

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplin



**Stříbrné nanočástice (AgNPs) prospěšné či nebezpečné pro
zdraví zvířat**

Bakalářská práce

Autor práce: Petra Jirásková

Vedoucí práce: MVDr. Helena Härtlová, CSc.

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Stříbrné nanočástice (AgNPs) prospěšné či nebezpečné pro zdraví zvířat" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11.04.2014

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala MVDr. Heleně Härtlové, CSc., vedoucí mé bakalářské práce, za věcné připomínky, vstřícnost a odborný dohled v průběhu zpracování bakalářské práce.

Stříbrné nanočástice (AgNPs) prospěšné či nebezpečné pro zdraví zvířat

Souhrn

Nanotechnologie je rychle se rozvíjející obor, který přináší nové možnosti a mohl by tak být přínosem i pro zdraví zvířat. Jedním z nanomateriálů, které tento obor umožnil získat, jsou stříbrné nanočástice (AgNPs).

Cílem práce bylo popsat působení stříbrných nanočástic na organismus zvířat s jejich pozitivními i negativními důsledky.

Je známo několik mechanismů účinku AgNPs na buňky, na který má vliv velikost nanočástic, jejich morfologie a také koncentrace. Vliv na účinek stříbrných nanočástic má i jejich povrchová úprava, která může zabránit nestabilitě disperzí nanočástic.

AgNPs vykazují vysoce účinný antibakteriální účinek vlivem velké plochy, kterou tyto malé částice působí na mikroorganismy. Účinky AgNPs se neomezují pouze na bakterie, ale byly sledovány také u poměrně širokého spektra virů. V současnosti je testováno působení AgNPs a antibiotik, které by mohlo významně posunout medicínu v oblasti boje s antibiotickou rezistencí.

Unikátní vlastnosti AgNPs je předurčují pro využití v mnoha oblastech. Je ale třeba se zabývat komplexně důsledky jejich používání, neboť rozsah účinku nanočástic není ještě zcela znám. Proběhlo několik studií u bezobratlých živočichů, při kterých byla sledována zvýšená apoptóza, oxidativní stres a poškození DNA. Ve vodním prostředí jsou organismy vystaveny působení AgNPs ještě ve větší míře. U některých živočichů bylo zaznamenáno ukládání do tkání, oxidativní stres, vývojové vady a mortalita. U savců bylo sledováno ukládání AgNPs do orgánů a to zejména do plic, jater a ledvin.

Klíčová slova: AgNPs – indukovaná toxicita, oxidativní stres, apoptóza, rány

Silver nanoparticles (AgNPs) beneficial or damages for the health of animals

Summary

Nanotechnology has been a fast developing field which brings new possibilities and thus it could also be beneficial for the health of animals. Silver nanoparticles (AgNPs) is one of the nanomaterials which has been obtained through this field of study.

The aim of this thesis is to describe actions/effects of silver nanoparticles on animal organisms along with both their positive and negative impacts. Several mechanisms of AgNPs actions on cells are known - these are influenced by the size of nanoparticles, their morphology and also concentration. The AgNPs surface adjustment, which can prevent instability of disperse nanoparticles, also influences the AgNPs actions.

AgNPs show a highly efficient antibacterial effect due to a large surface area by which these small particles influence micro-organisms. AgNPs effects are not limited only to bacterias, they have also been observed in a wide range of viruses. Currently, AgNPs actions with antibiotics have been tested, which could mean a significant advance for medicine in the area of fighting antibiotics resistance.

Unique AgNPs properties make them ideal to be broadly used in many areas. However, it is necessary to deal with consequences of their use thoroughly as the scope of the nanoparticles effect has not been fully known as yet. Several studies on invertebrates have been conducted during which the following features were noticed : increased apoptosis, reactive oxygen species and damage of DNA. Organisms are exposed even to a greater extent to AgNPs effects in water environment. In some animals the following features were observed: deposits of AgNPs into DNA, reactive oxygen species, development disorders and mortality. Depositing of AgNPs into organs, particularly to lungs, livers and kidneys was observed in mammals.

Keywords: AgNPs- induce toxicity, reactive oxygen species (ROS), apoptosis, wounds

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Cíl práce	8
3 Stříbrné nanočástice a jejich účinky	9
3.1 Stříbrné nanočástice	9
3.2 Mechanismus účinku stříbrných nanočástic	9
3.2.1 Interakce AgNPs s proteiny.....	10
3.2.2 Přímé účinky AgNPs na buněčnou membránu.....	10
3.2.3 Vliv AgNPs na tvorbu reaktivních forem kyslíku.....	10
3.2.4 Účinky AgNPs na DNA.....	10
4 Antimikrobiální a antimykotické účinky	10
4.1 Antibakteriální působení	10
4.2 Antivirové účinky.....	12
4.3 Antimykotické účinky.....	14
5 Působení stříbrných nanočástic na buňky a orgány	15
5.1 Protizánětlivé účinky.....	15
5.2 Cytostatické účinky.....	17
5.3 Cytotoxicita stříbrných nanočástic	18
5.4 Distribuce a ukládání stříbrných nanočástic do buněk a orgánů.....	20
6 Působení stříbrných nanočástic na organismus živočichů	23
6.1 Účinky stříbrných nanočástic na organismus bezobratlých živočichů	23
6.2 Účinky stříbrných nanočástic na organismus vodních živočichovů	24
6.3 Účinky stříbrných nanočástic na organismus savců	27
7 Oblasti využití stříbrných nanočástic	30
7.1 Využití stříbrných nanočástic v lékařství.....	30
7.1.1 Stříbrné nanočástice používané v lékařské praxi.....	30
7.1.2. Ověřované možnosti využití AgNPs v medicínských aplikacích.....	31
7.2 Ostatní oblasti využití stříbrných nanočástic	32
8 Závěr.....	33
9 Seznam literatury	34

1 Úvod

Samotné stříbro bylo v medicíně používáno po tisíciletí a ještě na počátku 20. století mělo pro své antimikrobiální účinky nezastupitelnou úlohu zejména při léčbě ran. To se změnilo objevem penicilinu a následným zaváděním antibiotik. S nástupem nanotechnologií došlo k rozšíření nanosloučenin, které mají jedinečné vlastnosti. Do popředí zájmu se dostaly i nanočástice stříbra, které mají potenciálně široký rozsah uplatnění, a těchto možností stále přibývá. Nejvíce využívanými vlastnostmi stříbrných nanočástic by mohly být jejich antibakteriální, antivirové a protizánětlivé účinky, které byly potvrzeny studiemi i u některých závažných nemocí. Současně je podstatná i jejich úloha v boji s antibiotickou rezistencí. Pro své vlastnosti nachází kromě toho využití také jako součást obvazů, hydrogelů, mastí, implantátů, nátěrů, chemických i textilních čistících prostředků, filtrů, oblečení. Své uplatnění mají také v molekulární diagnostice.

2 Cíl práce

Široké využití AgNPs v průmyslu i humánní medicíně vyvolává řadu otázek o působení těchto nanočástic na organismus zvířat. Možnosti jejich využití ve veterinární medicíně už jsou částečně řešeny a proto bylo žádoucí souborně shrnout poznatky publikované do současné doby. Cílem práce je popsat působení stříbrných nanočástic na organismus zvířat s jejich pozitivními i negativními důsledky.

3 Stříbrné nanočástice a jejich účinky

3.1 Stříbrné nanočástice

Stříbrné nanočástice (AgNPs) jsou částice stříbra, jejichž velikost se pohybuje v rozpětí od 1 do 100 nm. V posledních letech jsou předmětem zájmu mnoha výzkumů a to pro své zajímavé fyzikální, chemické a biologické vlastnosti, které mají velký potenciál. Tyto vlastnosti jsou dány nejenom velikostí částic, ale liší se významně i v závislosti na jejich tvaru, který se může pohybovat od tvaru koule, přes tyčinky, krychle až po mnohostěny (Chen and Schluesener, 2008).

Jejich vlastnosti jsou ovlivněny také formou získávání nanočástic. Rozšířenými způsoby syntézy jsou metody chemické a fyzikální. V poslední době ale začínají převažovat nanobiotechnologie, které pro syntézu nanočástic využívají bakterie, houby a rostlinné výtažky. Nanobiotechnologie se rychle rozvíjí, protože tento způsob výroby je rychlejší než tradiční metody, levnější a šetrnější k životnímu prostředí (Prabhu and Poulouse, 2012).

3.2 Mechanismus účinku stříbrných nanočástic

Je známo několik mechanismů účinku AgNPs na buňky, na který má vliv velikost nanočástic, jejich morfologie a také koncentrace. Stříbrné nanočástice na povrchu buněk reagují s membránovými proteiny a ovlivňují jejich funkci, dále mohou svou kumulací na povrchu buněčné membrány přímo ovlivňovat její propustnost, vyvolávají tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) a po vstupu do buňky mohou také poškozovat DNA (You et al., 2012).

Vliv na účinek stříbrných nanočástic má jejich povrchová úprava, která může zabránit nestabilitě disperzí nanočástic. K destabilizaci, vzniku agregátů (shluků volných částic) a snížení biocidního účinku může dojít vlivem podmínek prostředí, do kterého jsou částice aplikovány, a to působením velké změny pH, nadbytkem některých organických látek a elektrolytů. Proto se přistupuje k povrchové modifikaci nanočástic (Nel et al, 2009).

3.2.1 Interakce AgNPs s proteiny

AgNPs mohou vstupovat do interakce s thiolovými skupinami v proteinech důležitými pro buněčný metabolismus a v důsledku inaktivovat tyto enzymy a přerušit tvorbu ATP (Su et al., 2009). Mohou se také vázat na transportní proteiny buňky, snižovat tak absorpci a zvyšovat vylučování fosfátů (Marambio–Jones et Hoek, 2010). Vlivem těchto procesů pak dochází k apoptóze buňky.

3.2.2 Přímé účinky AgNPs na buněčnou membránu

AgNPs mohou přímo působit na buněčnou membránu a to adhezí na povrchu membrán, při které dochází ke strukturálním změnám v buněčné membráně a vytvoření pórů na povrchu buňky. Následkem narušení integrity membrány dojde k změně její propustnosti, poškození buňky a buněčné smrti (Sondi et Salopek-Sondi, 2004).

3.2.3 Vliv AgNPs na tvorbu reaktivních forem kyslíku

Dalším možným účinkem AgNPs je nadměrná tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) po vystavení mitochondrií jejich vlivu. Mitochondrie ROS přirozeně produkují a buňka má současně mechanismy ochrany před volnými radikály, ale AgNPs mohou způsobit zvýšení tvorby ROS a nebo poškození mechanismů obrany. ROS pak mohou způsobovat denaturaci proteinů, poškození membránových lipidů a DNA (You et al., 2012).

3.2.4 Účinky AgNPs na DNA

Kromě poškození DNA účinky ROS může docházet k navýšení množství mutací i vlivem uvolněných Ag^+ z AgNPs po jejich proniknutí do buňky, přičemž rychlost uvolňování iontů je úměrná velikosti plochy částic a proto nanočástice mohou uvolňovat ionty rychleji než částice větší. Uvolněné stříbrné ionty pak mohou narušit replikaci DNA svým navázáním na DNA polymerázu (Yang et al., 2009).

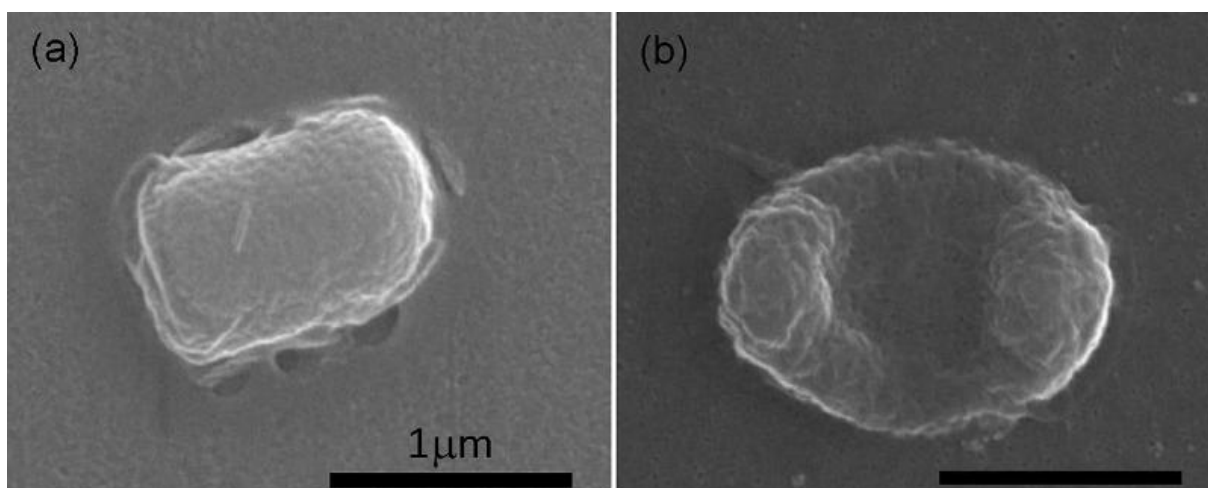
4 Antimikrobiální a antimykotické účinky

4.1 Antibakteriální působení

AgNPs vykazují vysoce účinný antibakteriální účinek vlivem velké plochy, kterou tyto malé částice působí na mikroorganismy. Otázka velikosti částic a jejich koncentrace je řešena ve vztahu ke konkrétním bakteriím.

