), NaCl,

NaOH, peroxid vodíku, trypanová modř. Chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma – Aldrich (USA).

4.2.3. Roztoky

Zásobní roztok fosfátového pufru (PBS)

10x PBS: NaCl (0,137 mol/l), KCl (0,00268 mol/l), Na₂HPO₄ (0,00896 mol/l), KH₂PO₄ (0,00147 mol/l); pro experimenty byl zásobní roztok 10x ředěn

Roztoky pro izolaci a kultivaci buněk

– Transportní roztok na kožní explantáty:

PBS (50 ml), amphotericin B (62,5 µg), penicilin (25 000 U), streptomycin (25 mg)

– Kultivační médium I: médium pro izolaci lidských kožních fibroblastů z kůže

Ham's F12 Nutrient Mixture (100 ml), DMEM (300 ml), FBS (10% V/V), adenin (26,4 µg/ml), apo-transferin (5 µg/ml), 3,3,5'-trijodo-L-thyronin (0,136 µg/ml), hydrokortizon (0,8 µg/ml), insulin (100 U/ml), amphotericin B (0,25 µg/ml), penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), epidermální růstový faktor (1 ng/ml)

– Kultivační médium II: médium pro kultivaci vyizolovaných lidských kožních fibroblastů

DMEM, FBS (10% V/V), penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/l)

– Experimentální médium:

DMEM, penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/l)

Roztoky pro stanovení poškození DNA

Lyzační pufr: 2,5 mol/l NaCl; 0,1 mol/l EDTA; 0,01 mol/l Tris; 1% Triton X – 100; pH = 10

Neutralizační pufr: 0,4 mol/l Tris; pH = 7,5

Elektroforetický pufr: 0,3 mol/l NaOH; 0,001 mol/l EDTA

Ostatní roztoky

trypanová modř (0,5% v PBS)

4.2.4. Přístroje

centrifuga *Labofuge 400* (Heraeus Instruments; Německo)

fluorescenční mikroskop *BX 40* s digitálním fotoaparátem *DP71* (Olympus; Japonsko)

inverzní mikroskop *CK40* (Olympus; Japonsko)

fotoaparát *C3030 ZOOM* (Olympus; Japonsko)

chlazená centrifuga *Mikro 22R* (Hettich Zentrifugen; Německo)

inkubátor *MCO 17AIC* (Sanyo Biomedical; Japonsko)

laminární box *EF/S4* (Schoeller Instruments, Česká republika)

magnetická míchačka *RH basic KT/C* (IKA; Německo)

odsávačka *Aspiration Station* (Gilson; USA)

pH metr *inoLab Level 1* (WTW; Německo)

spektrofotometr *Infinite 200 Pro* (Tecan; Rakousko)

termomixer *Comfort* (Eppendorf; Německo)

váhy *AX105 Delta Range* (Mettler Toledo; Švýcarsko)

zdroj napětí pro elektroforézu *PowerPac universal* (Bio-Rad Laboratories; USA)

4.2.5. Spotřební materiál

automatické pipety, sterilní špičky, plastové mikrozkušavky (Eppendorf, Německo)

kultivační desky, kultivační lahve a centrifugační zkumavky (Nunc, Dánsko)

mikroskopická sklíčka

4.3. Metody

4.3.1. Izolace a kultivace buněk

Kožní tkáň byla po odebrání na Oddělení plastické a estetické chirurgie FNOL uložena do transportního roztoku a přenesena na Ústav lékařské chemie a biochemie kde byla následně zpracována.

K izolaci kožních fibroblastů byla použita metoda, kdy fibroblasty vyrůstají přímo z kožních explantátů.[23]

Po promytí kožní tkáně v roztoku PBS byla tkáň rozřezána na kousky o velikosti 1 cm² a přenesena do Petriho misky se 7 ml kultivačního média I. Petriho miska byla vložena do inkubátoru nasyceného vodními parami (37°C; atmosféra 5% CO₂). Každých 48 – 72 hod byla prováděna kontrola růstu buněk a výměna kultivačního média I. Pokrytí plochy Petriho misky buňkami trvalo přibližně 4 týdny.

Po dosažení monovrstvy byly fibroblasty opláchnuty sterilním PBS (5 ml) a uvolněny inkubací 0,25% roztokem trypsinu s EDTA (0,5 ml; 2-3 min; 37°C). Potom bylo přidáno 5 ml kultivačního média II a fibroblasty byly centrifugovány (10 min; 1300 rpm; pokojová teplota). Pelet byl rozsuspendován v 10 ml kultivačního média II, buňky byly přeneseny do 75 cm² kultivační lahve a dále kultivovány.

4.3.2. Pasážování buněk

Po dosažení konfluence byly fibroblasty dvakrát opláchnuty sterilním PBS a uvolněny ze stěny kultivační lahve roztokem trypsinu s EDTA (1 ml; 0,25%). Působení trypsinu bylo po 2 minutách zastaveno 10 ml kultivačního média II. Buňky byly následně centrifugovány (10 min; 1300 rpm; pokojová teplota). Vzniklý pelet byl rozsuspendován v 10 ml kultivačního média II. Buněčná suspenze (10 µl) byla smíchána se stejným množstvím trypanové modři a následně byla stanovena koncentrace buněk. Buňky byly následně zředěny na požadovanou koncentraci a použity do experimentů.

4.3.3. Stanovení toxicity (MTT test)

Princip

MTT je redukováno mitochondriálními dehydrogenasami metabolicky aktivních buněk na fialové formazanové barvivo. Absorbanci produktu měříme fotometricky při 540 nm.[24]

Příprava buněk

Buňky byly kultivačním médiem II naředěny na koncentraci $1,6 \cdot 10^5$ buněk/ml a vysety na 96 jamkové desky (200 µl/jamka), které byly na 24 hod vloženy do inkubátoru nasyceného vodními parami (37°C; atmosféra 5% CO₂).