AgNPs o velikosti 16 nm byly schopné zcela inhibovat kolonie tvořící jednotky (KTJ) *Escherichia coli* při 60 µg/ml (Raffi et al., 2008). Podle jiné studie byly schopny nanočástice stříbra o koncentraci 30 µg/ml snížit po 10 minutách kontaktu KTJ *Escherichia coli* z 10^4 CFU/ml na 0. V případě *Staphylococcus aureus* byly tyto AgNPs ve stejných podmínkách schopny snížit KTJ na méně než 20 (Smetana et al., 2008). Minimální inhibiční koncentrace (MIC) v rozmezí od 13,5 do 1,69 µg/ml byly hlášeny u bakteriálních kmenů jako *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 a také u kmenů izolovaných z humánního klinického materiálu a to *Pseudomonas aeruginosa*, methicilin citlivý *Staphylococcus epidermis*, methicilin rezistentní *Staphylococcus epidermis*, methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, vankomycin rezistentní *Enterococcus faecium* a *Klebsiella pneumonia* po vystavení AgNPs o velikosti 26 nm (Kvítek et al., 2008).

Obr. 1 Snímky z REM: a) *Escherichia coli* před aplikací AgNPs, b) *Escherichia coli* po aplikaci AgNPs (tvorba porézní struktury a změna morfologie) (Ghodake et al., 2013)



Některé studie uvádí, že kladný náboj stříbrných iontů je rozhodující pro jejich antimikrobiální aktivitu prostřednictvím elektrostatické přitažlivosti mezi negativně nabitou buněčnou membránou mikroorganismu a pozitivně nabitými nanočásticemi. AgNPs nahromaděné na bakteriální membráně zvyšují její propustnost a vedou k buněčné smrti (Dibrov et al., 2002).

Bylo také zjištěno, že AgNPs mohou modulovat transdukci signálu do gram-negativních bakterií. Zjistilo se, že AgNPs defosforylují peptidové substráty na tyrosinové zbytky a to vede k inhibici transdukce signálu a zastavení růstu (Shrivastava et al., 2007).

Kromě toho byl také hodnocen biocidní účinek v závislosti na tvaru AgNPs. Interakce byla v tomto případě sledována u bakterie *Escherichia coli*, kde byl významně vyšší biocidní účinek zaznamenán u AgNPs ve tvaru komolého trojbokého jehlanu oproti tvaru kulovitému nebo tyčinkovitému (Choi et al., 2008).

V současné době je testováno současné působení AgNPs a antibiotik, které by mohlo významně posunout medicínu v oblasti boje s antibiotickou rezistencí. Bylo zjištěno, že AgNPs posilují působení antibiotik na bakterie a obnovují tak jejich účinky vůči rezistentním bakteriím. Již dříve byl prokázán synergický účinek při použití AgNPs a současně amoxicilinu u *Escherichia coli* (Li et al., 2005).

Je třeba uvést, že baktericidní účinek AgNPs může být ovlivněn přítomností extracelulárních antioxidantů (Kim et al., 2007). Bylo prokázáno, že účinky AgNPs mohou být v některých případech částečně nebo plně reverzibilní působením vitamínu C (Posgai et al., 2011).

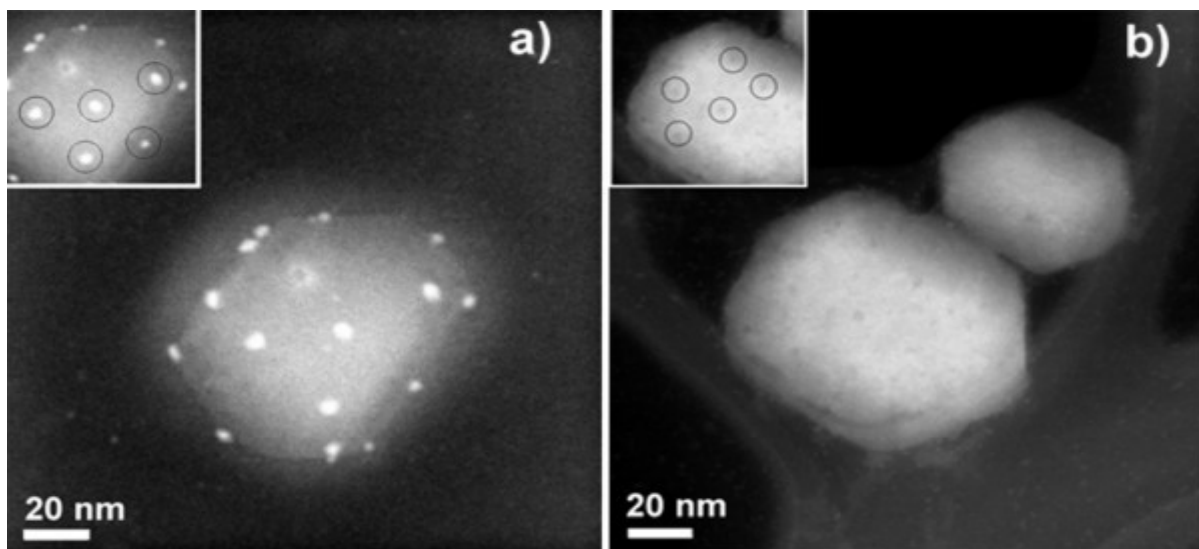
4.2 Antivirové účinky

Účinky AgNPs se neomezují pouze na bakterie, ale byly sledovány také u poměrně širokého spektra virů. Je tak uvažováno o potenciálním použití nanočástic stříbra jako antivirových léčiv, neboť virové infekce představují závažný problém a to nejen z důvodů absence vakcín proti některým patogenům, omezeným možnostem antivirotik a jejich nežádoucím vedlejšími účinkům, ale také vzhledem k mutacím virů a nově se objevujícím nebezpečným virovým onemocněním.

Byl prokázán účinek proti několika typům virů jako například viru HIV-1, viru hepatitidy B, herpes simplex virům, respiračnímu syncytiálnímu viru, viru neštovic opic, viru chřipky a viru Tacaribe, které mohou způsobovat další zdravotní komplikace (Galdiero et al., 2011). Antivirové účinky byly prokázány studií in vitro také na virus chřipky prasat H1N1 a to zejména v časně fázi šíření uvedeného viru (Xiang et al., 2011). Závěry nedávné studie naznačily, že nanočástice stříbra vykazují při testech zajímavé inhibiční účinky i na adenoviry

typu 3, které jsou spojené s respiračním, očním nebo gastrointestinálním onemocněním (Chen et al., 2013).

Obr. 2 Snímky viru HIV ze skenovacího transmisivního elektronového mikroskopu: a) virus vystavený účinku AgNPs, b) virus bez AgNPs (Elechiguera et al., 2005)



Jeden ze slibných směrů, kterým by se mohl vývoj antivirotik ubírat, je orientován na úvodní fázi po proniknutí viru do organismu, zejména na jeho navázání a proniknutí do buňky v hostitelském organismu. Zásah do životního cyklu viru blokováním jeho vstupu do buňky by tak mohl účinně inhibovat replikaci viru a bránit rozvoji onemocnění (Melby et Westby, 2009).

Jak uvádí Stefania Galdiero et al. mechanismus tohoto účinku spočívá v přímé interakci mezi AgNPs a glykoproteiny na povrchu viru mimo buňku. Úvodní proces vazby na buňku je v případě herpesvirové infekce zprostředkován interakcí mezi glykoproteiny gC, gB a sulfátem heparanu (HS). Po navázání dojde ke vstupu herpes viru do buňky po sloučení lipidové dvouvrstvy virového obalu s membránou hostitelské buňky. AgNPs s povrchovou úpravou – povlakem merkaptoethansulfonátu působí podobně jako sulfát heparanu a mohou tak omezovat navázání viru na buňku (Galdiero et al., 2011).

Další možností jak zamezit replikaci viru je interakce nanočástic s genomem viru po proniknutí AgNPs do buňky. Toto působení nanočástic stříbra bylo posáno u viru hepatitidy B, který po vstupu do buňky migruje do jádra, kde dochází k dokončení genomu a vzniku kovalentně uzavřené cirkulární DNA, podle které následně vzniká transkripce virová mRNA a tvoří se pgRNA. Rezervní transkripce jsou pak produkovány nové virové genomy. Bylo

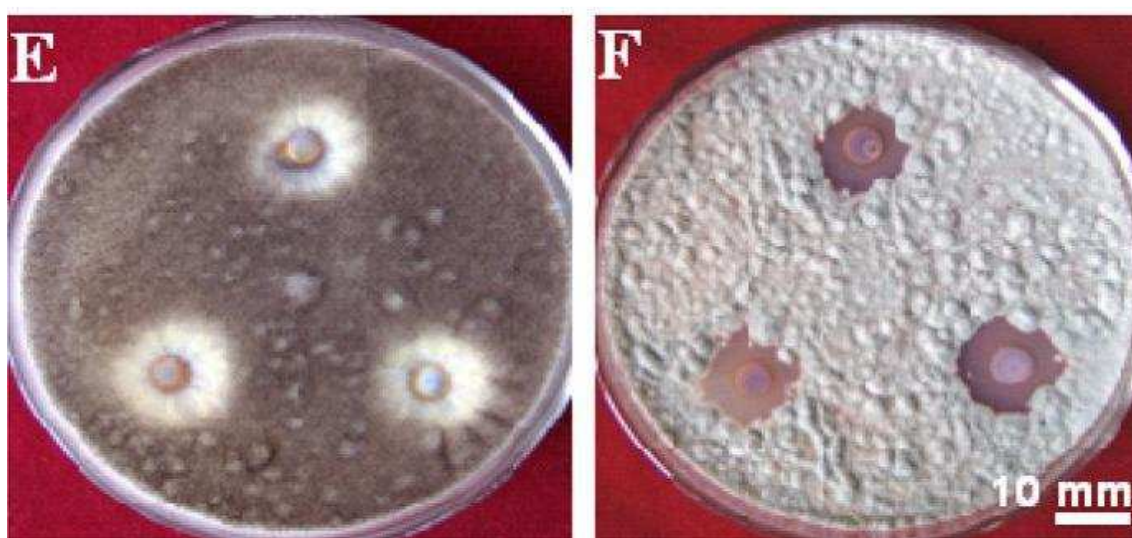
zjištěno, že AgNPs jsou schopné inhibovat produkci RNA a extracelulárních virionů hepatitidy B (Lu et al., 2008).

4.3 Antimykotické účinky

Vzhledem k omezenému množství antifungálních léčiv a možnosti vzniku rezistentních kmenů se jeví jako perspektivní výsledky některých studií, které prokázaly významnou aktivitu AgNPs proti vybraným původcům houbových onemocnění.

Nanočástice stříbra vykázaly významnou antifungální aktivitu proti houbě *Penicillium citrinum* produkující mykotoxin cytrin, který může poškozovat zejména ledviny. Současně byl významný účinek zaznamenán také u houby *Aspergillus niger*, jejíž některé kmeny produkují silný mykotoxin - ochratoxin A. Po aplikaci AgNPs byly pozorované zřetelné inhibiční zóny (Zhang et al., 2008).

Obr. 3 Inhibiční zóny AgNPs na *Aspergillus niger* a *Penicillium citrinum* (Zhang et al., 2008)



AgNPs vykázaly vysokou účinnost proti houbě *Trichophyton mentagrophytes*, což je dermatofyt vyvolávající mimo jiné těžké zánětlivé změny na kůži a také proti kvasince *Candida albicans*. Při porovnání s kontrolními vzorky, které byly vystavené účinkům fungicidní látky amfotericin B používané při léčbě vážných systémových infekcí, byly AgNPs podobně účinné. Při srovnání s účinky flukonazolu, používaného při léčbě povrchových kožních infekcí, pak AgNPs byly ještě silnější. V případě *Candida albicans* bylo zjištěno, že AgNPs působí výrazně inhibičně na mycelia (Kim et al., 2008).

Kim et al. zkoumali na *Candida albicans* antimykotické účinky a působení AgNPs a zjistili, že značná aktivita AgNPs spočívá v narušení struktury buněčné membrány a inhibici množení buněk pučením v důsledku destrukce integrity membrány (Kim et al., 2009).