Vzorky nanočástic metalického a iontového stříbra byly experimentálním médiem naředěny na koncentrace 0,05 – 200 ppm. Kultivační médium II bylo z jamek odsáto a bylo aplikováno 100 µl experimentálního média obsahující nanočástice.

Po 24 hod inkubaci (inkubátor; 37°C; 5% CO₂) bylo experimentální médium se vzorky z desek odsáto a následně aplikováno 100 µl MTT naředěného s médiem v poměru 1:10. Po 3 hod inkubaci byly vzniklé fialové krystaly rozpuštěny ve 150 µl DMSO s amoniakem a byla změřena absorbance při 540 nm.

Vyhodnocení toxicity

Toxicita byla vypočtena z absorbance dle následujícího vzorce.

$$toxicita (\%) = \left(\frac{A_V - A_P}{A_K - A_P} \right) \cdot 100$$

A_V – absorbance vzorku

A_K – absorbance kontroly

A_P – absorbance pozadí (DMSO + NH₃)

4.3.4. Stanovení poškození DNA (Comet assay)

Princip

Metoda Comet assay je založena na sledování poškozené DNA v jednotlivých buňkách zalitých v tenké vrstvě agarózy po lýze a elektroforéze. Jednovláknové zlomy DNA se projeví tvorbou kometek a ty jsou sledovány mikroskopicky po obarvení fluorescenčním barvivem.[25]

Příprava sklíček

Mikroskopická sklíčka (76×26 mm) byla vyvařena v 6% peroxidu vodíku (30 min) a promyta deionizovanou vodou. Po usušení byla potažena 1% agarózou a usušena (60°C; 30 min). V den pokusu bylo na takto připravené sklíčko nanášeno 85 µl 1% vysokotuhnoucí agarózy a zakryto krycím sklíčkem. Po zatuhnutí agarózy bylo krycí sklíčko těsně před aplikací buněk odstraněno.

Příprava buněk a provedení experimentu

Buňky byly zpasážovány a vysety na 6 jamkové desky v koncentraci $6,3 \cdot 10^5$ buněk/ml (1,5 ml/jamka). Po 24 hod inkubaci (37°C; 5% CO₂) byly na buňky aplikovány netoxické koncentrace nanočástic stříbra (1,5 ml/jamku). Netoxické koncentrace (pro metalické stříbro 1, 10, 25 ppm; pro iontové stříbro 0,1; 0,5; 1 ppm) byly ze zásobních roztoků nanočástic metalického a iontového stříbra naředěny experimentálním médiem. Po 24 hod bylo z každé jamky odebráno médium (1 ml) pro stanovení koncentrace IL-6. Buňky byly opláchnuty 1 ml PBS a uvolněny 200 μ l trypsinu s EDTA (3 min; 37°C). Činnost trypsinu byla zastavena 200 μ l FBS. Suspenze byla následně centrifugována (10 min; 1300 rpm; pokojová teplota). Vzniklý pelet byl rozsuspendován v PBS (250 μ l) a pomocí trypanové modři byla stanovena koncentrace buněk.

85 μ l nízkotuhnoucí agarózy obsahující $1 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^4$ buněk bylo nanášeno na mikroskopické sklíčko s vrstvou vysokotuhnoucí agarózy a přikryto krycím sklíčkem. Po zatuhnutí agarózy bylo krycí sklíčko odstraněno a mikroskopická sklíčka s buňkami byla vložena do kyvety s vychlazeným lyzačním roztokem (1 hod; 4°C) a poté do elektroforetického pufru (40 min; 4°C), aby došlo k rozvolnění šroubovice DNA. Následně byla provedena elektroforéza (20 min; 20 V; 4°C). Po skončení elektroforézy byla sklíčka promyta neutralizačním roztokem (3x5 min), opláchnuta deionizovanou vodou a vysušena.

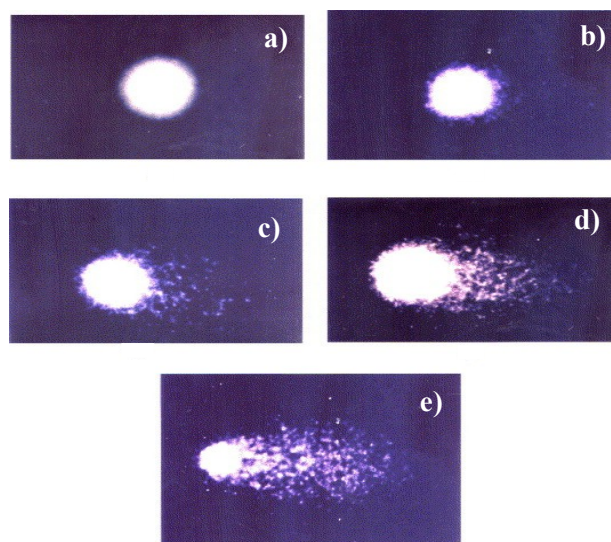
Vyhodnocení

Vyhodnocení poškození DNA (kometky) probíhalo s využitím fluorescenčního mikroskopu. Na plochy agarózy s buňkami byl aplikován ethidium bromid (20 μ l). Na každém sklíčku bylo vizuálně hodnoceno 100 kometek, které byly rozděleny podle stupně poškození do skupin 0 (nepoškozené) až 4 (úplně poškozené), viz obr. 8. Celkové poškození pro jednotlivé koncentrace bylo vypočítáno pomocí vzorce:

$$\text{celkové poškození} = \frac{N_0 \cdot 0 + N_1 \cdot 1 + N_2 \cdot 2 + N_3 \cdot 3 + N_4 \cdot 4}{N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4} \cdot 100$$

N_0, N_1, N_2, N_3, N_4 – počet buněk v každé skupině

Celkové poškození se pohybuje v rozmezí 0 – 400 arbitrárních jednotek.