Antifungální aktivita AgNPs byla hodnocena na *Candida albicans* také Panáčkem et al. a byl zaznamenán inhibiční účinek srovnatelný s běžnými antimykotickými látkami a v některých případech i lepší a to ve velmi nízké koncentraci (Panáček et al., 2009).

5 Působení stříbrných nanočástic na buňky a orgány

5.1 Protizánětlivé účinky

Stříbro je pro své protizánětlivé účinky využíváno již dlouho a to zejména ve formě sulfadiazinu stříbrného při léčbě popálenin. V této formě může ale jeho použití vést k alergickým reakcím a systémové toxicitě. Díky nanotechnologiím a zavádění AgNPs, jejichž vlastnosti jsou odlišné od původního stříbra, do lékařské praxe, by ale tyto nedostatky mohly být kompenzovány a navíc by se mohl snížit výskyt infekcí a hojení ran by se mohlo urychlit (Chen et al., 2006).

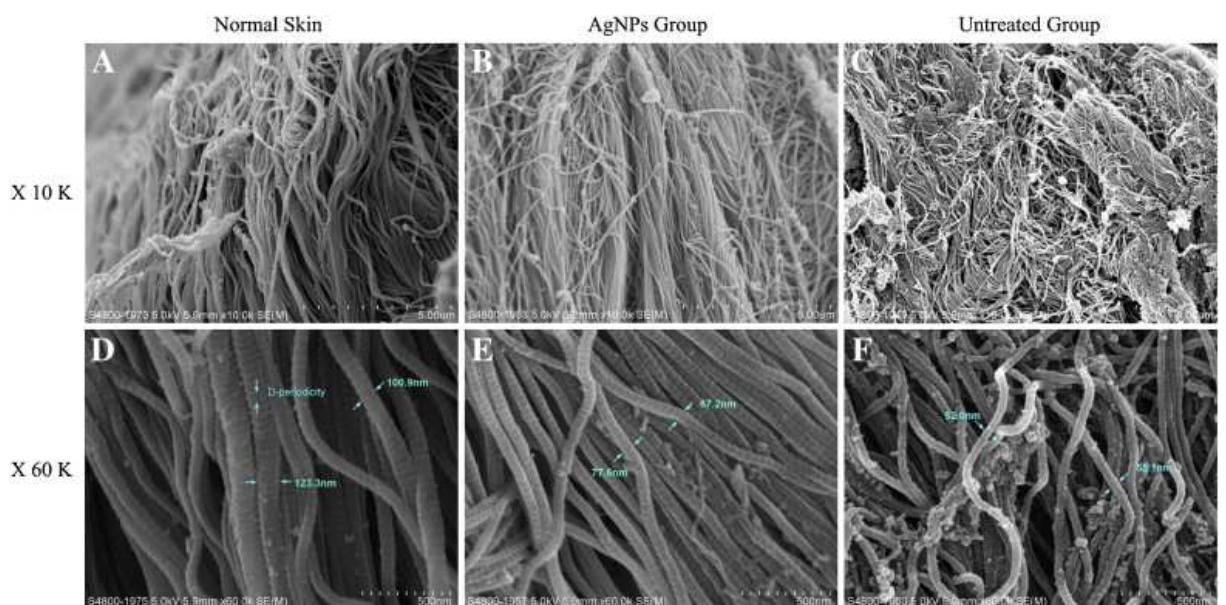
V současné době jsou v praxi používané obvazy s AgNPs, ale jsou stále vyvíjeny typy nové, které zlepšují hojení ran, což souvisí se silným protizánětlivým účinkem AgNPs. Takovým je například síťovaný chitosan (přírodní polymer – biodegradabilní nosič léčiva) se stříbrným povlakem, u kterého bylo prokázáno, že vykazuje vysoký antibakteriální účinek proti *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* (Niu et al., 2009). Byl vyvinut také b-chitin hydrogel obsahující AgNPs, u kterého byly potvrzeny baktericidní účinky a dobrá schopnost srážení krve. Dále bylo testováno začlenění stříbra do alginátových vláken (textilní materiál vyrobený z mořských řas) a bylo prokázáno, že se zvýšil antimikrobiální účinek a značně se zvýšila vazebná afinita k elastáze provázející probíhající zánět, matrix metaloproteáze 2 a prozánětlivým cytokinům (Wiegand et al., 2009).

Bylo zjištěno, že AgNPs snižují zarudnutí při kožních zánětech již během prvního dne léčby a tento příznivý efekt přetrvával v průběhu celého sledovaného období (Bhol et al., 2004). Významný protizánětlivý účinek byl zaznamenán v případě alergické kontaktní dermatitidy, kde AgNPs potlačily expresi TNF- α (tumor nekrotizující faktor alfa), IL-12 a indukovaly apoptózu u zánětlivých buněk a byl tak snížen edém a zarudnutí (Bhol et

Schechter, 2005). Potlačení produkce prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-8 a IL-12 bylo také prokázáno v případě kožního zánětu u prasat. Bylo provázené snížením otoku a zarudnutí a zvýšenou reepitalizací (Nadworny et al., 2010).

Zajímavý podpůrný potenciál AgNPs při hojení ran byl zjištěn při testech in vitro a in vivo. Ukázalo se, že AgNPs mohou být ve velké míře odpovědné za regulaci depozice kolagenu, u kterého by tak bylo možné dosáhnout lepšího prostorového uspořádání. Takto ošetřená kůže měla mechanické vlastnosti velmi podobné normální kůži oproti kůži neošetřené AgNPs, kde bylo uspořádání fibril nekontrolované a chaotické (Kwan et al., 2011).

Obr. 4 Fibrily kolagenu zobrazeny SEM (řádovací elektronový mikroskop). V menším zvětšení (x 10.000) bylo zjištěno, že uspořádání fibril u (A) normální a (B) AgNPs ošetřené skupiny bylo velmi podobné ve srovnání s (C) neošetřenou skupinou. Normální a AgNPs ošetřené skupiny měly více organizované struktury na rozdíl od volných a náhodně zarovnaných vláken neošetřeného vzorku. Ve větším zvětšení (x 60.000) byl hodnocen povrch vláken. Pravidelnost fibril kolagenu byla jasně viditelná, jak je patrné na normální kůži (D). Fibrily v neošetřeném vzorku byly zřetelně odlišné s nepravidelnou osnovou na rozdíl od ostatních skupin. Průměrná hodnota průměru vláken byla u (D) normální skupiny 104,3 nm, (E) ošetřené AgNPs 78,6 nm a u (F) neošetřené 64,8 nm (Kwan et al., 2011)

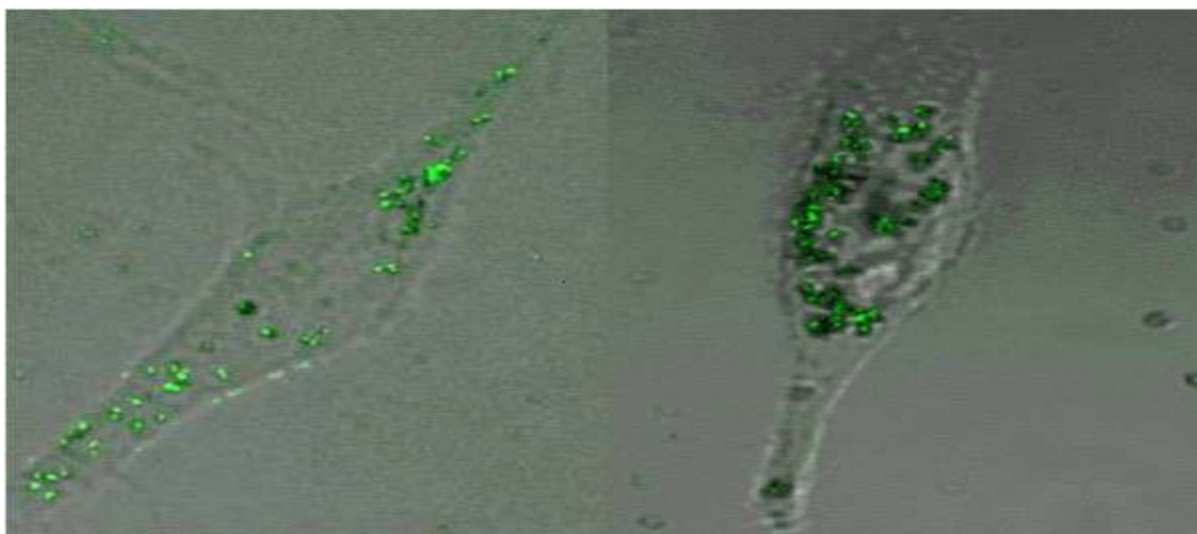


5.2 Cytostatické účinky

Nanotechnologie nabízí nový způsob, kterým by bylo možné zachytit nádor. Nanočástice by mohly buď přímo zabíjet nádorové buňky cestou navození fyziologické funkční poruchy a nebo by mohly být nosiči specifických látek. AgNPs tak mohou být potencionálními protinádorovými léky vzhledem k jejich možné cytotoxicitě vedoucí až k buněčné apoptóze a v schopnosti zabíjení buněk podobným způsobem jako chemoterapeutika. Těmito účinky se zabývala studie v případě lidského hepatocelulárního karcinomu (Bel-742) a C6 gliom buňky, která prokázala, že buňky s endocytovanými AgNPs vykazovali známky silného stresu včetně apoptózy a sekundární nekrózy. (Wang et al., 2010).

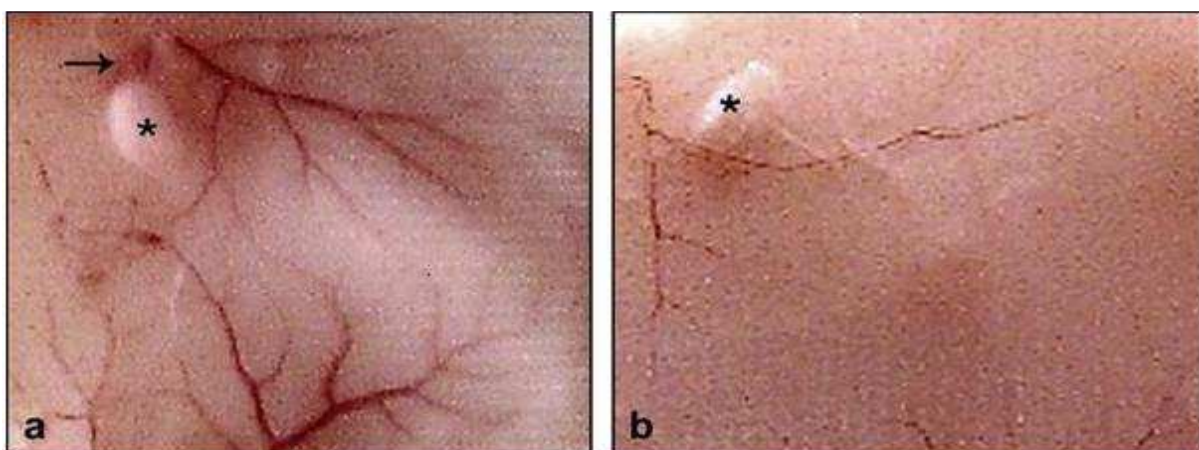
Další studie řešila interakci modifikovaných AgNPs, jejichž povrch byl upraven glukózou, laktózou, oligonukleotidy a jejich kombinací, a buněk A549 (rakovina plic). Výsledky ukázali, že použití sacharidů významně zvýšilo vychytávání AgNPs buňkami A549 a laktózou modifikované AgNPs vstoupili do těchto buněk rychleji. Bylo zjištěno, že pro buněčné vychytávání bylo důležitých prvních pět hodin. Studie rovněž poukázala na skutečnost, že přítomnost glukózy, laktózy a oligonukleotidu nebo jejich kombinace na povrchu AgNPs může pomoci ke snížení toxicity a studie také naznačila, že povrchovou úpravou by bylo možné dosáhnout víceúčelového využití AgNPs v medicíně. Prokázané výsledky by současně mohli pomoci vyvinout nové přístupy pro selektivní zabíjení rakovinných buněk (Sur et al., 2010).

Obr. 5 Nanočástice stříbra na buňkách zdravých (vlevo) a na buňkách A549 (vpravo) (Sur et al., 2010).



AgNPs mohou výrazně inhibovat angiogenezi, která je rozhodující fází v růstu nádoru, invazi a metastázování. Jsou také schopné inhibovat vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a kromě toho i účinně inhibují tvorbu nových krevních vlásečnic indukovaných VEGF. Při této studii byl proveden test vlivu AgNPs na angiogenezi in vivo, kdy po exogenní stimulaci angiogeneze Streptozotocinem byl pozorován významný nový růst krevních cév po šesti dnech, ale nebyla zjištěna žádná významná angiogenní reakce na AgNPs a současně Streptozotocin. Tvorba krevních cév indukovaná Streptozotocinem byla zcela zrušena v přítomnosti AgNPs. Studie tak poskytuje důkaz, že nanočástice nevstupují jen do pasivních interakcí s buňkami, ale mohou se i aktivně zapojit a zprostředkovat molekulární procesy, které jsou nezbytné pro regulaci buněčných funkcí (Gurunathan et al., 2009).