Obr. 8: Příklady poškozené DNA pro vizuální hodnocení [26]

a) skupina 0 (žádné poškození); b) skupina 1 (mírné poškození); c) skupina 2; d) skupina 3; e) skupina 4 (úplné poškození)

4.3.5. Stanovení koncentrace IL-6

Princip: Hladina IL-6 byla stanovena metodou ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Tato metoda je založena na specifické reakci mezi antigenem a protilátkou, která je imobilizována na pevný povrch (jamka mikrotitrační destičky). Detekční protilátka je značena pomocí enzymu, který katalyzuje přeměnu substrátu na barevný produkt, jehož množství je stanoveno spektrofotometricky.[27]

Na 96 jamkovou desku s navázanou protilátkou bylo aplikováno 100 μl vzorkového pufru RD1W. Na takto připravenou desku bylo v dubletu pipetováno 100 μl standardu nebo vzorku média, které bylo odebráno z 6 jamkových desek při stanovení poškození DNA viz kapitola 4.3.4. Po inkubaci (2 hod; pokojová teplota) byly roztoky odsáty a jamky opláchnuty promývacím pufrem ($4 \times 100 \mu\text{l}$). Poté byl nanesen roztok enzymaticky značené protilátky (200 μl). Po inkubaci (2 hod, pokojová teplota) byl roztok odstraněn, jamky opláchnuty promývacím pufrem ($3 \times 100 \mu\text{l}$) a nanesen substrát (200 μl). Po inkubaci (20 min; tma) byla reakce ukončena zastavovacím roztokem (50 μl) a do 30 min byla změřena absorbance při 450 nm.

Vyhodnocení

Koncentrace IL-6 v jednotlivých vzorcích byla vypočítána z kalibrační křivky.

5. Výsledky

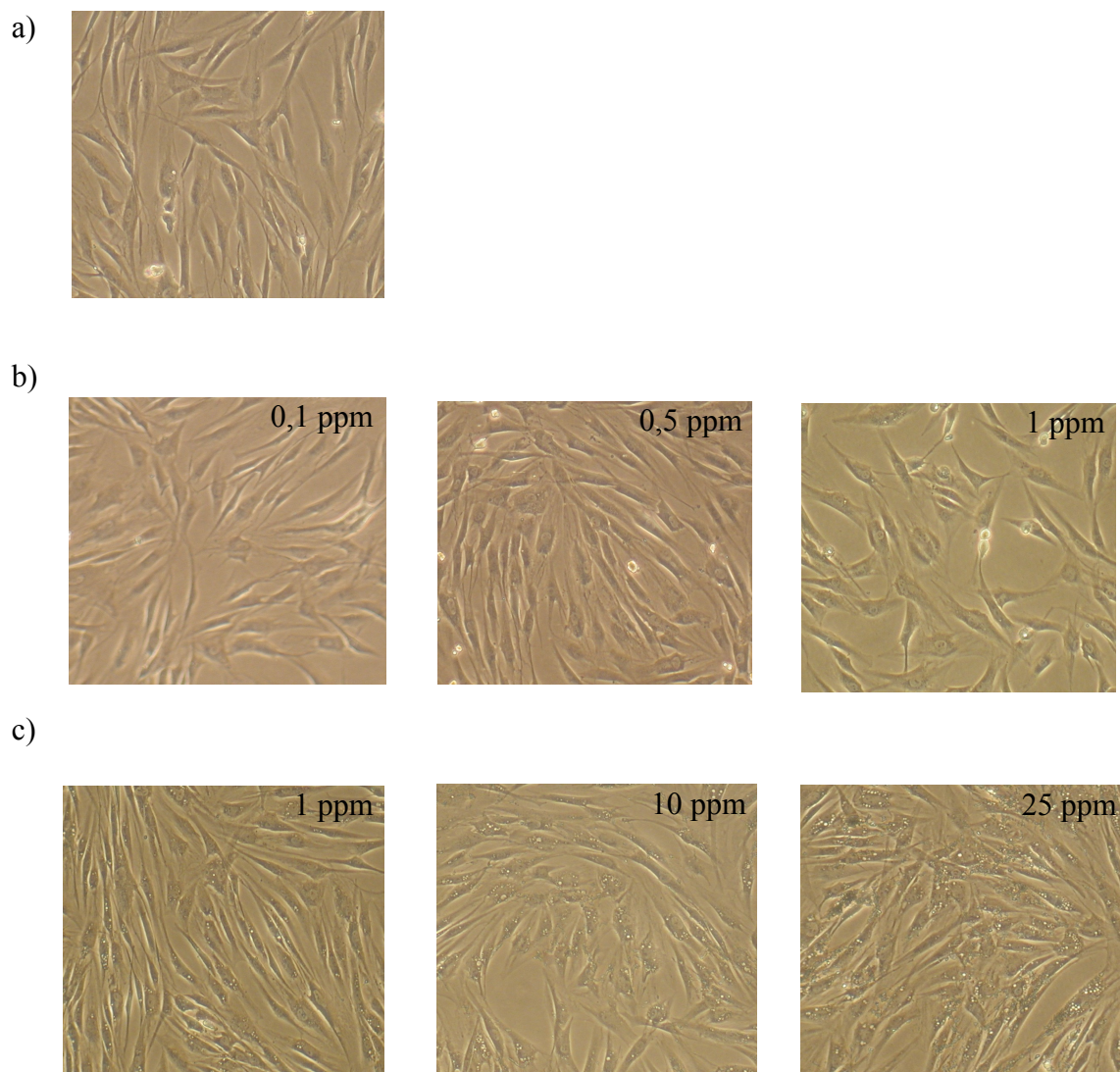
5.1. Stanovení toxicity nanočástic stříbra

Vliv nanočástic iontového a metalického stříbra na životnost lidských kožních fibroblastů byl sledován v koncentračním rozmezí 0,05 – 200 ppm po 24 hod inkubaci.

Vedle vizuálního hodnocení morfologických změn (obr. 9) byla životnost buněk hodnocena MTT testem. Výsledky byly vyjádřeny jako životnost buněk (%) v porovnání s kontrolními buňkami, které byly inkubovány stejnou dobu v médiu bez testovaných látek.

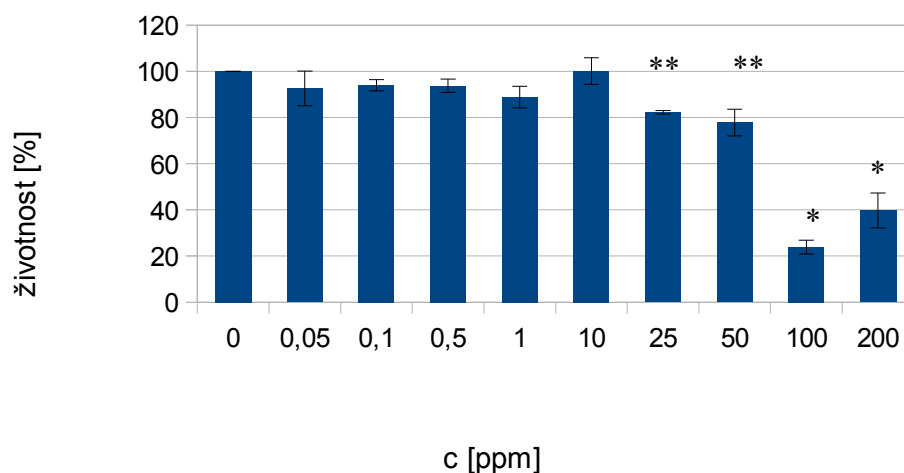
Nanočástice metalického (graf I) a iontového (graf II) stříbra vykazovaly koncentračně závislou toxicitu u lidských kožních fibroblastů. U iontového stříbra byl zaznamenán statisticky významný pokles životnosti buněk při koncentraci 10 ppm (životnost buněk byla 10%), zatímco u metalického stříbra byl zaznamenán statisticky významný pokles až u koncentrace 25 ppm, přičemž došlo ke snížení životnosti buněk pouze na 80% . Stejný pokles životnosti jako u iontového stříbra byl u metalického stříbra zaznamenán až u koncentrace 100 ppm (životnost 20%).

Pro studium vlivu nanočástic stříbra na poškození DNA a hladinu IL-6 byly na základě MTT testu vybrány koncentrace metalického (1, 10, 25 ppm) a iontového (0,1; 0,5; 1 ppm) stříbra, které nezpůsobovaly pokles životnosti buněk větší než 20%.

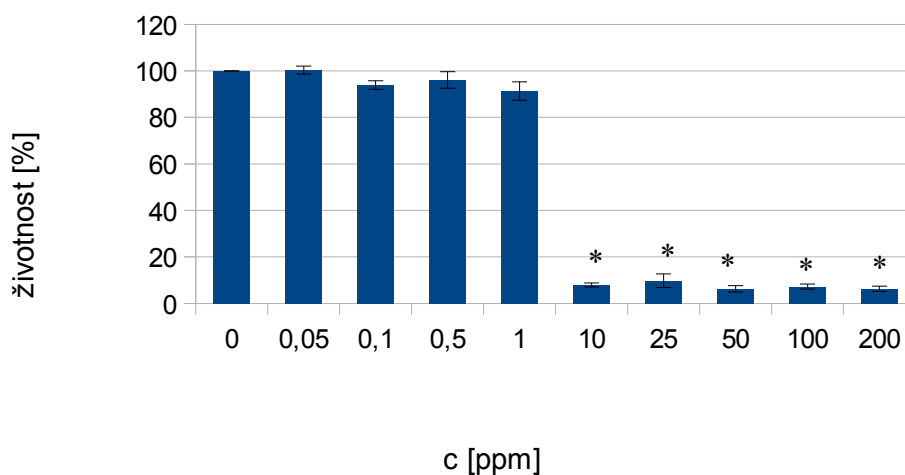


Obr. 9: Lidské kožní fibroblasty po aplikaci testovaných nanočástic (zvětšení 200x)

a) kontrolní buňky; b) buňky po aplikaci nanočástic iontového stříbra ; c) buňky po aplikaci nanočástic metalického stříbra



Graf I: Vliv nanočástic metalického stříbra na životnost lidských kožních fibroblastů (Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v hexapletu. * hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,01; ** na hladině 0,05)



Graf II: Vliv nanočástic iontového stříbra na životnost lidských kožních fibroblastů (Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v hexapletu. * hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,01)

5.2. Stanovení poškození DNA

Vliv nanočástic iontového (0,1; 0,5; 1 ppm) a metalického (1, 10, 25 ppm) stříbra na tvorbu jednovláknových zlomů DNA (Comet assay) v lidských kožních fibroblastech byl u netoxických koncentrací nanočástic sledován po 24 hod inkubaci.

U nanočástic iontového (tab. 1, 2) ani metalického (tab. 1, 3) stříbra nebyl prokázán signifikantní rozdíl v poškození DNA v porovnání s kontrolními buňkami.

Tabulka 1: Vliv nanočástic stříbra na jednovláknové zlomy DNA v lidských kožních fibroblastech (Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých experimentů.)