Obr. 6 Antiangiogenní aktivita AgNPs v in vivo pokusu s potkany. Fotografie ze 7. dne s Matrigelovými implantáty s kožními cévami na pozadí. Fotografie ukazují (a) vliv streptozotocinu bez AgNPs, (b) vliv streptozotocinu a AgNPs (Gurunathan et al., 2009)



5.3 Cytotoxicita stříbrných nanočástic

Unikátní vlastnosti AgNPs je předurčují pro využití v mnoha oblastech. Nicméně některé studie se zabývají i jejich nepříznivými účinky na organizmy a životní prostředí, které je nutné brát do úvahy při praktickém využívání nanočástic. Takovými jsou v případě dlouhodobé expozice i známé projevy v podobě šedomodře zbarvené kůže (argyrie) a pigmentace očí (argyrosis), které jsou způsobeny nevratným ukládáním stříbra (Panyala et al., 2008).

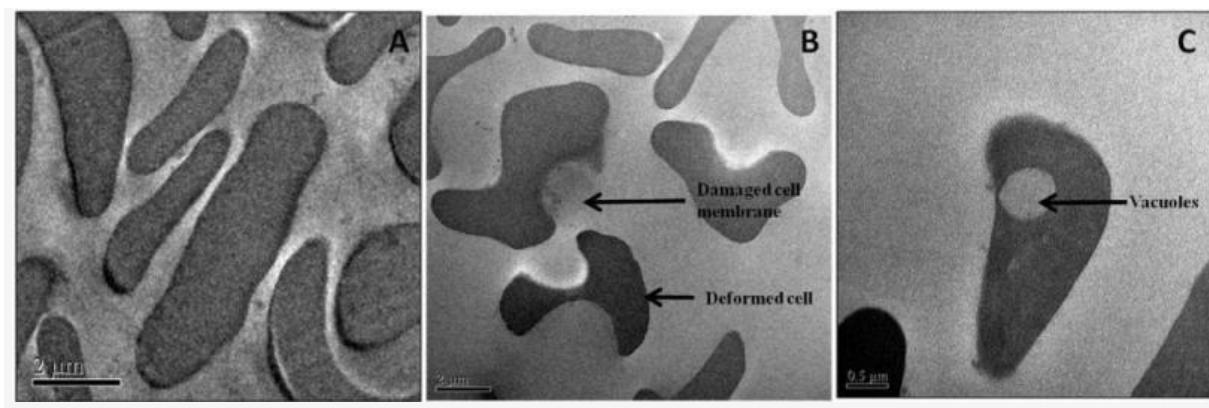
Ačkoliv některé studie dokládají, že AgNPs mohou vyvolat toxicitu, je třeba si uvědomit, že mnohé z nich jsou prováděny v podmínkách in vitro, které se velmi liší od podmínek in

vivo, a za použití vysokých koncentrací AgNPs (Prabhu et Poulos, 2012). Bylo také zjištěno, že toxicita nanočástic se výrazně zvyšuje během jejich skladování, neboť dochází k pomalému uvolňování iontů stříbra (Kittler et al., 2010).

Je třeba se také zabývat otázkou, proč mohou AgNPs mít nepříznivé účinky na mikroorganismy a eukaryotické buňky, ale přitom s odlišnou odpovědí na podobnou koncentraci AgNPs. Lze se domnívat, že vzhledem ke zjednodušené struktuře prokaryotických a nebuněčných mikroorganismů, mohou AgNPs snadno procházet buněčnou stěnou a zasáhnout tak DNA či RNA. Na rozdíl od nich mají eukaryotické buňky vícevrstvou membránu, která může působit jako bariéra. Ochrannou funkci může plnit také imunitní systém (You et al., 2012).

V konkrétní studii *in vitro* zaměřené na toxicitu AgNPs bylo zjištěno, že vystavení jaterních buněk potkanů expozici AgNPs i na nízké úrovni vyústilo v oxidační stres a omezení mitochondriální aktivity (Hussain et al., 2005)). S tvorbou reaktivních forem kyslíku a aktivací Jun N-terminální kinázy (JNK) byla spojena AgNPs indukovaná apoptóza, jak bylo sledováno v další studii (Hsin et al., 2010). K dispozici jsou také důkazy, že stříbro způsobuje časné změny v propustnosti buněčné membrány pro draslík a sodík v koncentracích, které draslík, sodík, ATP nebo mitochondriální aktivitu neomezují. Pravděpodobně je to výsledkem reverzebilní interakce stříbra se sulfhydrylovými skupinami membránových proteinů. Tyto změny mohou představovat počáteční cytotoxické účinky (Kone et al., 1988). Další studie uvádí, že AgNPs mohou mít významný cytotoxický účinek na proliferaci a expresi cytokinů mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) (Shin et al., 2007). Kromě již uvedeného mohou AgNPs způsobovat svými toxickými účinky poškození ledvin, podráždění očí, kůže, dýchacích cest a zažívacího traktu a změny krevních buněk (Panyala et al., 2008).

Obr. 7 Snímky z TEM (transmisivní elektronový mikroskop) krevních buněk, které ukazují účinek AgNPs: (A) normální krevní buňky z kontrolního souboru, (B) buňka deformovaná působením AgNPs a buňka s poškozenou membránou, (C) krevní buňky, ve kterých došlo působením AgNPs k velké vakuolizaci (Ghosh et al., 2012)



Pokud jde o působení AgNPs na DNA byl navržen možný mechanismus toxicity, který zahrnuje narušení mitochondriálního respiračního řetězce AgNPs, což vede k produkci ROS a přerušení syntézy ATP a to je příčinou poškození DNA. Předpokládá se, že poškození DNA je doplněno o ukládání, které je následované interakcí AgNPs s DNA, což vede k zastavení buněčného cyklu v G₂ fázi (Asharani et al., 2009). Stříbrné ionty mohou také vyvolat blokaci v G₁ fázi a při vyšších koncentracích kompletní blokádu v S fázi a indukci buněčné apoptózy (Park et al., 2010). Typickým důsledkem působení látek, které inhibují syntézu DNA je narušení buněčného cyklu, kterému předchází snížení životaschopnosti buněk, a pozdější inhibice růstu a akumulace buněk v S fázi, což vede k buněčné smrti (You et al., 2012).

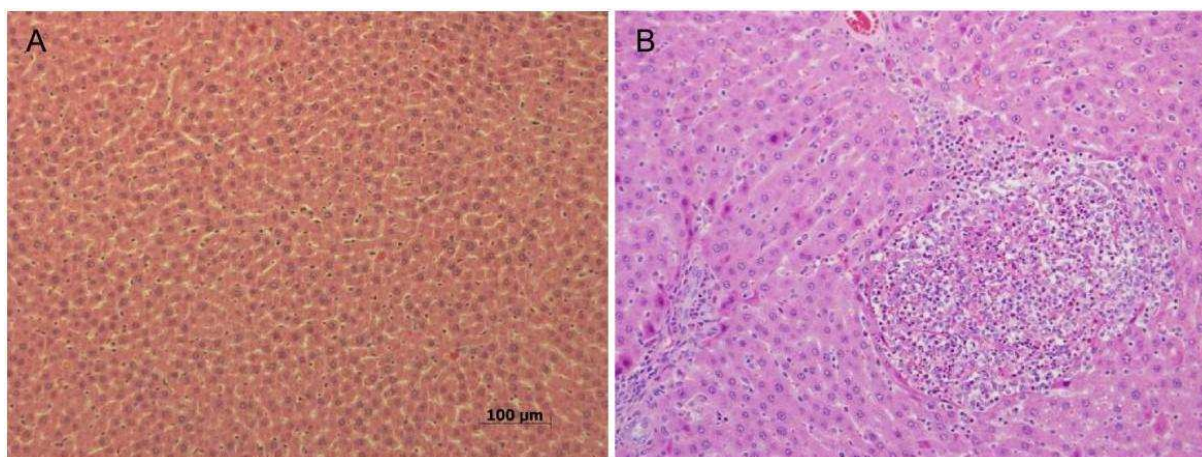
5.4 Distribuce a ukládání stříbrných nanočástic do buněk a orgánů

AgNPs by mohly potenciálně najít široké možnosti uplatnění. Je ale nutné se zabývat komplexně důsledky jejich používání, neboť rozsah jejich účinku zatím není zcela znám. Některé studie, které se zabývaly vlivem AgNPs na organismus, došly k závěru, že po vystavení organismu jejich účinkům mohou být negativně ovlivněny zejména játra, plíce, ledviny, mozek, slezina, cévní soustava a reprodukční orgány.

Hepatotoxické účinky byly doloženy v in vitro studii u potkanů. Bylo zjištěno, že AgNPs mohou vstupovat do jaterních buněk, ale větší množství AgNPs bylo přichyceno k povrchu buněčné membrány. V buňkách pak došlo k výraznému snížení funkce mitochondrií a byla

také porušena integrita buněk. Bylo zaznamenáno výrazné vyčerpání glutathionu (GSH) a zvýšení hladiny ROS. Tato zjištění naznačují, že k cytotoxickým účinkům u jaterních buněk dochází prostřednictvím oxidativního stresu (Hussain et al., 2005).

Obr. 8 Histopatologické nálezy v játrech: (A) kontrolní vzorek jater, (B) vícenásobná ohniska zánětlivých buněčných infiltrátů, včetně eosinofilů (zejména kolem centrální žíly a portální oblasti) (Kim et al., 2010)



Další častou cílovou tkání při déletrvající expozici mohou být plíce, a to nejen cestou inhalace AgNPs. V plicích byly AgNPs zaznamenány také po subkutánní aplikaci, po které byly nanočástice translokovány do oběhu a následně objeveny kromě plic i v dalších orgánech (Tang et al., 2009). V rámci inhalační studie došlo k zasažení plic, které mělo za následek pokles dechového objemu, minutového dechového objemu a k zánětlivé reakci, konkrétně k smíšené zánětlivé buněčné infiltraci a chronickému alveolárnímu zánětu (Sung et al., 2008). V další studii byla zkoumána plicní a systémová distribuce inhalovaných AgNPs a bylo sledováno, že obsah nanočástic v plicích se po inhalaci rychle snižuje a AgNPs byly následně detekovány v krvi, játrech, ledvinách a mozku (Takenaka et al., 2001). Existuje domněnka, že nanočástice se po inhalaci ukládají ve sliznici nosohltanu a následně jsou translokovány do mozku přes čichový nerv (Oberdoster et al., 2004). Bylo zjištěno, že po inhalační expozici došlo u myší genovou expresí ke změnám v mozku. Ukázalo se, že na AgNPs bylo celkem citlivých 468 genů v mozku a 952 genů v malém mozku. Vystavení mozku účinkům AgNPs upravilo expresi několika genů spojených s poruchami motorického neuronu, neurodegenerativním onemocněním a funkcí imunitních buněk, což může znamenat potenciální neurotoxicitu a imunotoxicitu (Lee et al., 2009).

Byl také zjišťován účinek na reprodukční orgány in vivo. Po podání AgNPs gravidním myším byla zjištěna snížená životaschopnost plodu (Philbrook et al., 2011). Podobně Li et al. (2010) doložili, že AgNPs indukovaly toxicitu u myších embryí ve stádiu blastocysty, snížily úspěšnost implantace a způsobily zpoždění ve vývoji po implantaci.

Další studie se zabývala účinkem AgNPs o velikosti 20 nm a 200 nm, které byly podány intravenózně potkanům a následně bylo provedeno histopatologické vyšetření. To odhalilo změnu cytoarchitektury semenotvorných kanálků ve varlatech a vakuolizaci v bazální části zárodečného epitelu. Studie naznačila, že tento jev zřejmě souvisí s velikostí nanočástic. Byla totiž pozorována akumulace AgNPs v mezibuněčném prostoru a to pouze o velikosti 200 nm a tím bylo potvrzeno již dřívější sledování, které odhalilo u větších částic menší schopnost pronikání do buněk (Gromadzka-Ostrowska et al., 2012).