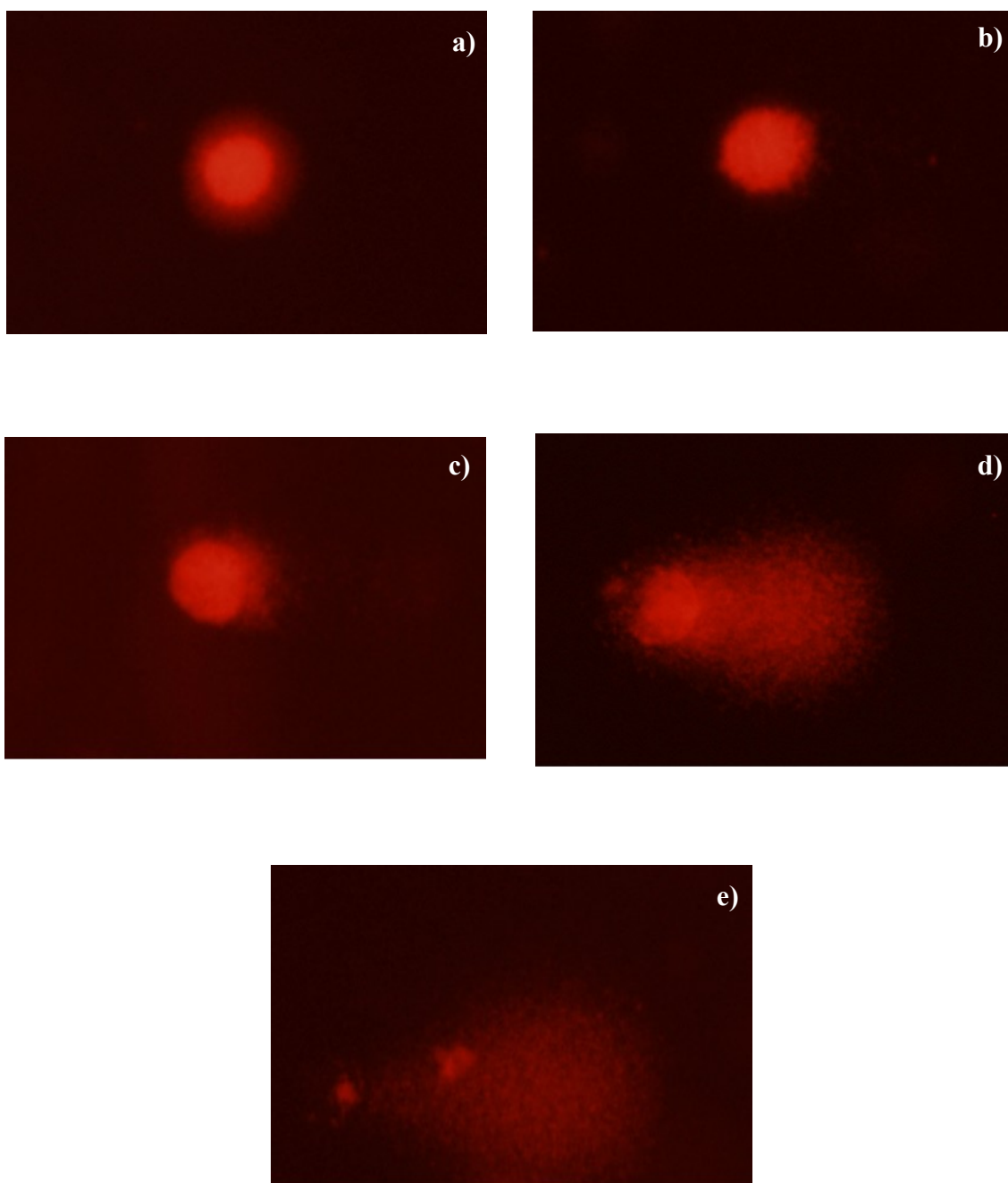
vzorek	c Ag [ppm]	množství poškozených jader				
		0	1	2	3	4
Nanočástice iontového stříbra	0	111	2	1	1	1
	0,1	108	4	1	0	0
	0,5	108	4	1	0	1
	1	106	5	0	0	1
Nanočástice metalického stříbra	0	111	3	1	1	1
	1	106	7	0	1	0
	10	104	9	1	0	1
	25	106	7	1	1	1

Tabulka 2: Vliv nanočástic iontového stříbra na poškození DNA (Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých experimentů.)

c Ag [ppm]	Celkové poškození [arbitrální jednotky]
0	6,2 \pm 1,4
0,1	4,8 \pm 0,6
0,5	4,3 \pm 1,4
1	5,0 \pm 2,3

Tabulka 3: Vliv nanočástic metalického stříbra na poškození DNA (Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých experimentů.)

c Ag [ppm]	Celkové poškození [arbitrální jednotky]
0	4,9 \pm 1,5
1	6,0 \pm 1,7
10	8,9 \pm 1,5
25	7,5 \pm 2,3



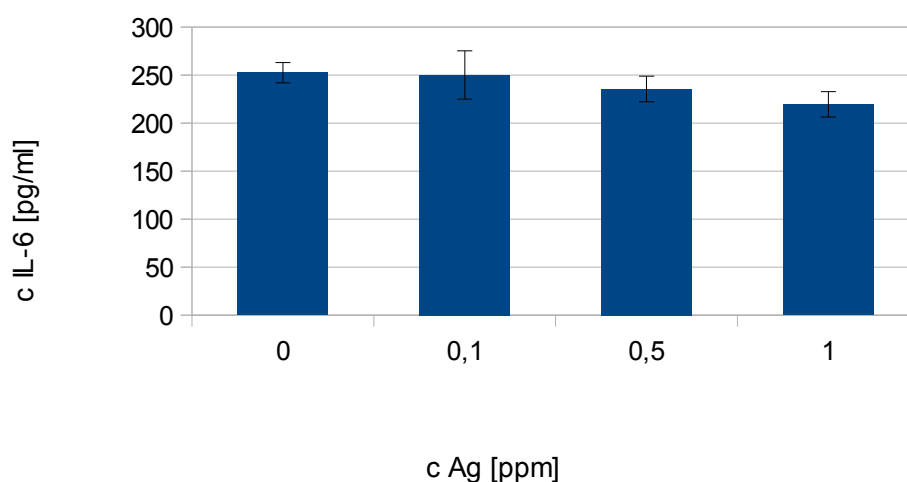
Obr. 10: Příklady poškození DNA v lidských kožních fibroblastech.