Tato studie dále zjistila, že AgNPs o velikosti 20 nm způsobily poškození DNA v zárodečných buňkách, což ukázalo na snadnější vstup menších částic do buněk umocněný o snadnější uvolňování iontů z jejich povrchu. Nejvyšší poškození bylo sledováno 24 hodin po aplikaci a následně se snižovalo, což bylo pravděpodobně výsledkem odstranění AgNPs z organismu a také opravou poškozené DNA. Dále bylo sledováno snížení počtu spermií v nadvarlatech a zvýšení počtu abnormálních spermií, což naznačuje, že AgNPs jsou více toxické pro zralé spermie v nadvarlatech. Zajímavé je také zjištění, že akumulace AgNPs ve varlatech byla nižší než 1 % z dávky podané do krevního oběhu a to bez ohledu na velikost částic, což dokládá, že i malé množství může mít toxické účinky na zárodečné buňky a mít tak negativní vliv na reprodukční potenciál organismu (Gromadzka-Ostrowska et al., 2012).

Distribucí v organismu se zabývala studie u lidských dobrovolníků, ve které byly šedesáti zdravým jedincům perorálně podávány AgNPs. Následně byly provedeny metabolické testy a vyšetření magnetickou rezonancí (MRI). MRI nebyly shledány žádné morfologické nebo strukturální změny. Laboratorní rozbory nezjistily žádné klinicky významné změny u krevních hodnot včetně počtu erytrocytů, granulocytů, agranulocytů a trombocytů. Stříbro bylo detekováno v krevním séru, ale nebyly prokázány žádné významné metabolické nebo morfologické změny. Nebyly zaznamenány změny v hmotnosti, systolickém nebo diastolickém krevním tlaku. U celé testované skupiny se ale snížila srdeční frekvence a to o 2,3 tepů za minutu. Žádné významné změny nebyly nalezeny ani při kompletním vyšetření moči. Podáváním AgNPs se nepodařilo vyvolat detekovatelné změny v množství reaktivních forem kyslíku nebo prozánětlivých cytokinů zjišťovaných ve vzorcích sekretu dýchacích cest

na rozdíl od dřívějších studií, kdy byly AgNPs podávány inhalačně. Autoři to přičítají špatné absorpci AgNPs ve střevě a špatné translokaci těchto částic z gastrointestinálního traktu do dýchací soustavy (Munger et al., 2014).

6 Působení stříbrných nanočástic na organismus živočichů

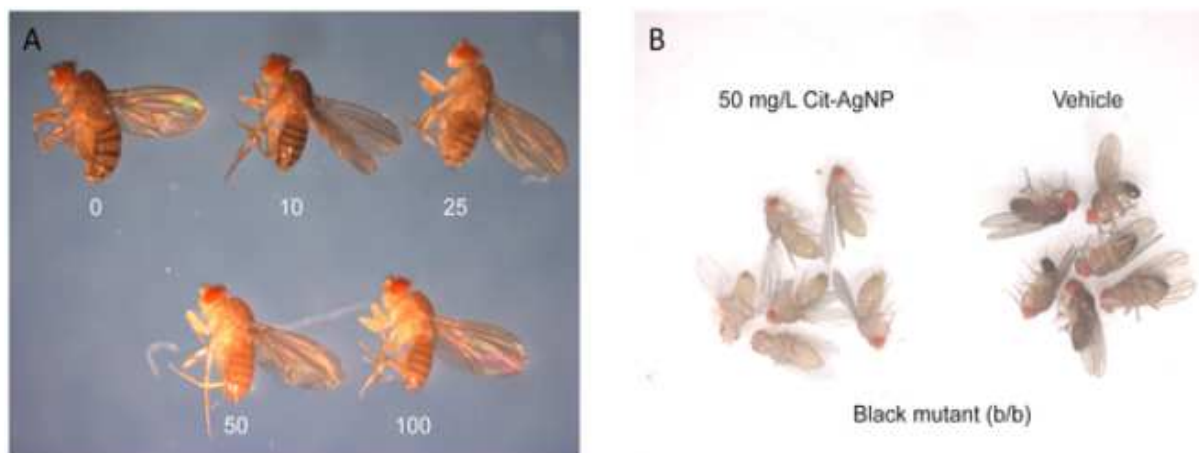
6.1 Účinky stříbrných nanočástic na organismus bezobratlých živočichů

Rychlé zavádění AgNPs nejen v oblasti medicíny, ale také do prostředků a výrobků denní potřeby může mít za následek nekontrolované šíření do životního prostředí. Jejich účinkům tak mohou být vystaveny i necílové organizmy a je proto potřebné zkoumat jak jsou ovlivněny působením nanočástic.

Proběhlo několik studií u bezobratlých živočichů, které se zabývali působením AgNPs. Lapiéd et al. (2010) zjišťovali jejich účinky u jedinců Žížaly obecné (*Lumbricus terrestris*), které vystavili expozici AgNPs ve vodě a v půdě. Sledovali pak zvýšenou apoptózu v řadě tkání, přičemž výsledky ukázaly sníženou biologickou dostupnost nanočástic v půdě oproti vodnímu prostředí.

Byl sledován vliv AgNPs na Octomilku obecnou (*Drosophila melanogaster*). Po celou dobu vývoje byly podávány nanočástice spolu s potravou. U dospělých jedinců pak bylo zjištěno, že AgNPs neměly žádný negativní vliv na přežití, ale u všech došlo ke ztrátě melaninového pigmentu a navíc došlo ke snížení schopnosti reprodukce. Pozorované následky byly pravděpodobně způsobeny účinkem AgNPs, nikoliv stříbrných iontů (Armstrong et al., 2013).

Obr. 9 Ztráta melaninového pigmentu u octomilek: (A) Octomilky vystavené účinkům AgNPs v různých koncentracích od embryonálního stádia. V případě vývoje a růstu při koncentraci 50 mg/l a vyšší došlo u všech dospělých octomilek ke ztrátě melaninového pigmentu. Přitom ale barva očí zůstala nezměněna, což naznačuje, že AgNPs selektivně zasahují do melaninové pigmentace. (B) Černí mutanti octomilky, u kterých se nadměrně hromadí melaninový pigment. Po expozici 50 mg/l AgNPs byl odstraněn všechen melaninový pigment z jejich těla (Armstrong et al., 2013)



V další studii byl po vystavení jedinců Octomilky obecné účinkům AgNPs prostřednictvím krmiva pozorován tepelný šok, oxidativní stres, poškození DNA a apoptóza (Ahamed et al., 2010). Posgai et al. (2011) sledovali dopad AgNPs po požití nanočástic na vývoj, úspěšnost páření a přežití u Octomilky obecné a vliv podaného vitamínu C. Zjistili, že po podání AgNPs s přídavkem vitamínu C došlo k dvojnásobnému nárůstu přežití testovaných octomilek oproti octomilkám, které dostávaly AgNPs bez vitamínu C, a trojnásobnému nárůstu úspěšnosti při páření. Vitamín C rovněž zabránil poškození kutikuly a vzniku pigmentových defektů.

6.2 Účinky stříbrných nanočástic na organismus vodních živočichů

Ve vodním prostředí jsou organismy vystaveny působení AgNPs ještě ve větší míře, neboť jejich přenos je zde usnadněn, nicméně expozice může být velmi variabilní. Zároveň je v tomto prostředí více možností příjmu nanočástic organismem.

Při dlouhodobé studii prováděné na mořské škebli *Potamocorbula amurensis* v místě jejího výskytu byla v jejích tkáních opakovaně nalezena vysoká koncentrace stříbra, které

pocházelo z antropogenní činnosti. Studie zjišťovala vliv stříbra na reprodukční aktivitu a došla k závěru, že uvolněné iontové stříbro vedlo ke sterilitě škeblí (Brown et al., 2003).

Dále byl sledován *Scrobicula plana*. Tento mlž byl vystaven roztoku o nízké koncentraci 10 µg/l. Nanočástice o velikosti 40 nm působily na organismus jednak přímo prostřednictvím vodního prostředí a také byly dodávány potravou. Bylo zjištěno, že AgNPs se ukládaly do všech tkání, ale celkový vliv na stav organismu nebyl při uvedené koncentraci takový, aby ovlivnil životaschopnost těchto mlžů (Buffet et al., 2013).

Asghari et al. (2012) zkoumal vliv AgNPs na jedince Hrotnatky velké (*Daphnia magna*), které vystavoval účinkům nanočástic o velikosti 20 nm získaných chemickou syntézou. Bylo zjištěno ukládání AgNPs v organismu a to zejména v trávicím systému a byla zaznamenána mortalita u 5 % jedinců. Oproti tomu se jeví biologická syntéza, při které byl použit extrakt z listů Pepřovníku betelového (*Piper betle*), jako méně toxická, neboť nebyla zjištěna žádná mortalita (Pathipathi and Rajasekharreddy, 2011).

Obr. 10 Ukládání AgNPs v organismu Hrotnatky velké (*Daphnia magna*) je patrné v podobě tmavého zabarvení a tmavých skvrn v trávicím systému (Asghari et al., 2012)



Vliv AgNPs byl zkoumán u modelového organismu Medaky japonské (*Oryzias latipes*). U raných vývojových stádií bylo sledováno množství očních vad a změny ve vývoji středního mozku, kde je zrakové centrum. Expozice AgNPs vyvolala také řadu morfologických vad jako abnormality ploutví, srdeční vady, abnormality na páteři a také docházelo ke krvácení a tvorbě krevních sraženin. V rámci této studie byl proveden test akutní toxicity a byla

sledována letální koncentrace AgNPs s dobou působení 48 hodin. 50 % úhyn dospělých jedinců Medaky japonské způsobila koncentrace 1,03 mg/l nanočástic o velikosti 20 – 37 nm. Při koncentraci 2,0 mg/l pak došlo k úhynu všech embryí (Wu et al., 2009).

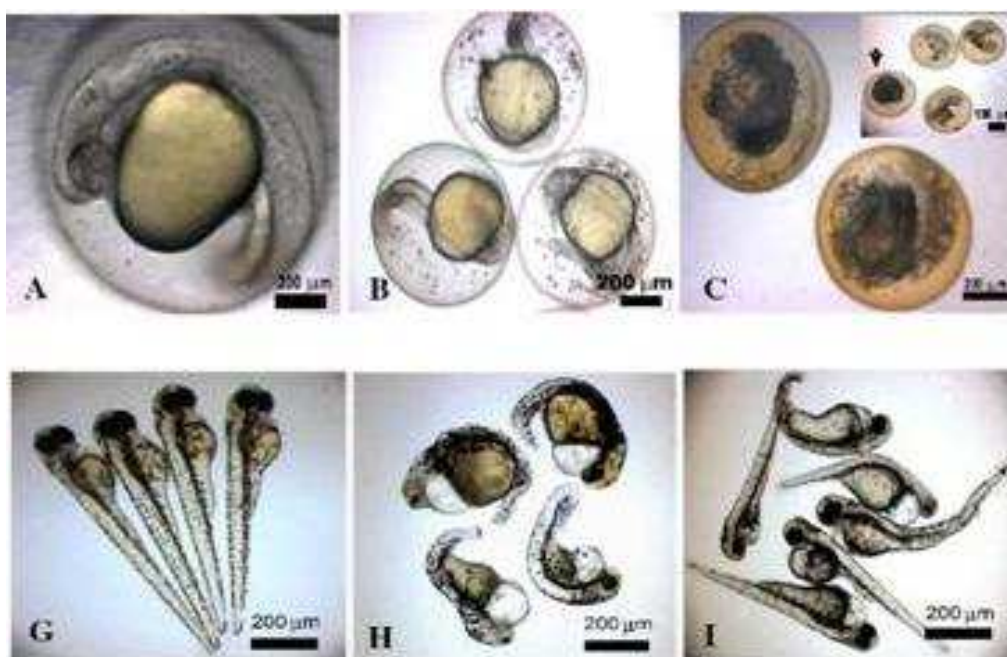
U Medaky japonské (*Oryzias latipes*) byla také sledována hladina metalothioneinu, který je syntetizován v reakci na přítomnost kovových iontů, které následně váže a působí tak detoxikačně. Bylo zjištěno, že po jednodenním působení AgNPs při koncentraci 25 µg/l došlo k šestinásobnému zvýšení exprese metalothioneinu. K syntéze metalothioneinu v játrech ale docházelo jen po omezenou dobu a po několika dnech se jeho hladina vrátila na bazální úroveň (Chae et al., 2009).

Byla zjišťována i hladina enzymu CYP1A, který se podílí na detoxikaci. Po vystavení Medaky japonské (*Oryzias latipes*) vlivu AgNPs byl zaznamenán až čtyřnásobný nárůst hladiny CYP1A, nicméně podobně jako u metalothioneinu se množství CYP1A vrátilo po několika dnech působení AgNPs na původní hodnoty (Chae et al., 2009).

Dalším zkoumaným modelovým organizmem byla ryba Danio pruhované (*Danio rerio*). Byla posuzována hepatotoxicita AgNPs u dospělých jedinců. Choi et al. (2009) sledovali oxidační stres a apoptózu v jaterní tkáni a zjistili zvýšení hladiny malondialdehydu, který je produktem peroxidace lipidů, a také zvýšené množství antioxidantu glutathionu. Zároveň byl pozorován úbytek enzymových antioxidantů. Byl také zjištěn metalothionein 2, což naznačuje, že došlo k uvolnění stříbrných iontů z AgNPs. Při histologické analýze jaterní tkáně bylo pozorováno porušení jaterních buněk a apoptické změny.

Studii účinků AgNPs na tuto rybu prováděl i Asharani et al. (2008). Použity byly nanočástice stabilizované škrobem a nanočástice stabilizované BSA (bovinní sérový albumin). V souvislosti se zvyšováním koncentrace došlo k nárůstu mortality embryí a k opožděnému líhnutí plodu. Transmisní elektronovou mikroskopií byla prokázána distribuce AgNPs do mozku, srdce a krve embryí. Byly pozorovány fenotypové deformity jako abnormální tělesná osa, stočený notochord a také pomalý průtok krve a srdeční arytmie. Byla prokázána zvýšená apoptóza u embryí vystavených účinku nanočástic.

Obr. 11 Embrya a larvy *Dania pruhoanáho* (*Danio rerio*) vystavené úèinkùm AgNPs: (A) kontrolní vzorek, (B) embrya vystavená AgNPs stabilizovaným BSA o koncentraci 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 24 hodin, (C) embrya pod vlivem AgNPs-BSA o koncentraci 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 48 hodin, (G) kontrola, (H) larvální stádium vystavené AgNPs stabilizovaným škrobem o koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 72 hodin, (I) larvy ovlivné AgNPs-BSA o koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 72 hodin (Asharani et al., 2008)



U Okouna říèního (*Perca fluviatilis*) byl sledován vliv AgNPs o velikosti 81 nm na vznik respiraèního stresu. Byla hodnocena míra bazálního metabolismu (BMR) a kritická tenze kyslíku P (crit), pod kterou si ryby nemohou udržovat aerobní metabolismus. Bylo zjištěno, že nanočástice neměly žádný vliv na BMR, ale byl významně zvýšen P (crit) a to o 50 %, což znamenalo, že vystavení ryb účinku AgNPs snížilo významně toleranci k hypoxii (nedostatek kyslíku pro tělesný metabolismus) (Bilberg et al., 2010).

6.3 Úèinky stříbrných nanočástic na organizmus savců

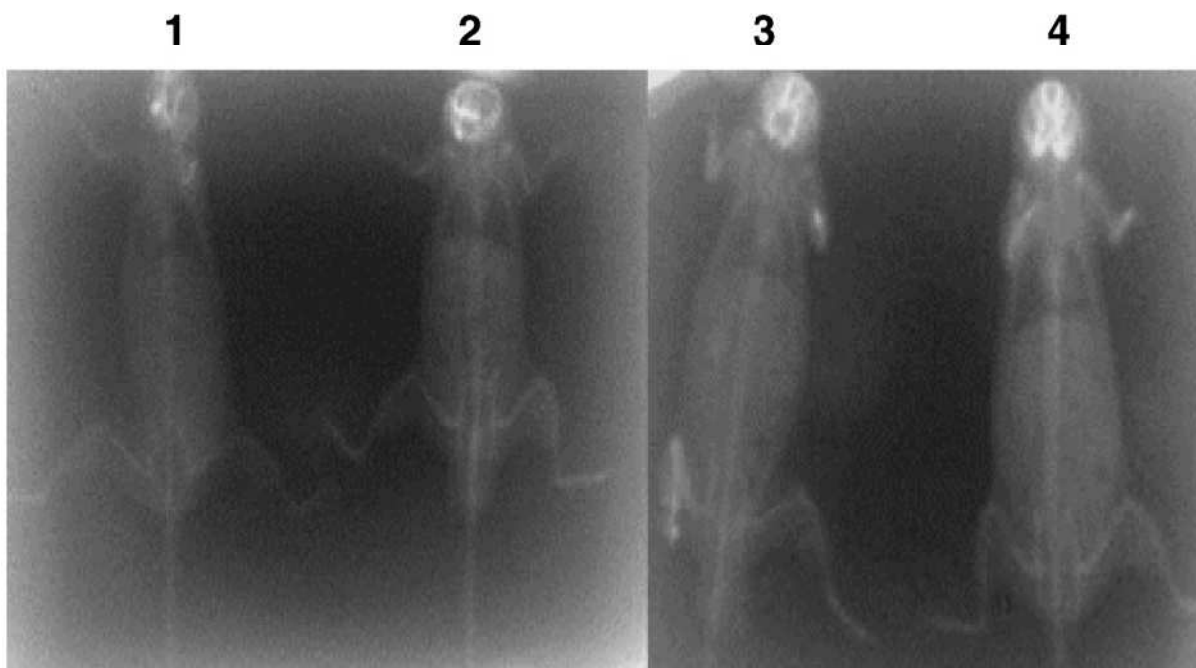
U potkanů byl sledován vliv AgNPs podávaných orálně 90 dní. Potkani byli rozděleni do čtyř skupin, ve kterých byli vždy samci i samice. První skupina byla kontrolní, druhé byly podávány nanočástice o velikosti 56 nm v nízké dávce 30 mg/kg, další skupina dostávala střední dávku 125 mg/kg a poslední vysokou dávku 500 mg/kg. Již po 30 dnech expozice došlo k výraznému poklesu tělesné hmotnosti samců, i když nebyly zjištěny žádné významné

změny v příjmu potravy a vody v rámci sledovaného období. Na konci studie byla sledována hmotnost orgánů a v případě samců, kteří byli vystaveni dávce 500 mg/kg, bylo zjištěno zvýšení hmotnosti varlat. U všech skupin samic pak bylo sledováno dvojnásobné množství akumulovaného stříbra v ledvinách oproti samcům, což ukazuje na významný rozdíl v distribuci nanočástic v závislosti na pohlaví. Dále bylo zjištěno na dávce závislé zvýšení obsahu stříbra ve střevních klcích a v krvi, což dokládá, že orálně podávané AgNPs mohou vstupovat do krevního oběhu a mohou být distribuovány do dalších orgánů. Významné změny v závislosti na dávce byly sledovány u alkalické fosfatázy a cholesterolu u samců i samic a to naznačilo, že expozice dávkou AgNPs nad 125 mg/kg může mít za následek poškození jater. Histopatologickým vyšetřením byl prokázán vyšší výskyt hyperplazie žlučovodu a v některých případech výskyt nekrózy a fibrózy. V rámci tohoto experimentu byla provedena také inhalační studie. Během ní byli v průběhu 90 dní potkani vystaveni účinkům AgNPs o velikosti 18 nm. Bylo zjištěno, že po inhalaci byly cílovými orgány plíce a játra. Nálezy byly shodné u samic i u samců potkanů. V obou případech se společným cílem stala játra, což vzhledem k odlišné velikosti nanočástic naznačuje, že distribuce a toxicita není v některých případech závislá na velikosti částic nebo způsobu podávání (Kim et al., 2010).

Na myších byla studována distribuce a toxicita AgNPs v montmorillonitu, který sloužil jako nosič stříbrných nanočástic o velikosti 37 nm. Nanočástice byly aplikovány myším injekčně během 4 dní. Během sledovaného období nebyly zjištěny žádné rozdíly v hmotnosti mezi exponovanými jedinci a kontrolní skupinou ani jiné abnormality. Pro sledování toxicity byl proveden biochemický rozbor krve a byla zjištěna zvýšená hladina cholesterolu, cukru a bílkovin bez závislosti na množství aplikovaného stříbra. Došlo ke snížení u sodných a chloridových iontů, vápníku a draslíku v krvi. V moči bylo zjištěno snížení koncentrace močoviny, cukru, bílkovin a kreatinu v případě vyšších dávek stříbra. Bylo zaznamenáno pronikání stříbra do všech tkání v porovnání s kontrolní skupinou. AgNPs byly detekovány zejména v plicích, mozku, játrech, ledvinách, slezině a srdci. V případě mozku se účinek nanočástic po proniknutí přes hematoencefalickou bariéru projevil dvojnásobným množstvím glutamin syntetázy, která je důležitá mimo jiné pro neurotransmisi. Přesto se v průběhu sledovaného období neprojevíly žádné výrazné změny v chování myší. Nanočástice stříbra byly dále pozorovány v ledvinách, ale už ne v moči. Důvodem byla pravděpodobně neprůchodnost nanočástic glomerulární filtrací vzhledem k jejich velikosti. Byla zaznamenána hemaglutinace, ale bez imunitní odpovědi. Příčinou mohlo být ložisko, které se vytvořilo v místě vpichu, odkud bylo stříbro pomalu uvolňováno. V této studii bylo ukázáno, že AgNPs

mohou být potenciální alternativou pro přenos léků do orgánů a zejména do mozku (Daniel et al., 2010).

Obr. 12 Rentgen celého těla myši: (1) kontrola, (2) po injekci montmorillonitu, (3) po injekci nízké dávky AgNPs v montmorillonitu, (4) a vysoké dávky (Daniel et al., 2010)



V další studii byla analyzovaná potenciální akutní a subchronická dermální toxicita AgNPs na morčatech. Samci morčat o hmotnosti 350 až 400 g byli vystaveni nanočásticím o rozměrech menších než 100 nm. Při testování akutní toxicity byly použity koncentrace 1 000 a 10 000 $\mu\text{g/ml}$ a při testování subchronické toxicity 100, 1 000 a 10 000 $\mu\text{g/ml}$. Následně bylo provedeno klinické a histopatologické vyšetření a bylo provedeno srovnání s kontrolní skupinou. Pitvou nebyly zjištěny u zvířat testovaných na akutní toxicitu změny ve hmotnosti orgánů nebo závažné makroskopické změny. Abnormality byly ale pozorovány na kůži, játrech a slezině. U skupiny morčat, která byla testována na subchronickou toxicitu, byly nalezeny větší tkáňové abnormality (Korani et al., 2011).

U myši byla provedena srovnávací studie cytotoxicity obvazů na bázi stříbra. Byl sledován účinek pěti komerčně dostupných obvazů (Acticoat, Aquacel Ag, Contreet Foam, PolyMem Silver, Urgotul SSD), neboť existují značné rozdíly ve struktuře, složení a obsahu stříbra u těchto výrobků. Výsledky ukázaly významnou cytotoxicitu výrobků Acticoat, Aquacel Ag a Contreet Foam na keratinocyty a fibroblasty. Při procesu hojení pak Acticoat a Contreet Foam vykazovaly silnou inhibici reepitelizace. Tato zjištění mohou částečně

vysvětlovat v lékařské praxi pozorované opožděné hojení ran nebo inhibici reepitelizace při používání některých obvazů (Burd et al., 2007).

Jiná studie se zabývala cytotoxickými účinky AgNPs o velikosti 45 nm na koronární endoteliální buňky a vlivem nanočástic na regulaci tonusu aortálních chlopní. Bylo zjištěno, že při nízké koncentraci nanočástic docházelo k inhibici proliferace. Při vysokých koncentracích byla proliferace stimulována. V případě aortálních chlopní bylo sledováno, že nízká koncentrace nanočástic vyvolala vazokonstrikci a vysoká naopak vazodilataci. Studie tak ukázala, že AgNPs mají specifické a selektivní účinky na cévní endotel v závislosti na koncentraci (Rosas-Hernández et al., 2009).

Během klinické studie s králíky byla sledována míra pooperačních komplikací při použití endoprotézy se stříbrným povrchem. V praxi dochází při těchto operacích k problémům s infekcemi až v 35 % případů a to i přes použití systémové a lokální antibiotické profylaxe. Cílem studie bylo prozkoumat antimikrobiální účinnost a možné vedlejší účinky takto upravených endoprotéz po infikování králíků bakterií *Staphylococcus aureus*. Byla sledována významně nižší míra infekce a to o 40% oproti kontrolní skupině. Analýza koncentrace stříbra v orgánech ukázala zvýšený obsah v játrech a ledvinách, ale během této tříměsíční studie na nich nebyly pozorovány degenerativní změny (Gosheger et al., 2004).

7 Oblasti využití stříbrných nanočástic

7.1 Využití stříbrných nanočástic v lékařství

AgNPs mají velký potenciál a možnosti jejich využití v medicíně jsou na vzestupu. Nanočástice jsou již využívány v některých lékařských oborech a do dalších budou zaváděny v nejbližší době.

7.1.1 Stříbrné nanočástice používané v lékařské praxi

Pro medicínské aplikace je zajímavým antimikrobiálním činidlem HyMedic, který inhibuje růst gramnegativních a grampozitivních bakterií, plísní i kvasinek. Dlouhotrvající antimikrobiální účinek je zajištěn kontinuálním, ale přitom pomalým uvolňováním iontů stříbra, které tak nemají cytotoxické účinky. Antimikrobiální aktivita se nemění ani vlivem ultrafialového světla nebo po chemickém čištění. HyMedic je vhodný pro řadu aplikací jako například do katétrů, ortopedických protéz, kostních cementů, ve stomatologii pro zubní

výplně a prozatímní náhrady. HyMedic je vhodný pro dlouhodobé použití (Wijnhoven et al., 2009).

V anesteziologii jsou používány katétry se stříbrem pro aplikaci lokálních anestetik. Při intubacích mohou být použity postříbřené endotracheální trubice. Takovou je například endotracheální trubice Agento, u které bylo prokázáno snížení rizika infekce o 48% do 10 dní po intubaci. V případě centrálního žilního katétru Multicath Expert je stříbro vázáno na inertní keramický materiál, přičemž elektrolyty v tělní tekutině reagují se stříbrem a to způsobuje jeho pomalé kontrolované uvolňování v malém množství, které udržuje na povrchu antimikrobiální účinek. V urologii a nefrologii se používají katétry pro dialýzu a katétry urinární. Takovým katétrem je například Bardex s hydrogelovým povrchem, který umožňuje plynulejší vkládání a lepší komfort pro pacienta. Hydrogel má schopnost absorbovat tekutinu, čímž se vytváří hydrofilní vrstva mezi povrchem katétru a močovou trubicí. Pro potřeby kardiologie byla vyvinuta baterie se stříbrem pro napájení implantabilních kardioverter-defibrilátorů, což jsou přístroje používané k detekci a přerušení život ohrožujících arytmií (Wijnhoven et al., 2009).

Množství produktů s AgNPs je používáno při léčbě otevřených ran a popálenin. Takovým je známý Acticoat, který je ale doporučeno používat jen při infekci, neboť může působit značně cytotoxicky. Poměrně široké využití mají obvazy Silverlon, které mohou být používány při léčbě dekubitů, bércových vředů, diabetických vředů, traumatických a chirurgických ran a popálenin prvního a druhého stupně. Silverlon urychluje granulaci rány a její uzavírání až o 40 %, zmenšuje riziko infekce, bolest a může být používán až 7 dní. Svými účinky tak snižuje celkové náklady na léčbu. Existují také Silverlon popáleninové rukavice, které jsou ideální pro použití ihned po úrazu. Umožňují zachovat rozsah pohybu díky své pružnosti (Wijnhoven et al., 2009).

7.1.2 Ověřované možnosti využití AgNPs v medicínských aplikacích

I v dalších oborech medicíny najdou AgNPs uplatnění. Je zkoumána možnost povlaku kontaktních čoček v oftalmologii, v chirurgii by pak nanočásticemi mohly být ošetřeny roušky nebo pláště. V oblasti zobrazovacích metod jsou vyvíjeny nanokompozity stříbra a dendrimeru pro značení buněk nebo nanokoule s fluoreskujícím jádrem pro zobrazování buněk (Wijnhoven et al., 2009).

Je také zkoumána možnost použití AgNPs při transportu léčiv. Dutá transportní mikrokapsule má na povrchu stříbrné nanočástice a je otvírána vzdáleným laserovým paprskem (Wijnhoven et al., 2009)

Obr. 13 Otvírání transportní mikrokapsule laserovým paprskem: (a) 0 sekund, (b) 5 sekund, (c) 15 sekund (Bukreeva et al., 2006)



7.2 Ostatní možnosti využití stříbrných nanočástic

Nanočástice mají svou budoucnost v mnoha oblastech života. V současné době jsou již využívány v textilních výrobcích a to v povlečení, ručnicích, ponožkách, spodním prádle a plyšových hračkách. Dále jsou součástí antibakteriálních povrchů obalů potravin, v lednicích, nádobí, dětských lahvích a také jsou součástí dezinfekčních prostředků, tělových krémů, zubních kartáčků, past a šampónů. Pro domácnosti jsou pak vyráběny čistící prostředky s AgNPs, nátěrové hmoty, nesmáčivé a samočistící povrchy, vodovodní kohoutky, vzduchové filtry apod. Některé z uvedených výrobků by bylo možné použít i v chovu zvířat jako například nátěrové hmoty.

8 Závěr

Stříbrné nanočástice by mohly být významným přínosem při vyvíjení nových léků a medicínských aplikací. Jejich působení a vlastnosti byly testovány v mnohých studiích a s různým zaměřením. Jednotlivé poznatky je poměrně těžké porovnávat, neboť nanočástice v jednotlivých studiích se mohou lišit způsobem přípravy, tvarem, velikostí, koncentrací a povrchovou úpravou.

Rozsah jejich účinků ale rozhodně stojí za pozornost. Významné jsou jejich antimikrobiální účinky, které by mohly hrát důležitou roli v řešení problémů s antibiotickou rezistencí a také v případě nebezpečných virových onemocnění. Zajímavá je i schopnost proniknutí přes hematoencefalickou bariéru. Přínosem mohou být při hojení ran.

Současně je nutné zabývat se i jejich negativním působením. V mnohých případech předbíhá praktické zavádění nanočástic výzkum. Při nekontrolovaném šíření stříbrných nanočástic v životním prostředí lze jen těžko odhadovat následky. I když mohou být nanočástice pro svou možnou toxicitu použity v indikovaných případech jen po omezenou dobu, aby měly zdravotní přínos, i tehdy existuje možnost, že budou zasaženy necílové organismy. Ohroženy tak mohou být zejména nižší organismy, neboť obecně přijímaným faktem je, že toxicita stříbra rychle klesá s rostoucí složitostí organismu.

Je patrné, že bude třeba ještě provést řadu studií, abychom stříbrné nanočástice lépe poznali.

9 Seznam literatury

Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T. J., Nielsen, M., Hussain, S.M., Rowe, J. J. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster* [online]. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1 February 2010 [cit. 2014-28-03]. Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X09004542>>

Armstrong, N., Ramamoorthy, M., Lyon, D., Jones, K., Duttaroy, A. Mechanism of Silver nanoparticles Action on Insekt Pigmentation Reveals Intervention of Copper Homeostasis [online]. *Plos One*. January 07, 2013 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z.

<<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0053186>>

Asghari, S., Johari, S. A., Lee, J. H., Kim, Y. S., Jeon, Y. B., Choi, H. J., Moon, M. C., Yu I. J. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna* [online]. *Journal of Nanobiotechnology*. 2012 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://www.jnanobiotechnology.com/content/10/1/14>>

Asharani, P. V., Low, K. M. G., Hande, M. P., Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells [online]. *ACS Nano*. 2009 Feb 24 [cit. 2014-26-03].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236062>>

Asharani, P. V., Wu, Y. L., Gong, Z., Valiyaveetil, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models [online]. *Nanotechnology*. 2008 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://iopscience.iop.org/0957-4484/19/25/255102>>

Bhol, K. C., Schechter, P. J. Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis [online]. *The British Journal of dermatology*. 2005 Jun [cit. 2014-14-03]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15948987>>

Bilgerg, K., Malte, H., Wang, T., Baatrup, T. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) [online]. *Aquatic Toxicology*. 2010 Jan 31 [cit. 2014-28-03]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923013>>

Brown, C. L., Parchaso, F., Thompson, J. K., Luoma, S. N. Assessing toxicant effects in a complex estuary: A case study of effects of silver on reproduction in the bivalve, *Potamocorbula amurensis*, in San Francisco Bay [online]. *Human and Ecological Risk Assessment*. February 1, 2003 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://pubs.er.usgs.gov/publication/70025882>>

Buffet, P.-E., Pan, J.-F., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Gaudin, P., Faverney, Ch. R.-D., Guibbolini, M., Gilliland, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C. Biochemical and behavioural responses of the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* to silver nanoparticles in seawater and microalgal food [online]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1 March 2013 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651312004393>>

Bukreeva, T. V., Parakhonsky, B. V., Skirtach, A. G., Susha, A. S., Sukhorukov, G. B. Preparation of polyelectrolyte microcapsules with silver and gold nanoparticles in a shell and the remote destruction of microcapsules under laser irradiation [online]. *Crystallography Reports*. September – October 2006 [cit. 2014-08-04].

Dostupné z <<http://link.springer.com/article/10.1134%2FS1063774506050178>>

Burd, A., Kwok, C. H., Hung, S. C., Chan, H. S., Gu, H., Lam, W. K., Huang, L. A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressing is monolayer cell, tissue explant, and animal models [online]. *Wound repair and regeneration*. 2007 Jan-Feb [cit. 2014-08-04]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244325>>

Daniel, K. S. C. G., Tharmajar, V., Sironmani T. A., Pitchumani, K. Toxicity and immunological activity of silver nanoparticles [online]. *Applied Clay Science*. May 2010 [cit. 2014-08-04].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131710000682>>

Dibrov, P., Dzioba, J., Gosink, K. K., Hase, C. C. Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag⁺ in *Vibrio Cholerae* [online]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Aug 2002 [cit. 2014-07-03]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC127333/>>

Elechiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H. H., Yacaman, M. J. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1 [online]. *Journal of Nanobiotechnology*. 2005 [cit. 2014-14-03].

Dostupné z <<http://www.jnanobiotechnology.com/content/3/1/6>>

Galdiero, S., Falanga, A., Vitiello, M., Cantisani, M., Marra, V., Galdiero, M. Silver nanoparticles as potential antiviral agents [online]. *Molecules*. 2011, 16 (10) [cit. 2014-14-03]. Dostupné z <<http://www.mdpi.com/1420-3049/16/10/8894>>

Ghodake, G., Lim, S.-R., Lee, D. S. Casein hydrolytic peptides mediated green synthesis of antibacterial silver nanoparticles [online]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013 [cit. 2014-07-03]. Dostupné z

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776513001756>>

Ghosh, M., J M., Sinha, S., Chakraborty, A., Mallick, S. K., Bandyopadhyay, M., Mukherjee, A. In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles [online]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 12 December 2012 [cit. 2014-26-03].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571812002744>>

Gosheger, G., Harges, J., Ahrens, H., Streitburger, A., Buerger, H., Erren, M., Gonsel, A., Kemper, F., Winkelmann, W., Eiff, C. v. Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model-an analysis of the infection rate and toxicological side effects [online]. *Biomaterials*. November 2004 [cit. 2014-08-04].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961204000092>>

Gromadzka-Ostrowska, J., Dziendzikowska, K., Lankoff, A., Dobrzyńska, M., Instanes, Ch., Brunborg, G., Gajowik, A., Radzikowska, J., Wojewódzka, M., Kruszewski, M. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats [online]. *Toxicology Letters*. 15 November 2012 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427412012842>>

Guranathan, S., Lee, K.-J., Kalishwaralal, K., Sheikpranbabu, S., Vaidyanathan, R., Eom, S. H. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles [online]. *Biomaterials*. October 2009 [cit. 2014-26-03].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961209008357>>

Hussain, S. M., Hess, K. L., Gearhart, J. M., Geiss, K. T., Schlager, J. J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells [online]. *Toxicology in Vitro*. October 2005 [cit. 2014-26-03].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233305001268>>

Hsin, Y. H., Chen, C. F., Huang, S., Shih, T. S., Lai, P. S., Chueh, P. J. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells [online]. *Toxicology Letters*. 10 July 2008 [cit. 2014-26-03].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427408001252>>

Chae, Y. J., Pham, C. H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., Gu, M. B. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [online]. *Aquatic Toxicology*. 4 October 2009 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X09002550>>

Chen, X., Schluesener, H.J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application [online]. *Toxicology Letters*. 2008 Jan 4 [cit. 2014-21-02].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427407009769>>

Chen, N., Zheng, Y., Yin, J., Li, X., Zheng, C. Inhibitory effects of silver nanoparticles against adenovirus type 3 in vitro [online]. *Journal of Virological Methods*. 2013 Nov [cit. 2014-14-03]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23886562>>

Chen, J., Han, C. M., Lin, X. W., Tang, Z. J., Su, S. J. Effects of silver nanoparticles dressing on second degree burn wound [online]. *Zhonghua wai ke za zhi*. 2006 Jan 1 [cit. 2014-14-03].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16620649>>

Choi, J. E., Kim, S., Ahn, J. H., Youn, P., Kang, J. S., Park, K., Yi, J., Ryu, D. Y. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish [online]. *Aquatic Toxicology*. 2010 Oct 15 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060176>>

Choi, O., Deng, K. K., Kim, N. J., Ross, Jr. L., Surampalli, R. Y., Hu, Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth [online]. *Water Research*. June 2008 [cit. 2014-07-03]. Dostupné z

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135408000961>>

Kim, J. S., Kuk, E., Yu, N. K., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, J. H., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, Ch.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y. -S., Jeong, D. H., Cho, M.-H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles [online]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. March 2007 [cit. 2014-07-03]. Dostupné z

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963406003467>>

Kim, K. J., Sung, W. S., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., Lee, D. G. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes [online]. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2008 Aug [cit. 2014-26-03]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18756112>>

Kim, K. J., Sung, W. S., Suh, B. K., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., Lee, D. G. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans* [online]. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 2009 Apr [cit. 2014-14-03].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18769871>>

Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Köller, M., Epple, M. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions [online]. *Chemistry of materials* 22 (16), 2010 [cit. 2014-26-03]. Dostupné z

<<http://www.bibsonomy.org/bibtex/23a3875db79ce02e5bf226c2899ea4631/afcallender>>

Korani, M., Rezayat, S. M., Gilani, K., Arbabi, B. S., Adeli, S. Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig [online]. *International Journal of Nanomedicine*. 2011 [cit. 2014-08-04].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21720498>>

Kvitek, L., Panacek, A., Soukupova, J., Kolar, M., Vecerova, R., Pucek, R., Holecova, M., Zboril, R. Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs) [online]. *Journal of Physical Chemistry C*. 03/2008 [cit. 2014-07-03].

Dostupné z

<[http://www.researchgate.net/publication/231649230_Effect_of_Surfactants_and_Polymers_on_Stability_and_Antibacterial_Activity_of_Silver_Nanoparticles_\(NPs\)](http://www.researchgate.net/publication/231649230_Effect_of_Surfactants_and_Polymers_on_Stability_and_Antibacterial_Activity_of_Silver_Nanoparticles_(NPs))>

Kim, Y. S., Song, M. Y., Park, J. D., Song, K. S., Ryu, H. R., Chung, Y. H., Chang, H. K., Lee, J. H., Oh, K. H., Kelman, B. J., Hwang, I. K., Yu, I. J. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles [online]. *Particle and fibre toxicology*. 2010 Aug 6 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://www.particleandfibretoxicology.com/content/7/1/20>>

Kone, B. C., Kaleta M., Gullans, S. R. Silver ion (Ag^+)-induced increases in cell membrane K^+ and Na^+ permeability in the renal proximal tubule: reversal by thiol reagents [online]. *The Journal of Membrane Biology*. April 1988 [cit. 2014-26-03].

Dostupné z <<http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF01875349>>

Kwan, K. H., Liu, X., To, M. K., Yeung, K. W., Ho, C. M., Wong, K. K. Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing [online]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. August 2011 [cit. 2014-26-03].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963411000062>>

Lapied, E., Moudilou, E., Exbrayat, J. M., Oughton, D. H., Joner, E. J. Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm *Lumbricus terrestris* (*Oligochaeta*) [online]. *Nanomedicine*. 2010 Aug [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20735231>>

Lee, H.-Y., Choi, Y.-J., Jung, E.-J., Yin, H.-Q., Kwon, J.-T., Kim, J.-E., Im, H.-T., Cho, M.-H., Kim, J. H., Kim, H.-Y., Lee, B. -H. Genomics-based screening of differentially expressed genes in the brains of mice exposed to silver nanoparticles via inhalation [online]. *Journal of nanoparticle research*. June 2010 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11051-009-9666-2?no-access=true>>

Li, P., Li, J., Wu, Ch., Wu, Q., Li, J. Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles [online]. *Nanotechnology*. 28 July 2005 [cit. 2014-07-03].

Dostupné z <<http://iopscience.iop.org/0957-4484/16/9/082/>>

Li, P.-W., Kuo, T.-H., Chang, J.-H., Jeh, J.-M., Chan, W.-H. Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocyst by silver nanoparticles [online]. *Toxicology Letters*. 16 August 2010 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037842741001492X>>

Lu, L., Sun, R. W., Chen, R., Hui, C. K., Ho, C. M., Luk, J. M., Lau, G. K., Che, C. M. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication [online]. *Antiviral Therapy*. 2008 [cit. 2014-14-03]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18505176>>

Marambio-Jones, C., Hoek, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment [online]. *Journal of Nanoparticle Research*. June 2010 [cit. 2014-21-02]. Dostupné z <http://www.phy.pmf.unizg.hr/~dpajic/buksa/nanomaterijali/Misak_silverantibacterialimplicationshumanhealthenvironmentJNanopartRes121531.pdf>

Melby, T., Westby, M. Inhibitors of viral entry [online]. *Handbook of experimental pharmacology*. 2009 [cit. 2014-14-03].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19048201>>

Munger, A. M., Radwanski, P., Hadlock, G. C., Stoddard, G., Shaaban, A., Falconer, J., Grainger, D. W., Deering-Rice, C. E. In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles [online]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. January 2014 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963413003353>>

Nadworny, P. L., Wang, J., Tredget, E. E., Burrell, R. E. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver-derived solutions in porcine contact dermatitis [online]. *Journal of Inflammation*. 2010 [cit. 2014-26-03].

Dostupné z <<http://www.journal-inflammation.com/content/7/1/13>>

Nel, A.E., Madler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface [online]. *Nature Materials*. 14 June 2009 [cit. 2014-21-02]. Dostupné z <http://nw08.american.edu/~hartings/BDLabs/papers/Nel_NatureMaterials_2009_BioNanoInterface.pdf>

Niu, M., Liu, X., Dai, J., Jia, H., Wei, L., Xu, B. Antibacterial activity of chitosan coated Ag-loaded nano SiO₂ composites [online]. *Carbohydrate Polymers*. 4 August 2009 [cit. 2014-14-03]. Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861709002550>>

Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreiling, W., Cox, C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain [online]. *Inhalation Toxicology*. 2004 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/08958370490439597>>

Panáček, A., Kolář, M., Večeřová, R., Pucek, R., Soukupová, J., Kryštof, V., Hamal, P., Zbořil, R., Kvítek, L. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. [online]. *Biomaterials*. October 2009 [cit. 2014-14-03].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961209008023>>

Panyala, N. R., Peña-Méndez, E. M., Havel, J. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health? [online]. Journal off applied biomedicine. 2008 [cit. 2014-26-03]. Dostupné z <http://jab.zsf.jcu.cz/6_3/havel.pdf>

Park, E. J., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., Park, K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism [online]. Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA. 2010 Apr [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969064>>

Pathipati, U. R., Pala, R. Green synthesis of silver-protein (core-shell) nanoparticles using Piper betle L. leaf extract and its ecotoxicological studies on *Daphnia magna* [online]. Colloids and Surfaces A-physicochemical and Engineering Aspects – COLLOID SURFACE A. 2011 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://academic.research.microsoft.com/Publication/49450404>>

Philbrook, N. A., Winn, L. M., Afrooz, N. A. R. M., Saleh, N. B., Walker, V. K. The effect of TiO₂ and Ag nanoparticles on reproduction and development of *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice [online]. Toxicology and applied pharmacology. 15 December 2011 [cit. 2014-28-03]. Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X11003917>>

Posgai, R., Cipolla-McCulloch, C. B., Murphy, K. R., Hussain, S. M., Rowe, J. J., Nielsen, M. G. Differential toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles on *Drosophila melanogaster* development, reproductive effort, and viability: size, coatings and antioxidants matter [online]. Chemosphere. 2011 Sep [cit. 2014-07-03].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21733543>>

Prabhu, S., Poulos, E. K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects [online]. International Nano Letters. 2012, 2:32 [cit. 2014-21-02]. Dostupné z <<http://www.inl-journal.com/content/2/1/32>>

Raffi, M., Hussain, F., Bhatti, T. M., Akhter, J. I., Hameed, A., Hasan, M. M. Antibacterial Characterization of Silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224 [online]. Journal of Materials Science & Technology. 2008 [cit. 2014-07-03]. Dostupné z <<http://www.omnis-mg.hr/Radovi/EC-16nm-pakistan.pdf>>

Rosas-Hernández, H., Jiménez-Badillo, S., Martínez-Cuevas, P. P., Gracia-Espino, E., Terrones, H., Terrones, M., Hussain, S. M., Ali, S. F., González, C. Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings [online]. *Toxicology Letters*. 2009 Dec 15 [cit. 2014-08-04].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800954>>

Shin, S. H., Ye, M. K., Kim, H. S., Kang, H. S. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells [online]. *International immunopharmacology*. 2007 Dec 15 [cit. 2014-26-03].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17996693>>

Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., Dash, D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles [online]. *Nanotechnology*. 05/2007 [cit. 2014-07-03]. Dostupné z

<http://www.researchgate.net/publication/231102093_Characterization_of_enhanced_antibacterial_effects_of_novel_silver_nanoparticles>

Sondi, I., Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a for Gram-negative bacteria [online]. *Journal of Colloid and Interface Science* 275. 18 March 2004 [cit. 2014-21-02]. Dostupné z

<<http://nanotechnology.wmwikis.net/file/view/Silver+nanoparticles+as+antimicrobial+article.pdf/279894116/Silver%20nanoparticles%20as%20antimicrobial%20article.pdf>>

Smetana, A., Klabunde, K., Marchin, G., Sorensen, C. Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles [online]. *Langmuir*. 2008 Jul 15 [cit. 2014-07-03]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18543995>>

Su, H.-L., Chou, Ch.-Ch., Hung, D.-J., Lin, S.-H., Pao, I.-Ch., Lin, J.-H., Huang, F.-L., Dong, R.-X., Lin, J.-J. The disruption on bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay [online]. *Biomaterials* 30. 2009 [cit. 2014-21-02].

Dostupné z <<http://www.deepdyve.com/lp/elsevier/the-disruption-of-bacterial-membrane-integrity-through-ros-generation-AJ1Og4cLsH>>

Sung, J. H., Ji, J. H., Yoon, J. U., Kim, D. S., Song, M. Y., Jeong, J., Han, B. S., Han, J. H., Chung, Y. H., Kim, J., Kim, T. S., Chang, H. K., Lee, E. J., Lee, J. H., Yu, I. J. Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles [online]. *Inhalation toxicology*. 2008 Apr [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18444009>>

Sur, I., Cam, D., Kahraman, M., Baysal, A., Culha, M. Interaction of multi-functional silver nanoparticles with living cells [online]. *Nanotechnology*. 2010 Apr 30 [cit. 2014-26-03].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368680>>

Takenaka, S., Karg, E., Roth, C., Shulz, H., Ziesenis, A., Heinzmann, U., Schramel, P., Heyder, J. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats [online]. *Environmental health perspectives* Aug 2001 [cit. 2014-28-03]. Dostupné z

<<http://www.jstor.org/discover/10.2307/3454667?uid=3737856&uid=2&uid=4&sid=21103838545177>>

Tang, J., Xiong, L., Wang, S., Liu, L., Li, J., Yuan, F., Xi, T. Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats [online]. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2009 Aug [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19928170>>

Wang, H.-J., Yang, L., Yang, H.-Y., Wang, K., Yao, W.-G., Jiang, K., Huang, X.-L., Zheng, Z. Antineoplastic activities of protein-conjugated silver sulfide nano-crystals with different shapes [online]. *Journal of Inorganic Biochemistry*. January 2010 [cit. 2014-26-03].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013409002633>>

Wiegand, C., Heinze, T., Hipler, U. C. Comparative in vitro study on cytotoxicity, antimicrobial activity, and binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds of alginate and silver-containing alginate [online]. *Wound repair and regeneration*. 2009 Jul-Aug [cit. 2014-14-03]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19614916>>

Wijnhoven, S. W. P., Peijnenburg, W. J. G. M., Herberts, C. A., Hagens, W. I., Oomen, A. G., Heugens, E. H. W., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., Meent, D. V. D., Dekkers, S., Jong, W. H. D., Zijverden, M. V., Sips, A. J. A. M., Geertsma, R. E. Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment [online]. *Nanotoxicology*. June 2009 [cit. 2014-08-04].

Dostupné z <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/17435390902725914>>

Wu, Y., Zhou, Q., Li, H., Liu, W., Wang, T., Jiang, G. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test [online]. *Aquatic Toxicology*. 2010 Oct 15 [cit. 2014-28-03].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034681>>

Xiang, D. X., Chen, Q., Pang, L., Zheng, C. L. Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza a virus in vitro [online]. *Journal of Virological Methods*. December 2011 [cit. 2014-14-03].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093411003788>>

Yang, W., Shen, C., Ji, Q., An, H., Wang, J., Liu, Q., Zhang, Z. Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA [online]. *Nanotechnology*. 2009 Feb 25 [cit. 2014-21-02]. Dostupné z <http://iopscience.iop.org/0957-4484/20/8/085102/pdf/0957-4484_20_8_085102.pdf>

You, Ch., Han, Ch., Wang, X., Zheng, Y., Li, Q., Hu, X., Sun, H. The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity [online]. *Molecular Biology Reports*. September 2012 [cit. 2014-21-02].

Dostupné z <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11033-012-1792-8?no-access=true>>

Zhang, Y., Peng, H., Huang, W., Zhou, Y., Yan, D. Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles [online]. *Journal of colloid and interface science*. 2008 Sep 15 [cit. 2014-26-03].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18572178>>