a) skupina 0 (žádné poškození); b) skupina 1 (mírné poškození); c) skupina 2;
d) skupina 3; e) skupina 4 (úplné poškození)

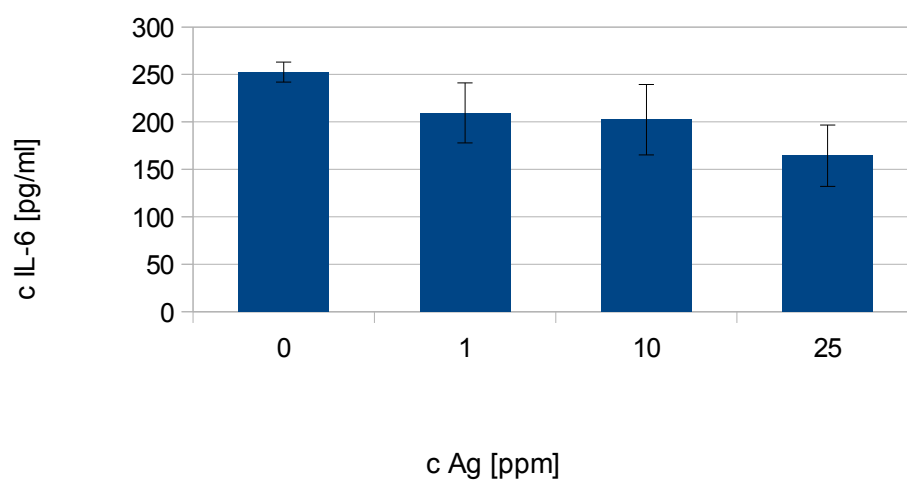
5.3. Vliv nanočástic stříbra na hladinu IL-6

Pro stanovení vlivu nanočástic stříbra na hladinu IL-6 byly lidské kožní fibroblasty inkubovány 24 hod s nanočásticemi iontového (0,1; 0,5; 1 ppm) a metalického (1; 10; 25 ppm) stříbra, které na buňky nepůsobily toxicky.

Z grafů III a IV je patrné, že netoxické koncentrace nanočástic stříbra nezvyšují koncentraci IL-6. Naopak po aplikaci nanočástic stříbra došlo ke snížení bazální hladiny IL-6 v lidských kožních fibroblastech. Výraznější pokles byl zaznamenán u nanočástic metalického stříbra (graf IV).



Graf III: Vliv nanočástic iontového stříbra na hladinu IL-6 (Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů.)



Graf IV: Vliv nanočástic metalického stříbra na hladinu IL-6 (Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ze tří nezávislých měření.)

6. Diskuze

Nanotechnologie je vysoce perspektivní obor pro vytváření nových aplikací v různých oblastech, ať už se jedná o letecké inženýrství, nanoelektroniku, péči o životní prostředí, lékařskou péči nebo oblast spotřebního zboží. Nanočástice v porovnání s makro/mikročásticemi mají velký povrch a vysokou reaktivitu a díky tomu mají vynikající fyzikální, chemické a biologické vlastnosti. Tyto vlastnosti závisí především na velikosti a tvaru nanočástic, a proto je výzkum zaměřen zejména tímto směrem. S rostoucím zájmem o biologické účinky nanočástic, zejména nanočástic stříbra a jejich využívání v medicíně, rostou zároveň obavy z potenciálního rizika toxického působení nanočástic, a to zejména po vstupu nanočástic do organismu.

V současné době existuje řada *in vitro* studií, zabývajících se hodnocením toxických účinků nanočástic stříbra, ale také dalších druhů nanočástic, které by mohly být využity v medicíně.[22, 28, 29] Naproti tomu je publikováno pouze několik *in vivo* studií, které hodnotí účinek nanočástic na celý organismus [30, 31, 32], a jejich výsledky v porovnání s *in vitro* studiemi prokazují nižší toxický účinek nanočástic stříbra.[33] Výsledky *in vitro* studií se liší v závislosti na použité buněčné linii, ale také na aplikované koncentraci, délce působení nanočástic a jejich profilu např. velikosti, tvaru, povrchovém náboji a způsobu přípravy. Při výrobě nanočástic, mohou na jejich povrchu zůstat zbytky látek, které nezreagovaly při syntéze nebo zbytky stabilizačních činidel, které mohou být jedním z důvodů většího toxického účinku nanočástic stříbra.[28]

Bakalářská práce se soustředila na studium toxicity nanočástic metalického a iontového stříbra na primárních kulturách lidských kožních fibroblastů. Toxicita byla hodnocena po 24 hodinové inkubaci nanočástic s buňkami pomocí MTT testu. Bylo zjištěno, že nanočástice metalického stříbra snížily životnost buněk při 2,5× nižší koncentraci (25 ppm) než nanočástice iontového stříbra (10 ppm), přičemž snížení životnosti bylo v případě metalického stříbra pouze o 20 % v porovnání s iontovým stříbrem, kde byl zaznamenán pokles životnosti o 90 %. Naměřená data korelují s publikovanými výsledky.[22, 34] Ghosh a kol. studovali toxicitu nanočástic stříbra o velikosti 75 – 130 nm na buněčné linii lidských lymfocytů WST-1. Zaznamenali pokles životnosti buněk v závislosti na koncentraci nanočástic stříbra, přičemž

signifikantní pokles životnosti pozorovali při koncentraci 25 ppm.[34] Park a kol. porovnávali toxicitu nanočástic metalického (20, 80 a 113 nm) a iontového stříbra na buněčných liniích myších peritoneálních makrofágů RAW 264,7 a myších fibroblastů L929. U obou buněčných linií zaznamenali pokles životnosti v závislosti na koncentraci nanočástic, přičemž u buněčné linie RAW 264,7 nezaznamenali rozdíl v toxicitě iontového a metalického stříbra. Naproti tomu, u line myších fibroblastů L929 pozorovali vyšší toxicitu metalického stříbra (2,8 ppm) než stříbra iontového (7,1 ppm). Vyšší toxicita metalického stříbra byla však pozorována pouze u nanočástic o velikosti 20 nm. V případě nanočástic o velikosti 80 a 113 nm, byla pozorována nižší toxicita metalického stříbra v porovnání s iontovým.[33] Tato data korelují s výsledky získanými v bakalářské práci.

Rovněž práce zabývající se genotoxicitou nanočástic stříbra nejsou ve svých výsledcích jednotné. Důvody pro nejednotnost výsledků jsou podobné jako v případě výše zmíněné toxicity. Liší se v závislosti na použité buněčné linii, koncentraci nanočástic, délce působení a jejich profilu např. velikosti, tvaru, povrchovém náboji a způsobu přípravy.[22, 28, 29, 34] Genotoxicita nanočástic stříbra je připisována jejich schopnosti podporovat tvorbu nežádoucích ROS. Přítomnost nanočástic o různých velikostech a chemickém složení byla prokázána především v mitochondriích, kde poškozovaly významné biomolekuly a přispívaly tak ke vzniku oxidativního stresu. Bylo prokázáno, že po aplikaci nanočástic stříbra na buněčnou linii potkaních hepatocytů dochází k poškození buněčné membrány, snížení hladiny glutathionu a zvýšení produkce ROS, což naznačuje nežádoucí vliv nanočástic na dýchací řetězec. Ukládáním nanočástic stříbra v mitochondriích může docházet k ovlivnění jejich funkcí narušením dýchacího řetězce, což může vést k nadprodukci ROS a snížení produkce ATP. ROS jsou vysoce reaktivní a jejich účinkem dochází k oxidativnímu poškození proteinů a DNA.[28]

V bakalářské práci byla genotoxicita nanočástic metalického a iontového stříbra hodnocena tvorbou jednovláknových zlomů DNA. Cílem bakalářské práce bylo vybrat a ověřit bezpečnost vhodných koncentrací nanočástic metalického a iontového stříbra, u kterých budou následně testovány protektivní účinky (např. protizánětlivé a fotoprotektivní účinky, vliv na hojení ran atd.). Z tohoto důvodu byly pro studium genotoxicity vybrány takové koncentrace, které nezpůsobovaly vyšší než 20% snížení

životnosti buněk. U těchto koncentrací iontového (0,1; 0,5 a 1 ppm) a metalického (1, 10 a 25 ppm) stříbra nebyl zaznamenán genotoxický potenciál hodnocený tvorbou jednovláknových zlomů DNA.

V rozporu s výsledky bakalářské práce jsou některé studie, které popisují tvorbu jednovláknových zlomů DNA při koncentraci nanočástic 25 ppm.[28, 34] AshaRani a kol. prokázali, že podobně jako toxicita, je i genotoxicita nanočástic závislá na jejich koncentraci. Zjistili, že nanočástice stříbra poškozují DNA u normálních lidských fibroblastů. Signifikantní nárůst poškození DNA zaznamenali již u koncentrace nanočástic 25 ppm s tím, že se poškození DNA zvyšovalo až do koncentrace 100 ppm. [28] Opačný trend pozoroval tým autorů Ghosh a kol., kteří studovali poškození DNA u lidských lymfocytů. Rovněž jako ve výše zmiňované práci pozorovali signifikantní nárůst poškození DNA u koncentrace 25 ppm, nicméně u vyšších koncentrací (50, 100, 150 a 200 ppm) pozorovali naopak pokles tvorby jednovláknových zlomů DNA.[34] Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben velikostí nanočástic a typem buněčné linie, na které experimenty prováděli. AshaRani a kol. testovali genotoxicitu na normálních lidských fibroblastech a používali nanočástice o velikosti 6-20 nm,[28] zatímco Ghosh a kol. testování prováděli na lidských lymfocytech a měli částice o velikosti 75-130 nm.[34]

Z důvodu předpokládaného použití nanočástic metalického a iontového stříbra ke studiu protizánětlivých účinků a vlivu na hojení ran byl u nanočástic stříbra studován vliv na markery zánětu. Jedním z typických markerů zánětu je IL-6. Hodnocení vlivu nanočástic metalického a iontového stříbra na produkci IL-6 v lidských kožních fibroblastech probíhalo pomocí metody ELISA. Bylo zjištěno, že po 24 hodinové aplikaci nanočástic stříbra na buňky nedochází ke zvýšení hladiny IL-6. Naopak bylo pozorováno, že nanočástice snižují jeho bazální hladinu v buňkách. Pokles koncentrace IL-6 byl výraznější u nanočástic metalického stříbra.

Podobné výsledky publikoval i Carlson a kol., kteří studovali vliv nanočástic stříbra o různých velikostech (15, 30 a 55 nm) na vybrané markery zánětu u potkaních alveolárních makrofágů. Prokázali, že nanočástice zvyšují hladinu tumor nekrotizujícího faktoru- α a interleukinu-1 β , ale nemají vliv na hladinu IL-6.[35]

Výsledky bakalářské práce prokázali bezpečnost nanočástic metalického (1, 10 a 25 ppm) a iontového (0,1; 0,5 a 1 ppm) stříbra, které budou následně použity k testování protizánětlivých účinků a vlivu na hojení ran na primárních kulturách lidských kožních fibroblastů.

7. Závěr

Bakalářská práce se zabývala studiem biologického účinku nanočástic dvou forem nanočástic stříbra, iontového a metalického. Ze získaných výsledků lze vyvodit tyto závěry:

- a) Bylo zjištěno, že nanočástice iontového stříbra snižují životnost buněk při 2,5× nižší koncentraci (10 ppm) než nanočástice metalického stříbra (25 ppm). Pokles životnosti účinkem nanočástic iontového stříbra byl o 90% zatímco u nanočástic metalického stříbra pouze o 20%. Pokles životnosti buněk o 90% byl v případě metalického stříbra zaznamenán až u koncentrace 100 ppm.
- b) Vybrané netoxické koncentrace iontového (0,1; 0,5; 1 ppm) a metalického stříbra (1; 10; 25 ppm):
 - neměly vliv na tvorbu jednovláknových zlomů DNA
 - snižovaly bazální hladinu IL – 6 v lidských kožních fibroblastech. Výraznější pokles byl zaznamenán u nanočástic metalického stříbra.

8. Použitá literatura

1. Klasen HJ. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 2000; 26: 117 – 130.
2. Landsdown AB. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. *Advances in Pharmacological Sciences* 2010; 1 - 16.
3. Wadhera A, Fung M. Systemic argyria associated with ingestion of colloidal silver. *Dermatology Online Journal* ; 1: 1 – 12.
4. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 2009; 27: 76 – 83.
5. Chopra I. The increasing use of silver - based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 59: 587 – 590.
6. Klasen HJ. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* 2000; 26: 131 – 138.
7. Filipová Z, Kukutschová J, Mašláň M. Rizika nanomateriálů. Univerzita Palackého v Olomouci 2012.
8. Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* 2009; 145: 83 – 96.
9. Anonymous: www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html přečteno 29.4.2013
10. Kvítek L, Pucek R, Panáček A, Soukupová J. Nanočástice stříbra - příprava, vlastnosti a aplikace. *NANOCON, Rožnov pod Radhoštěm* 2009; 1 – 9.
11. Panáček A, Kvítek L. *Základy koloidní chemie*. Univerzita Palackého v Olomouci. 2007.
12. Leopold N, Lendl B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. *The Journal of Physical Chemistry. B.* 2003; 107: 5723 – 5727.
13. Schneidewind H, Schüler T, Strelau KK, Weber K, Cialla D, Diegel M, Mattheis R, Berger A, Möller R, Popp J. The morphology of silver nanoparticles prepared by enzyme-induced reduction. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 2012; 3: 404 – 414.

14. Panyala NR, Peña - Méndez EM, Havel J. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health?. *Journal of applied biomedicine* 2008; 6: 117 – 129.
15. Seil J, Webster T. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International Journal of Nanomedicine* 2012; 7: 2767 - 2781.
16. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2007; 3: 95 – 101.
17. Nie S, Emory SR. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced raman scattering. *Science* 1997; 275: 1102 – 1106.
18. Atijeh BS. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns* 2007; 33: 139 – 148.
19. Anonymous: www.smith-nephew.com/south-africa/products/acticoat--product-range/acticoat--7---product-information/ přečteno přečteno 17.4.2013
20. Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, Choi J, Hyun JW. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters* 2011; 201: 92 – 100.
21. Hořejší V, Bartůňková J. *Základy imunologie*. Triton, Praha 2005
22. Park MV, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJ, Verharen HW, Briedé JJ, van Loveren H, de Jong WH. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 2011; 32: 9810 – 9817.
23. Takashima A. Establishment of fibroblast cultures. *Current protocols in cell biology*. 2001
24. Sieuwerts AM, Klijn JG, Peters HA, Foekens JA. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1995; 53: 813 – 823.

25. Tice RR, Andrews PW, Singh NP. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sciences* 1990; 53: 291 – 301.
26. Wang SC, Chung JG, Chen CH, Chen SC. 2- and 4-Aminobiphenyls induce oxidative DNA damage in human hepatoma (Hep G2) cells via different mechanisms. *Mutation Research* 2006; 593: 9 – 21.
27. McMeekin T. *Detecting pathogens in food*. 2003
28. AshaRani PV, Mun GL, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* 2009; 3: 279 – 290.
29. Lima R, Seabra AB, Durán N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology* 2012; 32: 867 – 879.
30. Hyun JS, Lee BS, Ryu HY, Sung JH, Chung KH, Yu IJ. Effects of repeated silver nanoparticles exposure on the histological structure and mucins of nasal respiratory mucosa in rats. *Toxicology Letters* 2008; 182: 24 – 28.
31. Sung JH, Ji JH, Park JD, Yoon JU, Kim DS, Jeon KS, Song MY, Jeong J, Han BS, Han JH, Chung YH, Chang HK, Lee JH, Cho MH, Kelman BJ, Yu IJ. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicological Sciences* 2009; 108: 452 – 461.
32. Kim WY, Kim J, Park JD, Ryu HY, Yu IJ. Histological study of gender differences in accumulation of silver nanoparticles in kidneys of Fischer 344 rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 2009; 72: 1279 – 1284.
33. Park EJ, Bae E, Yi J, Kim Y, Choi K, Lee SH, Yoon J, Lee BC, Park K. Repeated – dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2010; 30: 162 – 168.
34. Ghosh M, J M, Sinha S, Chakraborty A, Mallick SK, Bandyopadhyay M, Mukherjee A. In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutation Research* 2012; 749: 60 – 69.
35. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry B* 2008; 112: 13608 – 13619.

9. Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FBS	fosfátový pufr
IL-6	interleukin 6
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid
PBS	fosfátový pufr
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan