

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Nanostříbro a jeho využití v lékařství

Lenka Jemelková

Bakalářská práce

2016

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lenka Jemelková**
Osobní číslo: **C13566**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Nanostříbro a jeho využití v lékařství**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši na dané téma, nejprve se zaměřte na strukturu a přípravu nanostříbra.
2. V druhé části se věnujte mechanismům antimikrobiální účinnosti a toxickému efektu nanostříbra.
3. V poslední části se zaměřte na nejčastější využití nanostříbra v lékařství.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Iveta Brožková, Ph.D.


Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

18. prosince 2015

Termín odevzdání bakalářské práce:

3. července 2016



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 28.6.2016

Lenka Jemelková

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své vedoucí Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za pomoc, cenné rady a vstřícnost při vypracovávání bakalářské práce. Ráda bych také chtěla poděkovat své rodině za podporu během studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá antibakteriálními vlastnostmi nanočástic stříbra, jejich strukturou a přípravou, a to metodami fyzikálními, chemickými i biologickými, a následnou stabilizací vyrobených nanočástic. Dále se práce zabývá mechanismem antibakteriální účinnosti, potenciálním toxickým efektem nanostříbra a možnou bakteriální rezistencí vůči nanostříbru. Práce zahrnuje informace o využití nanostříbra, a to jak z historického pohledu, tak z pohledu současného využití, a především se věnuje nejčastějším aplikacím nanostříbra v lékařství.

KLÍČOVÁ SLOVA

nanostříbro, nanotechnologie, nanočástice, baktericidní účinky, příprava nanostříbra, využití nanostříbra

TITLE

Nanosilver and its applications in medicine

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with antibacterial properties of silver nanoparticles, their structure and preparation, namely physical, chemical and biological methods, and subsequent stabilization of prepared nanoparticles. The thesis also deals with a mechanism of antibacterial efficiency, potential toxic effects of nanosilver and possible bacterial resistance to nanosilver. The work includes information about applications of nanosilver, both from a historical perspective and also from the perspective of current use, mainly focused on the most common applications of nanosilver in medicine.

KEYWORDS

nanosilver, nanotechnology, nanoparticles, antibacterial effects, preparation of nanosilver, use of nanosilver

Obsah

Seznam ilustrací a tabulek	8
Seznam zkratk a značek	9
Úvod.....	10
1 Nanočástice.....	11
2 Stříbro	12
3 Nanostříbro	13
3.1 Struktura.....	13
3.2 Příprava	13
3.2.1 „Top-down“ techniky	14
3.2.2 „Bottom-up“ techniky.....	17
3.2.3 „Green synthesis“	18
3.2.4 Stabilizace nanočástic	19
4 Mechanismy antimikrobiální účinnosti nanostříbra	21
4.1 Bakteriální rezistence vůči nanostříbru	25
5 Toxický efekt nanostříbra.....	27
6 Využití nanostříbra v praxi.....	32
6.1 Historie využití stříbra.....	32
6.2 Současné využití nanostříbra.....	33
6.3 Nanostříbro v lékařství.....	34
6.3.1 Kardiovaskulární implantáty.....	36
6.3.2 Cévní náhrady	37
6.3.3 Centrální žilní katétry	37
6.3.4 Neurochirurgické katétry	38
6.3.5 Kostní cement	39
6.3.6 Obvazy na rány	40
6.3.7 Další využití v lékařství	42
7 Závěr.....	44
8 Použitá literatura.....	45

Seznam ilustrací a tabulek

Obrázek 1 - Schéma uspořádání výroby AgNPs laserovou ablací	15
Obrázek 2 - Schematické znázornění vzniku AgNPs nebo tenkých Ag vrstev v průběhu depozice Ag katodovým naprašováním do biokompatibilních kapalin.....	16
Obrázek 3 - Snímky z transmisní elektronové mikroskopie nanostříbra se stabilizátory.....	20
Obrázek 4 - Mechanismus antibakteriální aktivity Ag ⁺	21
Obrázek 5 - Antibakteriální testování kmenů <i>Bacillus cereus</i> a <i>Escherichia coli</i>	24
Obrázek 6 - Možné mechanismy cytotoxicity nanočástic stříbra	29
Obrázek 7 - Aplikace nanočástic stříbra v lékařství	36
Obrázek 8 - Ventrikulární katétr Silverline®	39
Obrázek 9 - Nanočástice stříbra v obvazových materiálech Acticoat	41
Tabulka 1 - Chemické vlastnosti stříbra	12
Tabulka 2 - Mechanismy působení nanostříbra u jednotlivých bakterií.....	22
Tabulka 3 - Příklady využití stříbra a AgNPs	33
Tabulka 4 - Příklady lékařských produktů obsahujících nanostříbro	35

Seznam zkratek a značek

Ag ⁺	stříbrné ionty
Ag ₂ O	oxid stříbrný
AgNPs	nanočástice stříbra
ATP	adenosintrifosfát
CSF	mozkomíšní mok, likvor
CAV	ventrikulitida spojená s katétry
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Hsp 70-2	z angl. heat shock protein, protein teplotního šoku
ILs	z angl. ion liquids, iontové kapaliny
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSE	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus epidermidis</i>
NS	nanostříbro
NS-katétr	katétr pokrytý nanostříbrem
PAN	polyakrylonitril
PMMA	polymethylmethakrylát
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	z angl. reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
TKO	triglycerid kapronového oleje

Úvod

Nanomateriály a nanotechnologie se v posledních letech dostaly do popředí vědeckého zájmu a nacházejí uplatnění v mnoha oborech lidské činnosti. V současné době dochází k velkému zájmu především o nanostříbro. Stříbrné nanočástice jsou definovány jako částice, které mají alespoň jeden rozměr v rozmezí 1–100 nm. Již v antice bylo využíváno antibakteriálních účinků stříbra. Čím dál častěji nanostříbro nahrazuje antibiotika, která postupně ztrácejí svou účinnost díky narůstající bakteriální rezistenci. V lékařství se nanostříbro používá např. při léčbě popálenin nebo jako prevence bakteriálních filmů na cévních katétrech. Využití nachází také v textilním průmyslu, v potravinářství, ve stavitelství, ve farmacii a v běžném spotřebním zboží, jako jsou např. plastové nádoby, těsnění do chladniček nebo kosmetické produkty. S narůstajícími aplikacemi nanočástic stříbra ve zdravotnictví je nezbytné přesné pochopení jejich mechanismu působení, biologických interakcí a potenciálního mechanismu toxicity. V současné době se zkoumá možná rezistence mikroorganismů vůči nanostříbru a její šíření.

1 Nanočástice

V současné době vzrůstá produkce a využití nanočástic prakticky ve všech odvětvích lidské činnosti, včetně potravinářství, pesticidů, kosmetiky nebo dekontaminace životního prostředí. Nanomateriály se tak postupně stávají běžnou součástí životního prostředí (Dohnalová a Dohnal, 2015).

Nanotechnologie zahrnují charakterizaci, výrobu a manipulaci se strukturami a materiály, které mají alespoň jeden rozměr v rozmezí hodnot velikosti 1–100 nm (Sovová a Kočí, 2012). Nanometr je jedna miliardtina metru (10^{-9} m) (Naidu a kol., 2015). Je-li velikost částic pod tuto hodnotu snížena, začínáme pozorovat materiálové vlastnosti, které se výrazně liší od materiálů o velké velikosti (Chapman a kol., 2012).

Od velkých materiálů se většinou liší svojí strukturou, a to na atomární úrovni (jsou stabilní i jiné strukturní modifikace), ale také formálně z makroskopického hlediska (odlišná hustota). Jedním ze základních důvodů je vzrůstající podíl povrchových atomů se zmenšujícími se rozměry objektu. Povrchové atomy mají nižší počet sousedů (tvoří menší počet vazeb) než atomy ve velkém materiálu. To má výrazným způsobem vliv na vazebné energie těchto atomů a jejich prostorové uspořádání (Řezníčková a kol., 2014). Ve všech nanotechnologických aplikacích hraje významnou roli velikost, přesněji řečeno velikostní distribuce používaných nanočástic, dále jejich morfologie, stabilita, stav povrchu z chemického hlediska (modifikace povrchu), ale i z fyzikálního hlediska (např. elektrický náboj) (Kvítek a kol., 2009).

Nanočástice jsou stále více a více zkoumány a prostřednictvím jejich začlenění do matic se ukázaly jako vynikající mikrobicidní látky. Nedávné práce ukázaly, že mechanismy pro výrobu nanočástic, zejména při jejich syntéze a inkorporaci do materiálů, výrazně zlepšují jejich antimikrobiální účinky (Chapman a kol., 2012).

Nanotechnologie jsou nejnadějnějším oborem pro vytváření nových aplikací v medicíně. V současné době je používáno v medicíně pouze několik nanoproduktů. Nejvýznamnějším nanoproduktem je bezpochyby nanostříbro (Chen a Schluesener, 2008).

2 Stříbro

Stříbro, značí se Ag (z latinského *argentum*), je bílý a lesklý kovový prvek. Čisté stříbro je ideálně kujný a poddajný kov, který se vyznačuje nejlepší elektrickou a tepelnou vodivostí ze všech známých kovů (Chen a Schluesener, 2008).

Tabulka 1 - Chemické vlastnosti stříbra (Greenwood a Earnshaw, 1993)

Atomové číslo	47
Atomová hmotnost	107,8682 (± 3)
Elektronová konfigurace	[Kr]4d ¹⁰ 5s ¹
Elektronegativita	1,9
Teplota tání [°C]	961
Teplota varu [°C]	2155
Hustota (20°C) [g.cm⁻³]	10,49
Měrný elektrický odpor (20°C) [$\mu\Omega$.cm]	1,59

Stříbro se nachází v přírodě především v sulfidických rudách, z nichž je nejvýznamnější sulfid stříbrný. Značné množství stříbra se získává jako vedlejší produkt vznikající při výrobě jiných kovů, zejména mědi. Vyrobené stříbro se využívá pro fotografické účely, výrobu ozdobných a užitkových předmětů, v elektrotechnice, ke stříbření zrcadel, při výrobě baterií a v neposlední řadě v lékařství (Greenwood a Earnshaw, 1993).

Současné aplikace stříbra souvisí především s jeho baktericidními účinky. Jako antibakteriální látky se využívají koloidní disperze stříbra ve vodném roztoku. Účinnou složkou jsou stříbrné ionty, které poškozují metabolismus bakterií. Tyto disperze obsahují nanočástice stříbra s velkým povrchem, takže v určitém rozsahu může docházet k oxidaci vzdušným kyslíkem na oxid stříbrný. Ačkoliv je Ag₂O jen velmi málo rozpustný ve vodě, i malá koncentrace Ag⁺ v roztoku stačí k poskytnutí baktericidního efektu. Například firma Johnson&Johnson prodává obvaz Actisorb Silver, který obsahuje aktivní uhlí impregnované stříbrem a uzavřené mezi nylonovými vlákny. Obvaz slouží k odstraňování bakterií v ranách, ale také k adsorpci toxinů a minimalizaci případného zápachu. Takovéto obvazy se používají na infikované rány (např. léze a bércové vředy) (Housecroft a Sharpe, 2014).

3 Nanostříbro

Pro stříbrné částice, které mají alespoň jeden rozměr menší než 100 nm, se používá pojem nanostříbro. Mezi další názvy patří koloidní stříbro nebo nanočástice stříbra (McShan a kol., 2014). Po dosažení nanorozměrů vykazují stříbrné nanočástice neobvyklé fyzikální, chemické a biologické vlastnosti (Chen a Schluesener, 2008).

Velký zájem o nanočástice stříbra spočívá v jejich lepší mikrobicidní účinnosti, nižší celkové toxicitě a snadném začlenění do řady polymerů a biomateriálů (Mailard a Hartemann, 2013). Nanočástice stříbra mají silný toxický účinek na širokou škálu mikroorganismů. Díky svému velkému povrchu uvolňují bioaktivní stříbrné ionty, které jsou efektivnější než stříbro ve velkém formátu. Tato biocidní vlastnost umožňuje prevenci a lokální léčbu infekčních onemocnění a také produkci antimikrobiálních, samočisticích a samodezinfekčních povrchů. Stejného biocidního účinku může být dosaženo s relativně malým přídatkem nanostříbra do surovin, který přispívá k efektivnímu využití materiálů (Schacht a kol., 2013). Zavádějí se v definovaných koncentracích do hotových předmětů nebo do surovin pro následnou výrobu polymerů (Mailard a Hartemann, 2013).

3.1 Struktura

Částice nanostříbra jsou většinou menší než 100 nm a obsahují 20–15 000 stříbrných atomů. Morfologie částic zahrnuje koule, tyče, kostky, dráty a mnohostrany. Stejně jako je tomu u všech nanomateriálů, zásadní vlastností nanostříbra je jeho mimořádně malá velikost, která vede k extrémně velkému povrchu, kdy velká část atomů je v bezprostředním kontaktu s prostředím a snadno dostupná pro reakci (Chen a Schluesener, 2008).

3.2 Příprava

Nanočástice mohou být v podstatě vyráběny třemi způsoby. Buď technikami označovanými „top-down“ („shora dolů“) nebo opačnými technikami „bottom-down“ („zdola nahoru“). První technika se někdy označuje jako fyzikální nebo rozkladná, druhá technika bývá označována jako chemická nebo syntetická. Společnou snahou obou technik je kontrolovaně vytvářet nanočástice a nanostruktury stejného tvaru a velikosti (Hájková a Šmejkal, 2014). Nedávno byl uvedený nový způsob syntézy, tzv. „green synthesis“, který používá netoxické a bezpečné reaktanty a rozpouštědla pro životní prostředí. Takto získané nanostříbro může být pak použito k různým biologickým účelům (Emam a Ahmed, 2016).

Různé způsoby syntézy stříbrných nanočástic vedou k různé velikosti, tvaru, morfologii a dokonce i stabilitě vyrobených nanočástic (Ge a kol., 2014).

Tvorba nanočástic zahrnuje tři fáze, a to redukční reakci stříbrných iontů na volné atomy, nukleaci a růst. Nedávné studie ukázaly, že reakční kinetika a experimentální podmínky mají velký vliv na nukleaci a fázi růstu. Klíčovou roli hraje redukce prekurzorů solí stříbra na elementární stříbrné nanočástice a obecně vyžaduje redukční činidlo a stabilizátor (Emam a Ahmed, 2016).

3.2.1 „Top-down“ techniky

„Top-down“ techniky jsou založeny na redukci kovového stříbra na nanoformu. Toho lze dosáhnout prostřednictvím řady metod, z nichž jsou nejčastěji využívány laserová ablace a litografie. Výhodou těchto technik jsou jejich nízké náklady a také to, že nevyužívají žádná rozpouštědla, takže jsou o něco ekologičtější (Chapman a kol., 2012). Kromě toho, že nezahrnují toxické chemické látky, tak obvykle mají rychlý čas zpracování. Jejich další předností je, že nanočástice mají úzkou distribuci velikosti. Nicméně hlavní nevýhodou je jejich vysoká spotřeba energie (Wei a kol., 2015).

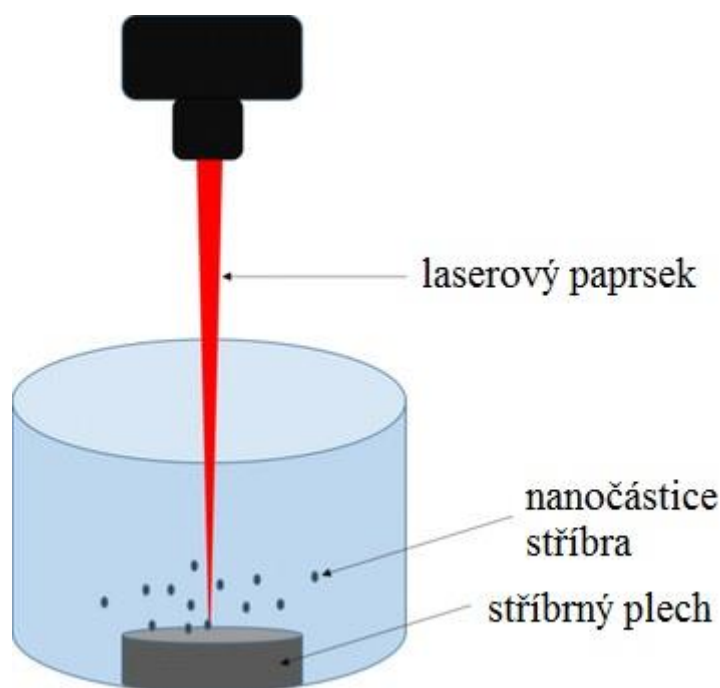
Výrobní postup začíná strukturami vytvořenými člověkem (obvykle mikrosystémy), s kterými se dobře zachází, cíleně se zmenšuje jejich velikost až na objekty o velikosti v řádu nanometrů. Postupnými kroky miniaturizace se vytvářejí menší a menší produkty, a to tak dlouho, až vznikne struktura, která je dostatečně malá na to, aby byla držitelkou nové unikátní vlastnosti nebo funkce. Současné „top-down“ postupy pracují na spodní hranici v rozměrech cca 10–100 nm (Hájková a Šmejkal, 2014).

Neddersen a kol. (1993) a Fojtík a kol. (1993) navrhli výrobu stříbrných nanočástic ze stříbrných plechů, které jsou ponořené v kapalně fázi a ozářené vysokoenergetickým laserovým paprskem. Tato metoda výroby je v dnešní době nejpoužívanější metodou. Výzkumní pracovníci předpokládají, že kovový plech pohlcuje velkou část impulzní energie laseru a vytváří horké plazma, které obsahuje vysoké koncentrace stříbrných atomů a iontů. Kapalná fáze slouží jako chladicí médium k ochlazení plazmy a proto fyzikálně-chemické

vlastnosti roztoku ovlivňují rychlost tvorby nanočástic, jejich tvar, velikost a nejednotnost (Zhang a kol., 2016).

Během procesu chemické ablace nejsou třeba žádné chemické látky, proto není nutné získané koloidy nanočástic stříbra čistit a tak můžou být přímo použity pro další aplikace. Přestože je tato metoda široce rozvinutá, tak ještě stále existují spory ve vztahu mezi velikostí nanočástic a silou laserového paprsku. Většina prací poukazuje na to, že velikost nanočástic lineárně roste se silou laserového paprsku (Zhang a kol., 2016).

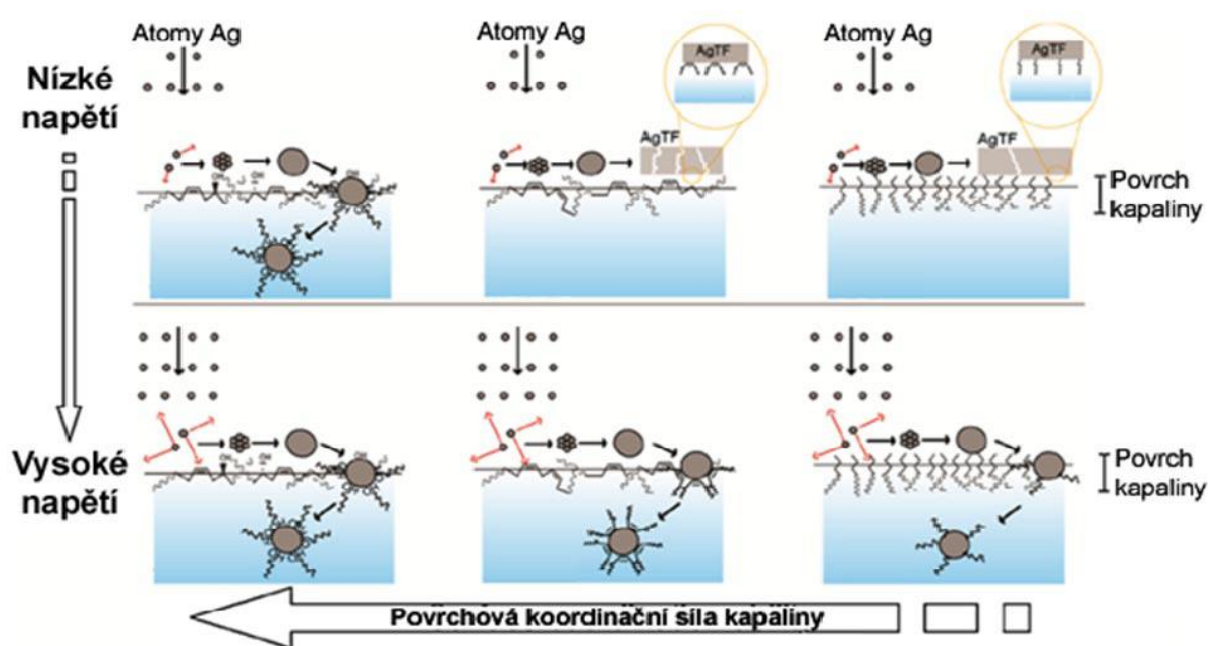
Obrázek 1 - Schéma uspořádání výroby AgNPs laserovou ablací (upraveno dle Zhang a kol., 2016)



Mezi další fyzikální metodu patří odpařování/kondenzace. Tato metoda se obvykle provádí v trubkové peci při pokojovém atmosférickém tlaku. Kromě stříbra tak byly připraveny různé kovové částice (např. zlato a sulfid olovnatý). Tato technika je jednoduchá a přímočará (Zhang a kol., 2016). Nicméně použití běžných trubek má několik nevýhod jako je velká spotřeba energie a pomalý proces, protože vyžadují delší dobu k dosažení tepelné stability (Ge a kol., 2014). Jung a kol. (2006) použili malé keramické topné těleso s lokálním vytápěcím prostorem, tudíž se odpařená pára vhodnou rychlostí ochladila, a tak mohla být získána vysoká koncentrace nanostříbra.

Další široce využívanou metodou je elektrochemická technika, kde jsou stříbrné nanočástice připraveny ve speciální elektrochemické cele. V tomto elektrochemickém článku je aplikováno vnější elektrické pole na stříbrnou anodu. Stříbrné ionty jsou redukovány na platinové katodě a tvoří shluky, které se následně stávají nanočásticemi. Tato metoda může být provedena při pokojové teplotě a velikost nanočástic stříbra může být regulována hustotou proudu (Zhang a kol., 2016).

Obrázek 2 - Schematické znázornění vzniku AgNPs nebo tenkých Ag vrstev v průběhu depozice Ag katodovým naprašováním do biokompatibilních kapalin (Siegel a kol., 2014)



Další možnou přípravou nanočástic stříbra je metoda fyzikální depozice z pevné fáze do kapalného média (tzv. technika naprašování). Nejběžnějšími médii pro přímou depozici kovů jsou iontové kapaliny (ILs) a méně toxickou volbou jsou rostlinné oleje. Tvorba nanočástic závisí na aplikovaném napětí a specifické povrchové koordinační schopnosti použitého druhu oleje, např. ricinový, řepkový, triglycerid kapronového oleje (TKO). Nižší napětí výboje a nižší koordinační schopnost vedou ke vzniku souvislého filmu, zatímco při vyšším napětí a koordinační schopnosti média dochází k tvorbě nanočástic (viz Obr. 2). Vyšší napětí znamená vyšší difuzivitu adsorbovaných částic na povrchu kapaliny, což usnadňuje průnik částic do objemu kapaliny a ukotvení atomů k funkčním skupinám kapaliny. Vhodnou biokompatibilní kapalinou je ricinový olej, který umožňuje snadnou tvorbu nanočástic

v širokém rozmezí napětí (funkčními skupinami jsou skupiny hydroxylové). Naopak je tomu při použití řepkového oleje, který je převážně tvořen nenasycenými alifatickými řetězci, a při použití TKO, kdy dochází při nízkém napětí k tvorbě stříbrných filmů a nanočástice se pak tvoří výhradně při vyšším napětí (viz Obr. 2) (Siegel a kol., 2014).

Velmi zajímavým médiem pro přípravu nanočástic technikou přímého naprašování je čistý glycerol. Mezi jeho fyzikální vlastnosti patří nízká tenze par, teplotně dobře ředitelná viskozita a vysoká koordinační schopnost, které spolu s nízkou toxicitou a biokompatibilitou umožňují následnou aplikaci nanočástic v bioinženýrství. Přítomnost hydroxylových skupin v glycerolu má stabilizační účinky na vodné roztoky nanočástic v důsledku jejich absorpce na povrch částic, proto zůstávají stabilní i při delším skladování. U takto připravených nanočástic byla vyhodnocena jejich antibakteriální aktivita vůči dvěma bakteriálním kmenům, a to u gramnegativního kmene *Escherichia coli* a grampozitivního kmene *Staphylococcus epidermidis*. V přítomnosti stříbrných nanočástic (o velikosti 4–6 nm) došlo po 24 h k úplné inhibici obou kmenů. Inhibice růstu obou kmenů byla zachována i po 48 h kultivace na agarových substrátech, což značí velmi silný antibakteriální účinek (Siegel a kol., 2014).

Další možností fyzikální přípravy je metoda obloukového výboje, kdy dochází k výrobě v čisté vodě bez jakýchkoliv povrchově aktivních látek nebo stabilizátorů. Jako pozitivní a negativní elektrody se používají stříbrné drátky. Během výboje se povrchové vrstvy stříbrných drátků odpařují a kondenzují ve vodě, a tím se získají stabilní a dobře rozptýlené stříbrné nanočástice o velikosti 20–30 nm (Ge a kol., 2014).

Získané nanočástice se pak následně musí stabilizovat přidávkem koloidních stabilizačních činidel (Řezníčková a kol., 2014).

3.2.2 „Bottom-up“ techniky

„Bottom-up“ techniky zahrnují rozpuštění soli stříbra v určitém rozpouštědle, jeho redukci na iontovou formu a následnou tvorbu nanočástic (Chapman a kol., 2012). Nejčastěji se nanostříbro získává redukcí dusičnanu stříbrného za použití redukčního činidla nebo fotoredukci pomocí UV světla (Chaloupka a kol., 2010).

Výrobní postup začíná u nejmenších částic hmoty (u jednotlivých molekul a atomů). Z nich se hierarchicky komponují součástky, které tvoří další složky složitějších systémů. Tyto metody se přirozeně uplatňují v přírodě při tvorbě biologických struktur. Příroda tak lidi inspirovala ke snaze připravovat tímto způsobem nanostruktury umělé. Jejich velikost se dnes typicky pohybuje v rozmezí cca 2–10 nm (Hájková a Šmejkal, 2014).

Syntéza stříbrných nanostruktur obvykle obsahuje tři hlavní složky, a to kovové prekurzory, redukující a stabilizační činidla (Wei a kol., 2015). Po redukci stříbrných iontů na atomy stříbra se atomy dále shlukují do oligomerních shluků vedoucích ke vzniku stříbrných nanočástic. Běžně se ke tvorbě nanočástic stříbra používají prekurzory chemické redukce, jako jsou dusičnan stříbrný, octan stříbrný, citrát stříbrný. Mezi nejčastěji používaná redukční činidla patří borohydrid, citrát, askorbát a sloučeniny s hydroxylovými a karboxylovými skupinami (např. alkoholy, aldehydy, sacharidy a další deriváty). Vlastnosti redukčních činidel silně ovlivňují mechanismus růstu nanočástic. Silné redukční činidlo (např. borohydrid) generuje monodisperzní částice o větší velikosti, zatímco mírná redukční činidla (např. askorbát, citrát) tvoří menší počet částic pomalejší rychlostí, která podporuje tvorbu nanočástic stříbra s menšími rozměry a širší disperzí (Zhang a kol., 2016).

3.2.3 „Green synthesis“

Chemické a fyzikální metody, které se používají k syntéze nanostříbra, mají obecně řadu nevýhod a nejsou šetrné k životnímu prostředí (Sintubin a kol., 2012). Proto byla popsána celá řada alternativních způsobů „zelené“ chemické syntézy nanostříbra za použití různých druhů bakterií a plísní. Tyto metody sdílejí společnou metodologii, kdy je roztok dusičnanu stříbrného přidán do mikrobiálního supernatantu. Redukční činidla (např. hydrochinony) přítomné v supernatantu redukují stříbrné ionty na nanostříbro za konstantních podmínek (např. teplota). Nevýhodou tohoto postupu je nutnost pročištění vzorku a extrakce nanostříbra kvůli kontaminaci patogenními bakteriemi (Chaloupka a kol., 2010).

Tvar, velikost a funkcionalizace nanočástic je definována biologickým systémem použitým k produkci nanočástic, a proto pro každou aplikaci musí být vybrán specifický biologický výrobní proces (Sintubin a kol., 2012).

K boji proti multirezistentním bakteriím bylo provedeno testování synergismu biogenního stříbra, které bylo produkováno za pomoci plísně *Trichoderma viride*, spolu s několika antibiotiky, a to konkrétně kanamycin, erythromycin, chloramphenicol a ampicilin. Biogenní stříbro zvýšilo velikost inhibiční zóny u každé kombinace stříbra s antibiotiky, ale účinek byl nejvyšší v kombinaci s ampicilinem (Fayaz a kol., 2010). Proti řadě plísni byl proveden podobný experiment, kterým bylo zpozorováno zvýšení antifungální aktivity flukonazolu v přítomnosti biogenního stříbra vytvořeného plísni *Alternaria alternata* (Gajbhiye a kol., 2009). U samotného biogenního stříbra, které bylo vyrobené pomocí kmene *Staphylococcus aureus*, byla nejvyšší aktivita pozorována vůči methicilin-rezistentnímu *Staphylococcus aureus*, methicilin-rezistentním bakteriím *Streptococcus epidermidis* a *Streptococcus pyogenes*. Ostatní bakterie byly jen mírně citlivé (Nanda a Saravanan, 2009).

Využití biogenního nanostříbra ve zdravotnictví má bohužel své úskalí. Biogenní stříbro, které je syntetizované pomocí patogenních bakterií, jako je například kmen *Staphylococcus aureus*, by mohlo ještě obsahovat živé buňky, které by následně mohly způsobit infekci po aplikaci v obvazech. Dalším problémem by mohla být také biokompatibilita biogenního stříbra (Sintubin a kol., 2012). Vědci proto nabádají k opatrnosti při zavádění biogenního stříbra do lékařských aplikací (Ge a kol., 2014).

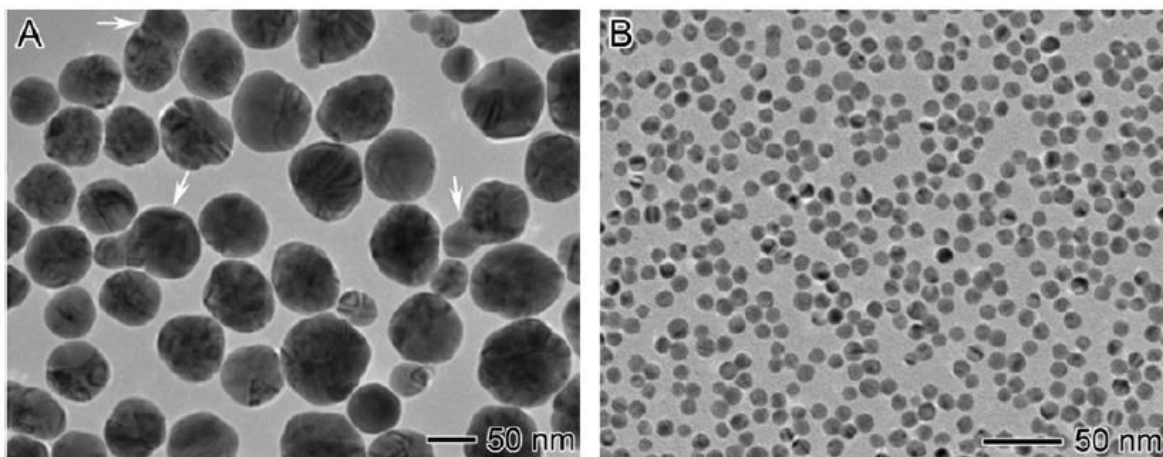
Stříbrné nanočástice lze připravit kromě bakterií a plísni, také z hub, kvasinek a rostlin (např. citronová tráva, aloe vera, mořské řasy, vojtěška, čaj, hořčice atd.) (Wei a kol., 2015). Bylo zjištěno, že *Allium sativum* (běžně známý jako česnek) je účinnější ve vytváření nanočástic a cytotoxických testech ve srovnání s metodami chemické a mikrobiální syntézy. Také bylo zjištěno, že tyto nanočástice stříbra způsobují zesílený cytotoxický efekt a indukují mnoho apoptických buněk, dokonce i v buňkách ošetřených nižšími koncentracemi. Toxicita nanostříbra tak vytváří zajímavé možnosti pro jeho potenciální využití jako protinádorové činidlo (Pandian a kol., 2015).

3.2.4 Stabilizace nanočástic

Existuje široká škála používaných stabilizátorů. Mohou to být např. donorové ligandy, polymery nebo také povrchově aktivní látky, které se hlavně používají ke kontrolovanému růstu klastrů a zabraňují jejich shlukování (Řezníčková a kol., 2014).

Nejlepšími adepty pro stabilizaci nanočástic stříbra jsou polymery. Nejčastěji používanými polymerními stabilizátory jsou polyvinylpyrrolidon, kyselina polymethylakrylová, polymethylmethakrylát a polyethylenglykol (Zhang a kol., 2016). Komplex polymeru a stříbrných iontů může být redukován za vzniku nanočástic stříbra za různých experimentálních podmínek (Emam a Ahmed, 2016).

Obrázek 3 - Snímky z transmisní elektronové mikroskopie nanostříbra se stabilizátory (Hu a kol., 2008)



(A) polyvinylpyrrolidon, (B) kyselina polyakrylová

Stabilizační činidla jsou velmi důležitá, protože brání vzniku sraženin nanočástic. Existují tři základní druhy stabilizace. Elektrostatická stabilizace je založena na odpuzování částic v elektrické dvojvrstvě. Druhou metodou je sterická stabilizace, která koordinuje stericky objemné molekuly působící jako ochranné štíty na povrchu nanočástice. Tím jsou jednotlivá jádra od sebe oddělena a nedochází k jejich aglomeraci. Někdy se využívá i kombinace obou metod (Řezníčková a kol., 2014). Třetím používaným způsobem je stabilizace ligandy (organokovové nebo kovalentní vazby). Dalším možným způsobem stabilizace nanočástic je prostřednictvím imobilizace (Emam a Ahmed, 2016).

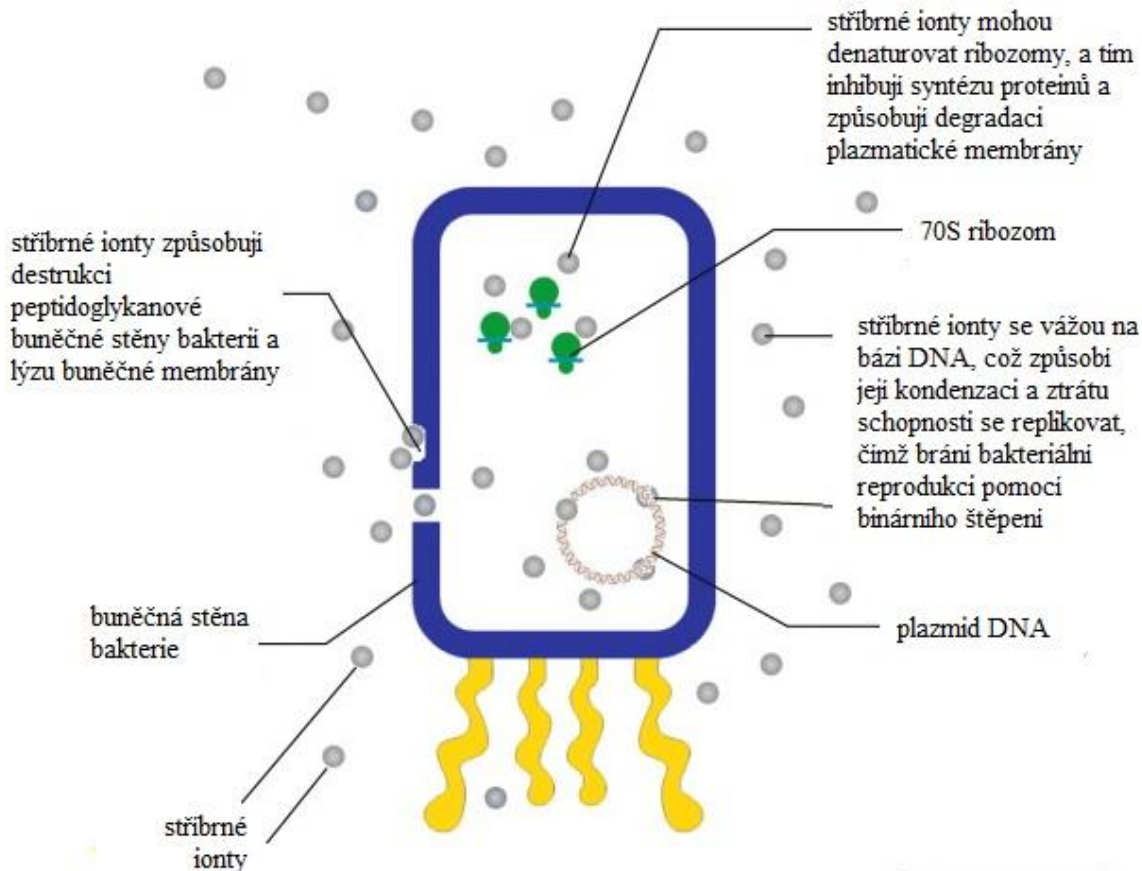
Polysacharidy jako biologicky rozložitelné a kompatibilní polymery mohou být kvůli svým schopnostem chelatace stříbrných iontů také použity jako stabilizační činidla. Vyznačují se dobrou redukovatelností, neboť jejich stavební jednotky obsahují různé funkční skupiny, a proto mohou hrát dvojí roli, a to jako generátory stříbrných nanočástic a zároveň jako ochranná činidla (Emam a Ahmed, 2016).

4 Mechanismy antimikrobiální účinnosti nanostříbra

Je všeobecně známo, že stříbrné ionty působí mikrobicidně. Ničí houby a plísně, zabíjí parazity a pomáhají regeneraci buněk při minimální toxicitě pro vyšší organismy (Atiyeh a kol., 2007).

Stříbro a nanostříbro ve vodném roztoku uvolňují stříbrné ionty, které jsou biologicky aktivní a zprostředkovávají baktericidní účinek. Tento mechanismus ještě není zcela objasněn, ale postřehy z nedávných studií osvětlují reakce zapojené do mechanismu antibakteriální účinnosti. Vědci se domnívají, že stříbrné ionty reagují s třemi hlavními složkami bakteriální buňky za vzniku baktericidního účinku, a to přes peptidoglykanovou buněčnou stěnu a plazmatickou membránu (způsobuje lýzu buněk), bakteriální cytoplazmatickou DNA (zabraňuje její replikaci) a bakteriální proteiny (porušení jejich syntézy), a to především enzymy podílející se na životně důležitých procesech uvnitř buňky, jako je například elektronový transportní řetězec (Chaloupka a kol., 2010).

Obrázek 4 - Mechanismus antibakteriální aktivity Ag^+ (upraveno dle Chaloupka a kol., 2010)



TRENDS in Biotechnology

Tabulka 2 - Mechanismy působení nanostrříbra u jednotlivých bakterií (Franci, 2015)

Bakterie	Mechanismus antibakteriálního účinku
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Změna buněčné stěny a cytoplazmy
<i>Escherichia coli</i>	Změna propustnosti membrány a dýchání
<i>Enterococcus faecalis</i>	Změna buněčné stěny a cytoplazmy
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Změna membrány
<i>Listeria monocytogenes</i>	Morfologické změny, oddělení cytoplazmatické membrány od buněčné stěny, plazmolýza
<i>Micrococcus luteus</i>	Změna membrány
Nitrifikační bakterie	Inhibice respirační aktivity
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nevratné poškození bakteriálních buněk, změna propustnosti membrány a dýchání
<i>Proteus mirabilis</i>	Změna buněčné stěny a cytoplazmy
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nevratné poškození bakteriálních buněk
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Inhibice replikace bakteriální DNA, poškození cytoplazmatické membrány, modifikace intracelulárních hladin ATP
<i>Salmonella typhi</i>	Inhibice replikace bakteriální DNA, poškození cytoplazmatické membrány, modifikace intracelulárních hladin ATP
<i>Vibrio cholerae</i>	Změna propustnosti membrány a dýchání

Nanočástice stříbra mohou spolupracovat s membránovými proteiny a aktivovat signální dráhy, což vede k inhibici proliferace buněk. Stříbrné nanočástice mohou vstoupit do buňky skrze difúzi nebo endocytózu a způsobit mitochondriální dysfunkci, generaci reaktivních forem kyslíku (ROS), což vede k poškození proteinů a nukleových kyselin uvnitř buňky a nakonec také k inhibici buněčné proliferace. K oxidačnímu stresu dochází, když generace ROS překročí kapacitu antioxidačního obranného systému buňky. Do oxidačního poškození je zapletena deplece glutathionu a sulfhydrylových skupin vázající proteiny a změny v aktivitě různých antioxidačních enzymů (McShan a kol., 2014).

Stříbrné nanočástice interagují s mikrobiálními buňkami také prostřednictvím produkce reaktivních forem kyslíku, které mohou poškodit buněčné struktury a zapříčinit buněčnou smrt. Poměr povrchu a objemu se zvyšuje s klesající velikostí částic. Proto existuje nepřímá úměra mezi velikostí částic a počtem povrchově orientovaných skupin pokrývajících částice, což je důležité pro definování chemických a biologických vlastností nanočástic, včetně generace ROS. Kromě toho biocidní účinek většiny kovových nanočástic závisí na jejich stabilitě a odolnosti vůči aglomeraci a agregaci. Tyto vlastnosti jsou spojeny se zvýšeným uvolňováním kovových iontů z větších ploch, což má za následek delší dobu pro interakci mezi nanočásticemi a bakteriemi, a tudíž silnější antimikrobiální aktivitu (Schacht a kol., 2013). Kromě antibakteriální aktivity tvoří ROS základní objasnění potenciální toxicity nanostříbra pro člověka (Chaloupka a kol., 2010).

Ve srovnání s běžnými stříbrnými částicemi mají stříbrné nanočástice příznivější antibakteriální a antimykotické vlastnosti, a to díky jejich extrémně velkému povrchu, který umožňuje lepší kontakt s mikroorganismy (Chaloupka a kol., 2010). Nanočástice mění fyzikální a chemické vlastnosti buněčných membrán a buněčnou stěnu a narušují důležité funkce jako je propustnost, osmoregulace, transport elektronů a dýchání. Dále mohou způsobit další poškození bakteriálních buněk. Prostupují do buňky, kde mohou dále interagovat (Schacht a kol., 2013).

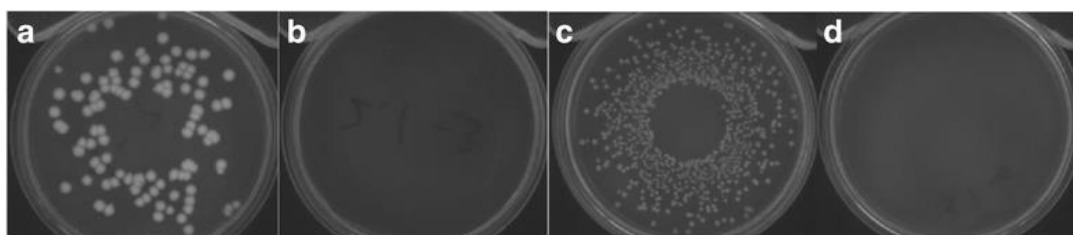
Stříbrný kationt se váže na skupiny obsahující síru, kyslík nebo dusík, které se běžně vyskytují v biomolekulách ve formě thio-, amino- a karboxylových skupin nebo vyměňuje kationty kovů (např. vápenatý a zinečnatý kationt) v biokomplexech (Zítka a kol., 2013). Mezi tyto molekuly patří především proteiny (díky silné afinitě stříbra pro síru) (McShan a kol., 2014). Stříbro navázané na bakteriální DNA inhibuje celou řadu životně důležitých procesů a dále může reagovat s biomolekulami zapojených do respiračního procesu (Zítka a kol., 2013). V případě kmene *Escherichia coli* inhibuje přítomnost stříbra vychytávání fosfátů a uvolňování mannitolu, sukcinátu, prolinu a glutaminu. Proto mohou být nanočástice stříbra používány jako účinný inhibitor růstu různých mikroorganismů (Zhang a kol., 2016).

Problémem zůstává přesné rozlišení, jaký toxický účinek pochází z iontové formy a jaký z nanoformy stříbra (McShan a kol., 2014). Při srovnávací studii nanostříbra, dusičnanu stříbrného a chloridu stříbrného bylo odhaleno, že nanočástice stříbra mají vyšší antibakteriální sílu než volné stříbrné ionty. To naznačuje, že nanostříbro má vlastní

antibakteriální vlastnosti, které nejsou závislé na eluci stříbrných iontů (Chaloupka a kol., 2010).

Některé studie posuzovaly antibakteriální výkonnost nanovláken obsahujících stříbro na grampozitivních a gramnegativních bakteriích. V těchto studiích byly na přípravu nanovláken stříbra použity různé polymery zahrnující Nylon 6 a polyakrylonitril (PAN). Čistý Nylon 6 nemá žádnou antibakteriální aktivitu, ale po přijetí nanočástic stříbra v polymerní matici vykazuje 99,9% inhibici kmene *Escherichia coli* (při koncentraci prekursoru stříbra 0,5 hm.%) a 99,9999% inhibici (při zvýšení koncentrace na 1,25 hm.%). Díky těmto vlastnostem jsou nanovlákná obsahující stříbro vynikajícím adeptem na krytí ran a biotextilní materiály (Zhang a kol., 2016).

Obrázek 5 - Antibakteriální testování kmenů *Bacillus cereus* a *Escherichia coli* (Zhang a kol., 2016)



a, b *Bacillus cereus*; c, d *Escherichia coli*

a, c před; **b, d** po aplikaci Ag/PAN nanovlákný připravenými z plazmy ošetřené roztokem AgNO₃/PAN (koncentrace AgNO₃ 1,25%)

Nanostříbro vykazuje antibakteriální účinky proti velkému počtu bakteriálních druhů. Pyšní se širokospektrální účinností jak proti grampozitivním, tak proti gramnegativním bakteriím. Jelikož mají grampozitivní bakterie silnější buněčnou stěnu, jsou proti jejich růstu nutné vyšší koncentrace stříbra než pro gramnegativní bakterie (Brennan a kol., 2015). Gramnegativní bakterie mají na vnější straně vrstvu lipopolysacharidů a pod ní tenkou (7–8 nm) vrstvu peptidoglykanu. Ačkoli jsou lipopolysacharidy složeny z lipidů, které jsou kovalentně vázány na polysacharidy, tak jim chybí dostatečně tuhý obal. Negativní náboje na lipopolysacharidech jsou přitahovány ke slabým kladným nábojům nanočástic stříbra. Naopak buněčná stěna grampozitivních bakterií se skládá hlavně z tlusté vrstvy (20–80 nm) peptidoglykanu, která se skládá z lineárních polysacharidových řetězců zesíťovaných krátkými peptidy, které spolu tvoří trojrozměrnou pevnou strukturu. Tuhost a rozsáhlé zesíťování způsobují mnohem složitější průnik bakteriální stěnou (Franci a kol., 2015).

Předmětem sporu zůstává, který z mechanismů nanostříbra má hlavní antibakteriální efekt. Nejpravděpodobněji se jedná o kombinovaný efekt, ve kterém se podílí každý antimikrobiální mechanismus (interakce s buněčnou stěnou nebo plazmatickou membránou, bakteriální DNA a proteiny) (Chaloupka a kol., 2010).

Antimikrobiální aktivita nanočástic stříbra se může významně měnit v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech částic, které jsou závislé na přípravě a zpracování. Nejběžnější metodou používanou k testování antimikrobiálních látek je diskový difúzní test (Sheehy a kol., 2015).

Antibakteriální mechanismus nanostříbra byl zkoumán z pohledu proteomiky za použití 2D elektroforézy ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Byly použity proteinové vzorky s nanostříbrem ošetřených buněk kmene *Escherichia coli*. Analýza odhalila, že všechny proteinové prekurzory na zevní membráně (OmpA, OmpC, OmpF) jsou po léčbě nanostříbrem stimulovány, a tím odrážejí kompenzační mechanismus poškození buněčné stěny, které mohou způsobit stříbrné ionty a nanočástice stříbra. Narušení bakteriální stěny a membrány způsobuje rozpad hybné síly protonů a inhibuje syntézu adenosintrifosfátu (ATP) (Chaloupka a kol., 2010).

Biocidní aktivita stříbrných nanočástic závisí na jejich velikosti, tvaru a povrchovém povlaku. Z tohoto důvodu je pro fyziologické aplikace u lidí nezbytný vývoj nanočástic stříbra s řádně kontrolovanými morfologickými a fyzikálně-chemickými vlastnostmi, předtím než se rozšíří mezi biomedicínské aplikace (Wei a kol., 2015).

4.1 Bakteriální rezistence vůči nanostříbru

Bylo prokázáno, že mikroby mají menší sklon k získávání rezistence vůči kovovým nanočásticím ve srovnání s jinými biocidními a antibiotickými látkami. A to hlavně proto, že kov může zkomprimovat část mikroba, a tak by nemuselo dojít k mutacím a vývojovým etapám, díky kterým by mohl mikrob odolávat interakcím. Důsledkem je neomezený potenciál pro vývoj nanočástic a nanomateriálů (Chapman a kol., 2012).

Co se týká stříbra ve velkém formátu, tak jeho rozsáhlé a neregulované používání ve výrobcích ve zdravotnictví, ale i mimo zdravotnictví, vyvolává starosti ohledně rozvoje

bakterií rezistentních vůči stříbru. Existuje jen velmi málo hlášených případů rezistentních bakterií ke stříbru. Patří mezi ně klinické případy kmenů *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* a *Citrobacter freundii* (Sterling, 2014). Determinanty rezistentní ke stříbru jsou často umístěny na mobilních genetických elementech, které mohou být za určitých podmínek horizontálně přeneseny na vyšší frekvence. A to by mohlo diverzifikovat mobilní genetické elementy a šířit nové fenotypy mezi bakteriálními populacemi. Vědci se domnívají, že by pro bakterie bylo obtížné vyvinout rezistenci k nanočásticím stříbra (Durán a kol., 2016). Graves a kol. (2015) naopak uvedli, že bakterie mohou snadno vyvinout rezistenci vůči nanočásticím stříbra, a to prostřednictvím jednoduchých genomických změn. Také navrhli, že by se nanostříbro jako biocidní prostředek mělo používat s opatrností, protože by jeho rozsáhlé používání u mikroorganismů mohlo vyvolat rezistenci.

Vědecký výbor posuzoval, zda použití nanostříbra, zejména v lékařské péči nebo ve spotřebním zboží, může vést k bakteriální rezistenci a dalším rizikům. Existují důkazy o účinku nanočástic stříbra na složení bakteriální flóry a přizpůsobení bakterií spojené s určitými podmínkami a užitím. Bakteriální rezistence byla prokázána také u iontového stříbra. Nicméně důkazy jsou často neúplné a zaměřené na několik konkrétních případů. Takže zatím není dostatek informací o mechanismech odolnosti vůči nanostříbru a je třeba více údajů k lepšímu pochopení bakteriální odpovědi. Byla nalezena geneticky založená bakteriální rezistence na iontové stříbro, zejména se jedná o expresi efluxního systému. Genetické údaje naznačují, že důležitou roli hraje pokles oxidačního poškození způsobené regulací anaerobní respirace. V současné době není k dispozici žádná dokumentace zaměřená na riziko související s šířením mechanismu rezistence, a to představuje velké mezery ve znalostech. Proto by mělo být nalezeno více údajů o mechanismu rezistence a šíření rezistence mezi bakteriemi (SCENIHR, 2014).

5 Toxický efekt nanostříbra

S narůstajícím využitím nanostříbra musí být také věnována pozornost jeho působení na lidský organismus. Stříbro ve formě nanočástic získává větší přístup ke tkáním, buňkám a biologickým molekulám v lidském těle. Možné nežádoucí účinky a toxicita nanočástic stříbra jsou v současnosti rozpoznávány (Chen a Schluesener, 2008). Rostoucí znepokojení vyvolává také potenciální uvolňování nanostříbra do životního prostředí (McShan a kol., 2014).

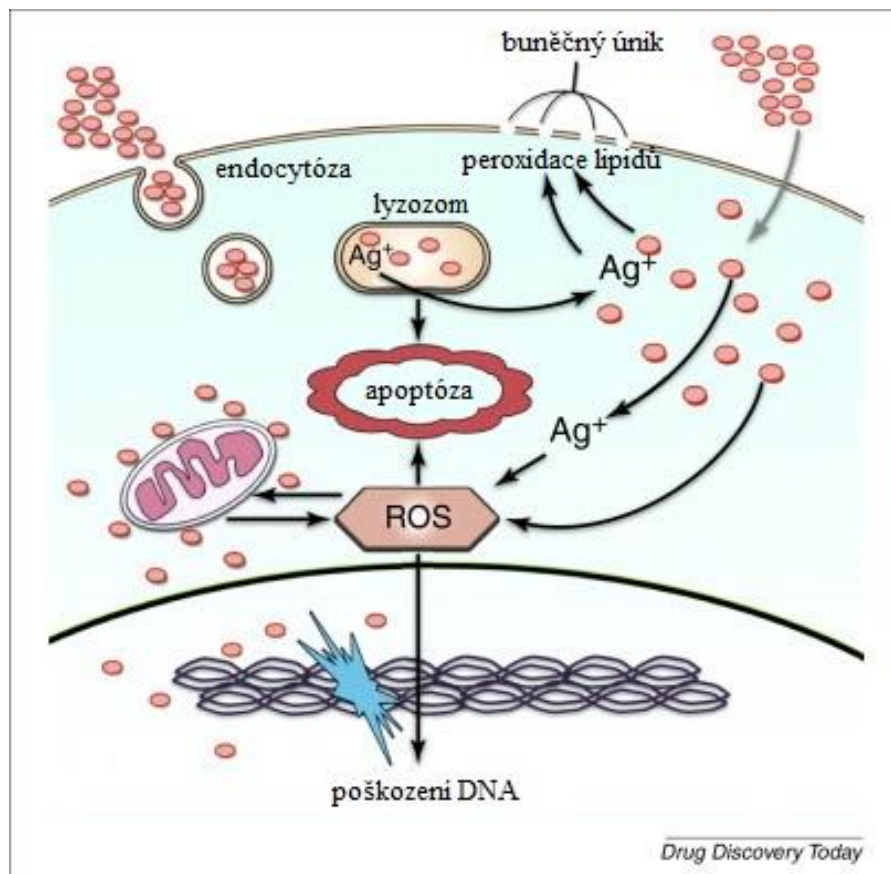
Použití některých antimikrobiálních látek může mít toxický nebo negativní vliv, ale tyto problémy může řešit vývoj a následné začleňování nanočástic do sloučenin (Chapman a kol., 2012). Na cytotoxicitu mají velký vliv velikost a tvar nanočástice, ale také aspekty podílející se na stabilitě nanočástic (jako je povrchový náboj, rozpouštědla nebo polymerní ochranná vrstva) (Řezníčková a kol., 2014). Předpokládá se, že vyšší toxicita nanočástic, v porovnání s makroskopickou formou, je způsobena větším povrchem. Velký povrch nanočástic spolu s povrchovou reaktivitou zvyšuje např. riziko oxidačního stresu. Toxické účinky také velmi záleží na schopnosti nanočástic agregovat či disociovat. Většinou platí, že čím jsou částice menší, tím mají větší toxicitu a vyšší schopnost přecházet přes biologické bariéry. Tyto částice jsou pak schopny pronikat do buněk a ovlivňovat procesy uvnitř buněk. Nanočástice jsou často v organismu adsorbovány bílkovinami, čímž může docházet ke změně jejich reaktivity, distribuce i vylučování (Dohnalová a Dohnal, 2015).

Nanočástice stříbra jsou cytotoxické pro několik typů buněk včetně lidských mononukleárních buněk periferní krve, lidské alveolární epiteliální buněčné linie (A549), myší a lidské alveolární makrofágové buněčné linie, neurokrinních buněk, buněčné linie krysích jater a myších zárodečných buněk (Naidu a kol., 2015). Velký počet studií *in vitro* ukazuje, že stříbrné nanočástice jsou toxické pro savčí buňky odvozené z kůže, jater, plic, mozku, cévního systému a reprodukčních orgánů (Ahamed a kol., 2010). Přičemž hlavními cílovými orgány jsou slezina, játra a ledviny. Nedávné údaje ukazují, že stříbro může přetrvávat v mozku a varlatech. U distribuce stříbra do mozku není jasné, jestli je stříbro přítomné v mozkové tkáni nebo je omezeno pouze na endotel mozku (Hartemann a kol., 2015).

Jedna ze studií zkoumala biologický účinek a tkáňovou biodistribuci nanočástic stříbra (velikost 12 nm) pomocí experimentů akutní (jedna expozice) a subakutní (mnohonásobná expozice v průběhu 30 dnů) toxicity u krys. Bylo prokázáno, že nanostříbro nemá za následek zvířecí letalitu a toxické příznaky. Tělesná hmotnost krys, hmotnosti vnitřních orgánů, příjem vody a potravy, pohybová aktivita a rysy chování zůstaly po ošetření stejné jako u kontrolní skupiny. Pitva neodhalila žádnou patomorfologii vnitřních orgánů a ve všech časových bodech nebyly nalezeny žádné významné rozdíly u měřených hematologických ukazatelů a biochemických parametrů u všech skupin zvířat. Stříbro se vstřebává z gastrointestinálního traktu a je distribuováno krevním oběhem do různých sekundárních orgánů. Játra a ledviny jsou hlavními cílovými orgány pro stříbrné nanočástice. Nicméně množství nahromaděného nanostříbra je zanedbatelné ve srovnání s aplikovanou dávkou, což naznačuje, že je stříbro z krys vylučováno efektivně. Celkově lze říci, že stříbrné nanočástice jsou distribuovány různými orgány bez výrazných toxických účinků (Hendrickson a kol., 2016).

Ačkoliv jsou podrobnosti o jejich mechanismu toxicity nejasné, je naznačeno, že nanočástice stříbra jsou v buňkách ionizovány, což vede k aktivaci iontových kanálů a změně propustnosti buněčné membrány pro draslík a sodík (Naidu a kol., 2015). Některé studie ukázaly, že tyto částice mohou pravděpodobně indukovat geny, které jsou spojené s progresí buněčného cyklu, poškozením DNA a apoptózou v lidských buňkách. Možné mechanismy toxicity nanostříbra zahrnují navození ROS, oxidační stres, poškození DNA a apoptózu, kdy generace ROS a oxidační stres se zdají být nejpravděpodobnějšími mechanismy toxicity nanostříbra. K oxidačnímu stresu dochází, když tvorba ROS překročí kapacitu mechanismu antioxidační obrany. Do oxidačního poškození jsou zapojeny deplece glutathionu, na proteiny vázané sulfhydrylové skupiny a změny v aktivitě různých antioxidačních enzymů svědčících o peroxidaci lipidů. ROS a oxidační stres vyvolávají celou řadu buněčných událostí včetně stresu, zánětu, poškození DNA a apoptózy. Jako citlivé cíle se zdají být mitochondrie. Nanočástice stříbra inhibují funkci mitochondrií, následně dochází k jejich poškození, což indukuje apoptózu. Kromě toho studium biodistribuce a toxicity na potkanech ukázalo, že inhalované, požitá a intraperitoneálně podaná nanočástice stříbra byly následně detekovány v krvi a způsobily toxicitu v několika orgánech včetně mozku (Ahamed a kol., 2010).

Obrázek 6 - Možné mechanismy cytotoxicity nanočástic stříbra (upraveno dle Wei a kol., 2015)



Data ze studie, která se zabývala cytotoxickým účinkem nanočástic stříbra na testikulární tkáň, ukazují, že nanostříbro uplatňuje svůj škodlivý účinek pomocí snižování endokrinního postavení na úrovni hypofýzy a varlat, zvyšování oxidačního a nitrosačního stresu, snižování regulace exprese a biosyntézy chaperonového proteinu teplotního šoku Hsp 70-2, zvýšení poškození RNA v testikulárních buněčných liniích a snížení kvality spermatu. Se snížením antioxidační kapacity a exprese proteinu Hsp 70-2 souvisí zvýšení nitrosačního stresu, který vede k vážným poškozením DNA, RNA a proteinů u buněk varlat i spermií (Rezazadeh-Reyhani a kol., 2015).

Z práce studující interakce nanostříbra s lidskými kožními fibrinoblasty, bylo zjištěno, že se nanostříbro hromadí mimo mitochondrie a způsobují přímé poškození mitochondrií, ruší funkci dýchacího řetězce, což vede k tvorbě ROS a oxidačního stresu. Také bylo nadneseno, že narušení mitochondriálního dýchacího řetězce nanostříbrem zvyšuje produkci ROS a přerušuje syntézu ATP, což vede k poškození DNA. Ze studie mechanismu toxicity nanostříbra u buněčné linie NIH3T3 fibrinoblastů bylo zjištěno, že léčba nanostříbrem indukuje uvolňování cytochromu c do cytosolu a translokaci Bax do mitochondrií, což

naznačuje, že nanostříbro působí prostřednictvím ROS a C-Jun N-terminální kinázy indukcí apoptózy přes mitochondriální dráhu (Hsin a kol., 2008). Interakce nanostříbra s DNA vede k zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi. Nanostříbro indukuje zástavu G1 fáze a blokuje úplně S fázi, z toho důvodu indukuje apoptózu (McShan a kol., 2014).

Vzhledem k tomu, že stříbrné nanočástice uvolňují stříbrné ionty ve vodné fázi, je nezbytné rozlišovat toxické účinky nanočástic a rozpuštěného iontového stříbra. Rozdíly mezi jejich účinky nejsou jednoznačné. Nanočástice stříbra mohou fungovat jako „trojský kůň“, který obchází typické bariéry a poté uvolní stříbrné ionty, které poškozují buněčný aparát. Je zajímavé, že byla oznámena podobná cytotoxicita, apoptóza a geny zodpovědné za navození stresu pro stříbrné ionty a nanočástice. Případně může být příčinou kombinace obou. Nanostříbrné částice vedou k poškození buněk a DNA, stejně jako ke karcinogennímu a oxidačnímu stresu, indukují geny související s regulací kovové detoxikace a metabolismu a akce radikálového čištění. Stříbrné ionty vedly k indukci zánětlivé reakce a procesům kovové detoxikace, ale měly za následek celkově nižší stresovou odpověď v porovnání s nanočásticemi. Jiné studie navrhy, že nanočástice nezávisle na volných stříbrných iontech vyvolávají toxicitu (Ahamed a kol., 2010). Je očividné, že oba přispívají k toxicitě, ale je důležité zvážit některé druhotné produkty nanostříbra, jako jsou například částice vázající se na bílkoviny a DNA. Interakce nanostříbra s proteiny, nukleovými kyselinami a buněčnou membránou přispívají k toxicitě. Nicméně by mělo být zjištěno, která biologická makromolekula se hlavně podílí na toxicitě nanostříbra a jaké klíčové enzymy nebo signální dráhy se na mechanismu toxicity také podílejí. Proto by toxické účinky nanostříbra měly být dále hlouběji přezkoumány (McShan a kol., 2014).

Zdravotní účinky stříbra a stříbrných sloučenin byly přezkoumány z pohledu profesní expozice. Bylo určeno, že kovové stříbro má minimální zdravotní riziko. Nicméně jakmile dosáhne nanorozměru, tak vykazuje značnou toxicitu vůči savcím buňkám, i když jsou ve velkém formátu biochemicky inertní a biokompatibilní (Chen a Schluessener, 2008).

In vivo byla prozkoumána biodistribuce, zpracování a toxicita nanostříbra. Dobrovolníkům byla podávána dávka 100 až 480 µg nanočástic stříbra denně. Čtrnáctidenní orální dávkování nezpůsobilo žádné zjevné metabolické a hematologické změny a také žádné změny v močovém profilu, fyzickém stavu nebo morfologii. Nebyly zjištěny žádné klinicky důležité markery toxicity a žádné významné změny v generaci prozánětlivých cytokinů

a reaktivních forem kyslíku. Proto autoři došli k závěru, že v provedených testech neexistuje detekovatelná toxicita způsobená nanostříbrem (Munger a kol., 2014).

Po delší expozici stříbrem nebo jeho sloučeninami se mohou vyvinout nezvratné modré pigmentace kůže a oka, a to argyrie a argyróza. Ačkoliv patří mezi široce známé léze, tak jejich mechanismus není stále znám (McShan a kol., 2014). Modré zbarvení by mohlo být způsobeno fotoredukcí chloridu stříbrného nebo fosforečnanu stříbrného v kůži. Argyrii lze rozdělit na lokální a systémovou. Lokální argyrie se vyskytuje na kůži a sliznici po delším lokálním působení sloučenin, které obsahují stříbro (např. náušnice, zubní výplně). Naopak systémovou argyrii charakterizuje zbarvení celé kůže a sliznic (Sterling, 2014).

Toxikologické výzkumy naznačují, že mezi hlavní faktory ovlivňující cytotoxicitu nanostříbra patří doba, dávka, teplota, velikost částic, tvar, povrchový povlak a typ buňky. Obecně platí, že toxicita nanomateriálů souvisí s jejich reaktivitou, která závisí na velikosti nanočástice. Byly vytvořeny studie k dosažení stabilních nanočástic a snížení možného rizika nanočástic stříbra na lidské buňky a životní prostředí. Tenká vrstva oxidu křemičitého, která potahuje nanočástice stříbra, zachovává jejich výkonnost a minimalizuje jejich toxicitu tím, že blokuje uvolňování iontů a kontakt s buňkami a bakteriemi (Wei a kol., 2015).

In vitro studie ukazují, že produkce cytokinů makrofágy může být vyvolána nanostříbrem. Avšak *in vivo* studie jednoznačně neprokázala, že by orální expozice stříbrnými nanočásticemi vedla ke změnám nespecifické imunitní odpovědi. Některé *in vitro* studie ohlásily genotoxické účinky nanostříbra. Sporné výsledky mohou být vysvětleny rozdíly ve tvaru a vrstvě nanočástic, použitím typu buněk, buněčném příjmu, intracelulárním rozpouštění, koncového bodu genotoxicity a způsobu, jakým byly buňky vystaveny účinku nanočástic. Vzhledem k malému počtu těchto studií jsou nutné další studie k odhalení, zda mohou být nanočástice stříbra genotoxické *in vivo* (Hartemann a kol., 2015).

Ačkoliv bylo zveřejněno mnoho toxikologických studií zabývajících se využitím nanočástic stříbra, stále je obtížné učinit jednoznačný závěr o jejich toxicitě. Lze konstatovat, že stříbrné nanočástice mohou mít rozdílné toxikologické vlastnosti vzhledem k různým metodám jejich syntézy, jejich různé velikosti, přítomnosti nebo absenci stabilizujících činidel, k různým organismům a kulturám buněk. Z tohoto důvodu by jejich rizika měly být posuzovány v konkrétních případech (Wei a kol., 2015).

6 Využití nanostříbra v praxi

Stříbro je používáno kvůli svým antimikrobiálním účinkům již po staletí. Dnes je stříbro a jeho nanočástice používáno v širokém rozsahu ve zdravotnictví, potravinářství, textilním průmyslu, stavitelství, v dezinfekčních prostředcích, ale i v domácím spotřebním zboží (Mailard a Hartemann, 2013).

6.1 Historie využití stříbra

Spolu se zlatem, dalším vzácným kovem, je stříbro využíváno v lidské historii již několik tisíc let. V antice byly používány stříbrné nádoby za účelem uchování vody a vína, ačkoliv vlastnosti stříbra ještě nebyly pochopeny (Chen a Schluesener, 2008).

Použití stříbra pro léčebné účely bylo poprvé zdokumentováno roku 750 n.l., ale pravděpodobně mohlo být používáno již dříve. V 17. století bylo stříbro popisováno jako víceúčelový léčebný prostředek a bylo používáno k léčení epilepsie a cholery (Mailard a Hartemann, 2013). Na přelomu 19. století si lékaři uvědomili, že stříbro nejen chrání rány před získáním infekce, ale také zjistili, že podporuje epitelizaci (Chapman a kol., 2012).

Ale hlavně sloučeniny stříbra pronikly do lékařské praxe. V roce 1884 německý porodník F. Crede zavedl 1% dusičnan stříbrný jako oční kapky k prevenci neonatálního gonokokového očního zánětu, což je pravděpodobně první vědecky zdokumentované využití stříbra. Dosud aktuálně používaný stříbrný sulfadiazinový krém byl součástí standardní antibakteriální léčby v oblasti popálenin (Chen a Schluesener, 2008).

Na počátku dvacátého století zavedl chirurg W. D. Halstead používání obvazu se stříbrnou fólií. Ve stejné době vynalezl A. C. Barnes Argyrol jako lokální antiseptikum, zvláště jako ochranu proti infekcím oka (Mailard a Hartemann, 2013).

Objev penicilinu (1928), který podporoval nové možnosti léčby infekce, způsobil snížení zájmu o aplikace stříbra (Chapman a kol., 2012). K obnovení zájmu o baktericidní účinky stříbra došlo v době, kdy závažným problémem pro lékařskou praxi byla rostoucí rezistence bakterií vůči antibiotikům (Kvítek a kol., 2009). Stříbrné sloučeniny byly hlavní zbraní proti infekcím ran ve druhé světové válce, ještě před nástupem antibiotik (Chen a Schluesener, 2008).

V 70. letech 20. století bylo zkoumáno použití dusičnanu stříbrného (0,5%) v obvazech pro léčení popálenin, které fungovaly dobře ke kontrole infekcí způsobených kmenem *Pseudomonas aeruginosa*, ale postupný vývoj bakteriální rezistence na dusičnan stříbrný vyzval ke změně složení a použití stříbrného sulfadiazinu (kombinace stříbra a sulfoamidů) (Mailard a Hartemann, 2013).

6.2 Současné využití nanostříbra

Tabulka 3 - Příklady využití stříbra a AgNPs (Mailard a Hartemann, 2013)

Zdravotnictví	Obvazy na rány, antiseptika, nemocniční lůžka a nábytek
Domácí a spotřební zboží	Aviváže, nádoby na uskladňování potravin, kuchyňská prkénka, ložní matrace, vysavače, jednorázové závěsy a žaluzie, nádobí, koupelnové produkty, nábytek, kuchyňské zařízení, myčky, ledničky, pračky, WC nádrže, WC sedátka, zásobníky na led, plastové nádobí, kartáče na vlasy, žehličky na vlasy, koupací čepice, zubní pasty, deodoranty, zubní kartáčky, papírové kapesníčky, holící strojky, toalety pro zvířata, podestýlky, papír, pera a tužky, dálkové ovládání, tlačítka bankomatů, madla v autobusech, počítačové klávesnice, podložky na cvičení, povlaky na kalkulačkách, automaty na prodej jízdenek, laminátové fólie, kancelářské potřeby, ventilátory
Oblečení a tkaniny	Kojenecké oblečení, spodní prádlo, ponožky, obuv, různé tkaniny a vinyly, osušky, deky, spací pytle, funkční prádlo, ložní prádlo, polštáře, matrace
Stavitelství	Nátěry, nástěnné barvy, klimatizace, epoxidované pryskyřicové podlahy, PVC obložení, antimikrobiální podlahy, stropní zavěšovací systémy, okenní žaluzie a stínící systémy, police, ozdobné dřevěné lamináty, elektroinstalační materiály, obklady, hygienické laminátové povrchy, tapety, koberce, podložky, těsnění ve dveřích a mrazících zařízeních, hnětací stroje, nemocniční dveře, vibrační síta ve farmaceutickém průmyslu
Potravinářství	Obaly, nanobiotická produkce drůbeže
Dezinfekce	Zemědělské a průmyslové dezinfekční prostředky, dezinfekce vody a bazénů

Hlavní směrem vývoje nanostříbrných produktů je jejich pozoruhodně silná antimikrobiální aktivita. Na trhu je dostupná široká škála produktů. V oblasti každodenního života je stříbro obsažené např. v pokojových sprejích, pracích práscích, prostředcích na čištění vody a malbách. Stříbrné nanočástice jsou také obsaženy v textiliích pro výrobu oděvů, spodního prádla a ponožek. Existují pračky, které využívají nanostříbro. V zahraničí jsou produkty nanostříbra v potrubním vedení (Chen a Schluesener, 2008).

Nanočástice stříbra jsou začleněny do domácích spotřebičů (obložení do lednic, praček), kosmetiky a hygienických produktů (krémy, mýdla, deodoranty, zubní kartáčky a zubní pasty), dále do příborů, ploch přicházejících do styku s potravinami, hraček, čističů vzduchu a vody (Chapman a kol., 2012). Mimoto jsou nanočástice stříbra používány jako antimikrobiální látky na veřejných místech v Číně, kde údajně vykazují dobrý baktericidní účinek (Naidu a kol., 2015). Vedle toho se se stříbrné nanočástice zapojují do průmyslových procesů jako katalyzátory a jsou využívány v elektronice a optice (Hendrickson a kol., 2016).

6.3 Nanostříbro v lékařství

Vývoj bakterií odolných k antibiotikům jako je MRSA vedl k výraznému výzkumu zaměřenému na hledání nového antibakteriálního činidla. Jako slibná alternativa bylo navrženo nanostříbro, které se pyšní širokým spektrem účinnosti proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím, včetně bakterií rezistentních na antibiotika jako je MRSA a MRSE (Sheehy a kol., 2015).

Nanostříbro má nejen rozsáhlou antimikrobiální aktivitu, ale má také protizánětlivý účinek a urychluje hojení ran. Díky tomu jsou nanočástice stříbra vhodné pro několik biomedicínských aplikací, jakou jsou např. implantační zařízení, katétry a obvazy (Sintubin a kol., 2012).

Výzkum nových lékařských aplikací nanostříbra je velmi aktivní. V současné době je na trhu celá řada komerčně dostupných produktů, které shrnuje Tab.3 (Chaloupka, 2010).

Tabulka 4 - Příklady lékařských produktů obsahujících nanostříbro (Chaloupka, 2010; ConvaTec, 2016; HenrySchein, 2016)

Produkt	Společnost	Popis	Klinické použití
Acticoat™	Smith & Nephew	Obvazy na rány z nanokrystalického stříbra	Obvaz pro celou řadu ran včetně popálenin a vředů; brání bakteriální infekci a zlepšuje léčení rány.
Silverline®	Spiegelberg	Polyuretanový ventrikulární katétry napuštěné nanostříbrem	Neurochirurgický odtok mozkomíšního moku při hydrocefalu. Antibakteriální AgNPs povlak brání infekcím.
Aquacel® Ag	ConvaTec	Krytí k hojení infikovaných a exsudujících ran	Krycí materiál určený pro léčbu diabetických vředů, popálenin, bércových vředů a dekubitů.
SilvaSorb®	Medline Industries and AcryMed	Antibakteriální produkty: gely na ruce, obvazy na rány, výplně dutin	Obvazy na rány a výplně dutin brání bakteriální infekci. Gely na ruce se používají k dezinfekci kůže pro klinické a osobní hygienické účely.
ON-Q SilverSoaker™	I-Flow Corporation	Katétr potažený nanostříbrem pro podávání léků	Dodávání léků (např. lokální anestetika nebo analgetika) proti per-, peri- nebo pooperačním bolestem nebo k léčbě antibiotiky.
Silvrstat®	ABL Medical	Antibakteriální hydrogel na rány	Zabíjení bakterií a hojení ran, včetně vředů, popálenin a tržných ran.

Implantační prostředky jsou hlavním rizikovým faktorem nozokomiálních infekcí. K dispozici jsou dva typy implantačních invazivních nástrojů, a to nástroje, které jsou celé implantované v těle pacienta a nástroje vystavené vnějšímu prostředí, které jsou umístěny částečně uvnitř těla. Plně implantované zařízení jako jsou srdeční chlopně, mohou být během implantace kontaminovány. Aby se zabránilo infekci, vyžadují antibiotickou léčbu po dobu několika prvních dní po operaci. Naproti tomu zařízení jako jsou močové a venózní katétry, jsou náchylné k bakteriální kolonizaci díky kontinuální expozici s vnějším prostředím. Zvýšené riziko infekce v klinické praxi omezuje použití katétrů potažených vrstvou stříbrných nanočástic (Chaloupka a kol., 2010).

Ideální vlastnosti antibakteriálního povlaku zahrnují dlouhodobou aktivitu, vysoký stupeň baktericidní a bakteriostatické aktivity, schopnost působit proti širokému spektru bakterií, biokompatibilitu a nízkou *in vivo* toxicitu. Kromě toho by měl být povlak levný, reprodukovatelný a disponibilní, aby se minimalizovalo poškození životního prostředí. Pro použití kardiovaskulárních aplikací (např. stenty a žilní katetry) musí antimikrobiální nátěr vykazovat příslušnou hemokompatibilitu k prevenci trombózy (Chaloupka a kol., 2010).

Obrázek 7 - Aplikace nanočástic stříbra v lékařství (upraveno dle Naidu a kol., 2015)



6.3.1 Kardiovaskulární implantáty

V roce 1998 navrhl Silzone umělé silikonové srdeční chlopně potažené elementárním stříbrem ke snížení výskytu následné endokarditidy po výměně chlopní. Nicméně tyto srdeční chlopně byly po 4 letech testování staženy z důvodu zvýšené frekvence paravalvulárního leaku u pacientů účastnících se studie (Chaloupka a kol., 2010).

V současné době nabízí použití nanostříbra funkční alternativu, která poskytuje bezpečné, netoxické antibakteriální povlaky na rozdíl od kovového stříbra, které může způsobit precitlivělost a inhibovat normální funkci fibroblastů (Ge a kol., 2014).

Byl syntetizován nový nanokompozitní materiál na bázi uhlíku (podobnému diamantu) s nanostříbrem o velikosti 4 nm usazeným do matrice a byly zkoumány hemokompatibilní vlastnosti při jeho použití jako povrchového povlaku kardiovaskulárních zdravotnických prostředků (např. srdeční chlopně a steny) (Andara a kol., 2006). Studie prokázaly snížení přichycení trombocytů na povrch nanokompozitu. Trombocyty, které adherovaly, byly náhodně distribuovány, což naznačuje na to, že materiál má antitrombotické vlastnosti. Autoři také předpokládali, že bude mít materiál vlastní antibakteriální vlastnosti, ale ty nebyly potvrzeny (Chaloupka a kol., 2010).

6.3.2 Cévní náhrady

Díky svým unikátním fyzikálně-chemickým a biologickým vlastnostem vytváří nanostříbro nové možnosti pro výrobu účinnějších cévních náhrad. Povrchy cévních štěpů se pokrývají speciálním nanofilmem z polymeru nebo biopolymeru modifikovaným nanostříbrem, které zajistí výborné antimikrobiální účinky. Při porovnání jejich účinku na gramnegativní a grampozitivní bakterie byla pozorována vyšší účinnost v případě gramnegativních bakterií. Kromě pozitivního účinku je také nutné sledovat toxicitu takto upravených cévních náhrad. Klinická studie testující toxicitu cévních náhrad obohacených stříbrem u padesáti pacientů odhalila, že takto modifikované cévní náhrady jsou srovnatelné s běžně používanými náhradami a neobjevují se při jejich použití nežádoucí účinky (Zítka a kol., 2013).

6.3.3 Centrální žilní katétry

Centrální žilní katétry jsou běžně používanými zařízeními v nemocnicích u akutně nemocných pacientů. Mohou být kolonizovány mikroorganismy, které mohou rychle tvořit vrstvu biofilmu. Bakteriální kolonizace je prekurzorem infekcí krevního řečiště, které jsou spojeny se značnou nemocností, úmrtností, prodlouženým pobytem v nemocnici a zvýšenými náklady. Proto se antimikrobiální látky začleňují do katétrů ve snaze snížit výskyt bakteriální kolonizace a infekce. Při impregnaci katétrů antibiotiky existuje riziko případné bakteriální rezistence. Proto začaly být používány katétry impregnované stříbrem a později i nanostříbrem (Naidu a kol., 2015).

Většina polyuretanů zavedených jako plastové katéetrové trubice mohou být snadno potaženy vrstvou nanostříbra za vzniku účinných antimikrobiálních katétrů. *In vitro* testování

odhalilo účinnou inhibici růstu biofilmu a prodloužený účinek po dobu minimálně 72 hodin. 10-ti denní *in vivo* studie potvrdila, že katétr pokrytý nanostříbrem není toxický (Chaloupka a kol., 2010).

Nedávno byly představeny antibakteriální katérové povlaky pro akutní dialýzu, které byly získány inovativní a patentovanou technikou depozice stříbra. Povrch katétrů je obohacen stříbrnými nanočásticemi fotoredukční depozicí. Tento materiál se vyznačuje dobrou stabilitou a vysokou účinností proti kmenu *Escherichia coli* (Naidu a kol., 2015).

6.3.4 Neurochirurgické katétrů

V neurochirurgii se používají katétrů pro odtok přebytečného mozkomíšního moku (CSF), který může vést k mozkové hypertenzi a poškození mozku. Neurochirurgické katétrů mohou být plně implantovány a trvale použity k odklonu likvoru nebo mohou být dočasně použity jako vnější drenážní zařízení. Obě tyto aplikace jsou náchylné k bakteriální infekci, která se může šířit do mozku a okolních mozkových plen. Mezi původce patří *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus epidemidis*. Díky svým vynikajícím antimikrobiálním vlastnostem, nedostatku pozorované toxicity a schopností redukovat výskyt bakteriální infekce a komplikací během chirurgického zákroku, se nanostříbro rychle stává součástí neurochirurgických aplikací (Chaloupka a kol., 2010).

Společnost Spiegelberg nabízí několik druhů neurochirurgických katétrů k odtoku mozkomíšního moku. V klinické praxi se používají při subarachnoidálním krvácení, traumatickém poranění mozku a akutním hydrocefalu. Katétrů jsou vyrobené z polyuretanu, ve kterém je začleněno stříbrné aditivum určené k omezení možnosti ohrožení povrchu katétrů mikroorganismy (Spiegelberg, 2015).

Obrázek 8 - Ventrikulární katétr Silverline® (Spiegelberg, 2015)



V klinické studii pacientů s akutním okluzivním hydrocefalem, u kterého blokování komorového systému způsobí komorovou dilataci a zvýšení nitrolebního tlaku, byly použity vnější ventrikulární odtokové katétrů impregnované nanostříbrem k určení, zda je nanostříbro prospěšné v prevenci ventrikulitidy spojené s katétrů (CAV). Ventrikulitida je zánět komory mozku s pozitivními mozkomíšními kulturami. V jedné studii obdrželo 19 pacientů katétrů impregnované nanostříbrem a byli hodnoceni retrospektivně proti kontrolní skupině pacientů, která obdržela normální katétrů. Z této skupiny pacientů bylo 5 z 20 pozitivních na CAV. Ve skupině pacientů s impregnovanými katétrů se neobjevil ani jeden případ CAV a všech CSF kultury byly negativní. Tímto způsobem byla prokázána účinnost nanostříbra v prevenci ventrikulitidy (Chaloupka a kol., 2010).

6.3.5 Kostní cement

Kostní cement se používá k bezpečnému přichycení kloubních protéz, například při náhradě kyčelního nebo kolenního kloubu. Frekvence výskytu infekce u úplných kloubních náhrad je vysoká (1–4%). Použití kostních cementů s antibiotiky výrazně snižuje frekvenci výskytu infekce na hodnoty mezi 0,4–1,8%. Ale spoléhání se na antibiotika je nežádoucí kvůli rychlému rozvoji bakteriální rezistence. Proto se do kostního cementu z polymethylmethakrylátu (PMMA) začalo přidávat nanostříbro. Kostní cement z PMMA pokrytý nanostříbrem snižuje výskyt rezistence, má impozantní antibakteriální aktivitu *in vitro* a nízkou cytotoxicitu, která nebyla prokázána u myších fibroblastů a lidských osteoblastů, což poukazuje na dobrou biokompatibilitu (Chaloupka a kol., 2010).

In vitro studie srovnávala prostý cement, kostní cement naložený nanostříbrem a kostní cement s gentamycinem. Pouze nanostříbrný cement vykazoval vysokou antimikrobiální účinnost proti kmenům *Staphylococcus epidermidis*, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) a methicilin-rezistentní *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). Gentamicinový cement nebyl účinný proti MRSA a MRSE kvůli vysoké úrovni rezistence testovaných kmenů ke gentamicinu. Běžný cement neinhiboval proliferaci žádného z testovaných kmenů (Alt a kol., 2004).

Jiná studie využila tiopronin (sloučenina obsahující thiolovou skupinu) jako stabilizační činidlo kostního cementu s nanostříbrem. Tiopronin poskytl vynikající stabilitu pro nanostříbro v kombinaci s dobrou antimikrobiální účinností, aniž by ovlivňoval mechaniku cementu nebo vyvolával cytotoxicitu (Brennan a kol., 2015).

Nanočástice stříbra byly také přidány do polyethylenu o ultra vysoké molekulové hmotnosti, který byl použit pro zhotovení destiček pro úplnou kloubní náhradu. Bylo zjištěno, že stříbrné nanočástice drasticky snižují opotřebení a trhání polymeru (Ge a kol., 2014).

6.3.6 Obvazy na rány

Nejlépe zdokumentovanou a běžnou aplikací nanostříbra je jeho použití u obvazů na rány (Naidu a kol., 2015). Nanostříbro se úspěšně používá pro přípravu antibakteriálních obvazů, přičemž publikované studie potvrzují, že při ošetření obvazů nanostříbrem klesají počty mikrobů v ranách o čtyři až pět řádů za 24 hodin, což s antibiotiky není vůbec dosažitelné (Zítka a kol., 2013). Nanokrystalové stříbrné obvazy jsou používány pro léčbu různých ran včetně popálenin, toxické epidermální nekrolýzy, Steven-Johnsonova syndromu, chronických vředů a onemocnění Pemphigus. Typické obvazy obsahují dvě vrstvy polyethylenového pletiva, které tvoří sendvič okolo vrstvy polyesterové gázy. Typické nanokrystalové povlaky jsou 900 nm tlusté s velikostí krystalů 10–15 nm a jsou aplikovány do polyesterové vrstvy. S postupným výzkumem jsou vyráběny nové nanostříbrné obvazy s cílem zvyšování antibakteriální účinnosti a podpory hojení ran (Chaloupka a kol., 2010). Stříbrné nanočástice usnadňují proliferaci a migraci keratinocytů, snižují tvorbu kolagenu fibrinoblasty a modulují počet produkovaných cytokinů (Naidu a kol., 2015).

Nanostříbro vykazuje lepší účinky v podpoře hojení a dosahuje lepších kosmetických výsledků ve srovnání s běžně používanými sloučeninami stříbra, které se používají již mnoho let (Naidu a kol., 2015). Studie také ukázaly, že nanostříbrné obvazy mají vyšší antimikrobiální účinek než obvazy obsahující stříbro velkého formátu (Brennan a kol., 2015). Klinické pokusy vyhodnotily lepší hojící schopnosti nanostříbrných obvazů v léčbě popálenin, v porovnání se sulfadiazinem stříbrným a obyčejnými obvazovými gázami. Jedna studie testovala účinnost nanokrystalového stříbra ve srovnání s kontrolní skupinou dostávající běžný obvaz se stříbrným sulfadiazinem. Obvazy s nanostříbrem výrazně snížily čas potřebný k hojení ran v průměru o 3,35 dnů a zvýšily bakteriální clearance z infikovaných ran. Současně nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky. Jiná studie zkoumala tyto obvazy při léčbě popálenin II. stupně. Výsledky jednoznačně prokázaly, že obvazy obsahující nanostříbro mají vyšší kvalitu v redukci času hojení u povrchových popálenin než obvaz s sulfadiazinem stříbrným a prostá gáza. Nicméně ve srovnání s 1% stříbrným sulfadiazinem nebyl nalezen žádný rozdíl v hojení hlubokých popálenin, což demonstruje, že nanostříbro urychluje reepitelizaci, ale ne další fáze hojení ran spojené s tvorbou nové tkáně jako je například angiogeneze a proliferace (Chaloupka a kol., 2010).

Obrázek 9 - Nanočástice stříbra v obvazových materiálech Acticoat (Smith&Nephew, 2016)



Prvním komerčně dostupným obvazem se stal Acticoat[®], který se skládá ze dvou vrstev esterů polyamidu pokrytých nanokrystalickým stříbrem (Naidu a kol., 2015). V současné době nabízí společnost Smith&Nephew několik druhů těchto obvazových materiálů, u kterých byl *in vitro* prokázán účinek proti grampozitivním, gramnegativním a houbovým patogenům ran včetně MRSA. Antibakteriální efekt přetrvává až 7 dní, ničí bakterie do 30 minut, bakterie mají málo času se množit, což zajišťuje rychlou kontrolu nad infekcí. Obvazy se snadno aplikují a mohou být použity na různé akutní a chronické rány včetně proleženin, diabetických vředů a popálenin (Smith&Nephew, 2016).

Jednou z vedoucích světových společností v oboru hojení ran je společnost ConvaTec. Mezi jejich nejnovější řadu výrobků patří Aquacel[®]. Základem této řady je krycí materiál Hydrofiber[®], který zajišťuje rychlé hojení rány ve vlhku, tím že se po styku s výpotkem z rány mění v gel a tím se rána udržuje vlhká. Do této řady patří i krycí materiál obohacený o ionty stříbra, díky nimž působí baktericidně a bakteriostaticky. Hodí se na rány chronické (diabetické vředy, proleženiny, bércové vředy, onkologické rány, operační rány) i akutní (popáleniny II. stupně, chirurgické a traumatické rány), ale také k ošetření drobnějších ran bez dohledu lékaře (Aquacel, 2013).

6.3.7 Další využití v lékařství

Mezi další možné využití nanostříbra v lékařské praxi patří chirurgické síťky potažené nanočásticemi stříbra. Chirurgické síťky se používají k překonání rozsáhlých ran a pro opravy tkání. I když jsou tyto síťky účinné, tak jsou náchylné k mikrobiálním infekcím. Polypropylenové síťky potažené stříbrnými nanočásticemi mají dobrou antimikrobiální aktivitu a mohou být považovány za ideálního adepta pro použití jako chirurgický materiál. Nanočástice stříbra jsou také považovány za širokospektré činidlo proti různým virovým kmenům včetně HIV-1, viru hepatitidy B, respiračního syncyciálního viru, viru herpes simplex typu 1 a viru Monkeypox (Naidu a kol., 2015). Například *in vitro* bylo prokázáno, že nanočástice stříbra interagují s virem HIV-1 a inhibují jeho schopnost se vázat na hostitelské buňky (Ahamed a kol., 2010).

Stříbrné nanočástice nacházejí také uplatnění v dentálních nástrojích a obvazech v zubním lékařství. U dentální pryskyřice se začleněným nanostříbrem byl prokázán dlouhodobý inhibiční účinek proti kmenu *Streptococcus mutans*. Také byly odhaleny

antibakteriální účinky této pryskyřice na ústní streptokoky. Nanočástice stříbra v dentálních lepidlech jsou také velmi účinné proti streptokokům bez vlivu na mechanické vlastnosti lepidla, takže je umožněno jejich použití v ortodontii (Ge a kol., 2014). Kromě toho Magalhaes a kol. (2012) demonstrovali začlenění nanostříbra do endodontických náplní, kdy tyto materiály ukázaly vylepšené antibakteriální účinky proti kmenům *Streptococcus milleri*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*.

Důležité je také upozornit na nově vznikající aplikace stříbrných nanočástic. Nanostříbro nachází aplikace v diagnostice a léčbě rakoviny, protizánětlivých činidlech, kontaktních čočkách a může působit jako transportér přenášející léčiva (Naidu a kol., 2015). Navrženo bylo využití nanostříbra při léčbě leukémie, rakoviny prsu, plic a kůže a různých karcinomů např. hepatocelulárního karcinomu (Wei a kol., 2015).

Včasná diagnóza jakéhokoli chorobného stavu je nepostradatelná k zahájení časně léčby, která vede k lepší šanci na vyléčení. To platí zejména pro rakovinu. Pro označování, zaměření a terapii nádorů je významný vývoj nových nanočástic. Mezi běžně zavedené způsoby léčby rakoviny patří fotodynamická terapie jako druh fototerapie používající kombinaci neionizačního záření a senzibilující sloučeniny, a radioterapie naopak využívající vysoce energetického ionizujícího záření, které působí přímo na DNA a buněčné prostory bez senzibilujících látek. Stříbrné nanočástice by mohly umožnit zlepšení léčebné účinnosti a minimalizovat negativní vlivy na okolní zdravé tkáně, a to díky jejich schopnosti absorbovat ionizující i neionizující záření. Např. bylo demonstrováno, že nanočástice stříbra mohou vyvolat apoptózu a zvýšení radiosenzitivity rakovinných buněk. Také mohou inhibovat životaschopnost buněk akutní myeloidní leukémie (Dos Santos a kol., 2014). Vzhledem k tomu, že je nanostříbro cytotoxické pro normální buněčné linie při vyšších koncentracích, pečlivé použití nízké koncentrace nanostříbra může být použito jako účinné protinádorové činidlo. Avšak tato možná aplikace nanostříbra musí být dále analyzována (Pandian a kol., 2015).

V oblasti biomateriálů lze použít polymerní substráty s chemicky navázanými nanočásticemi na povrchu, a to zejména ve tkáňovém inženýrství pro řízenou adhezi a proliferaci buněčných kultur. Takto upravené polymery se zkoumají pro potenciální použití jako je např. pěstování buněk hladkého svalstva nebo kožních buněk při rozsáhlých ztrátách kožního krytu (těžké popáleniny, bércové vředy, atd.) (Řezníčková a kol., 2014).

7 Závěr

Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o struktuře a přípravě nanostříbra, jeho antibakteriálních vlastnostech, potenciální toxicitě a možné bakteriální rezistenci k nanostříbru. Dále se zabývá využitím nanostříbra, a to především jeho aplikacemi v lékařství.

K neznámějším metodám výroby nanočástic patří fyzikální metody, které jsou založeny na redukci kovového stříbra na nanoformu. Výhodou těchto technik jsou nízké náklady, ale naopak nevýhodou vysoká spotřeba energie. Mezi tyto metody se řadí např. laserová ablace. Dalším možným způsobem výroby jsou metody chemické, které zahrnují rozpouštění soli stříbra v rozpouštědle. Mezi využívaná redukční činidla patří borohydrid, askorbát nebo citrát. Nejnovějšími technikami jsou biologické metody, které k výrobě nanočástic využívají bakterie, plísňe a rostliny.

Nanočástice stříbra mají pozoruhodné mikrobicidní účinky, které zprostředkovávají uvolněné stříbrné ionty, ty reagují s buněčnou stěnou a plazmatickou membránou, způsobují lýzu buněk, zabraňují replikaci DNA a porušují syntézu bakteriálních proteinů. Mechanismus antimikrobiální účinnosti nanostříbra není ještě zcela objasněn a předmětem sporu zůstává, který z mechanismů má hlavní antibakteriální efekt. Předmětem současného výzkumu je možný vznik rezistence mikroorganismů k nanostříbru a jeho šíření mezi bakteriemi.

Biologické vlastnosti nanostříbra mají také vliv na jejich potenciální toxicitu. Ve většině studií *in vitro* bylo naznačeno, že své cytotoxické účinky nabývá prostřednictvím poskytování zánětu, mitochondriální dysfunkce, poškození DNA, zvýšení tvorby kyslíkových radikálů a indukce apoptózy. Ačkoliv jeho toxicita byla mnohokrát zkoumána, je stále obtížné učinit jednoznačný závěr. Stříbrné nanočástice mohou mít rozdílné toxické vlastnosti vzhledem k různým metodám jejich přípravy, velikosti atd., a proto by jejich toxicita měla být posuzována v konkrétních případech.

Díky svým antimikrobiálním vlastnostem je nanostříbro vhodné pro lékařské a spotřebitelské použití. V medicíně se používá u cévních náhrad, kostního cementu, obvazů na rány, chirurgických sítěk, různých katétrů a v dentálních materiálech. Velmi zajímavé jsou nově vznikající studie zabývající se aplikací nanostříbra v diagnostice a léčbě rakoviny.

8 Použitá literatura

AHAMED, M., a kol. Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta*, 2010, 411, 1841-1848.

ALT, V., a kol. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*, 2004, 25, 4383-4391.

ANDARA, M., a kol. Hemocompatibility of diamondlike carbon–metal composite thin films. *Diamond and Related Materials*, 2006, 15, 1941-1948.

ATIYEH, B. S., a kol. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns*, 2007, 33, 139-148.

BRENNAN, S. A., a kol. Silver nanoparticles and their orthopaedic applications. *The Bone & Joint Journal*, 2015, 97-B, 582-589.

DOHNALOVÁ, L. a DOHNAL, V. Nanočástice a jejich toxicita. *Chemické listy*, 2015, 109, 444-450.

DOS SANTOS, C. A., a kol. Silver Nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety Issues. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 103, 1931-1944.

DURÁN, N., a kol. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2016, 12, 789-799.

EMAM, H. E. a AHMED, H. B. Polysaccharides templates for assembly of nanosilver. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 135, 300-307.

FAYAZ, A. M., a kol. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2010, 6, 103-109.

FOJTIK, A., a kol. Formation of Nanometer-Size Silicon Particles in a Laser Induced Plasma in SiH₄. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 1993, 97, 1493-1496.

FRANCI, G., a kol. Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. *Molecules*, 2015, 20, 8856-8873.

GAJBHIYE, M., a kol. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2009, 5, 382-386.

GE, L., a kol. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *International Journal of Nanomedicine*, 2014, 9, 2399-2407.

GRAVES, J. L., a kol. Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in Escherichia coli. *Frontiers in Genetics*, 2015, 6, 42.

GREENWOOD, N. N. a EARNSHAW, A. *Chemie prvků*. Praha: Informatorium, 1993, ISBN 8085427389.

HÁJKOVÁ, Z. a ŠMEJKAL, P. Nanovýroba v přírodovědném vzdělání. *Chemické listy*, 2014, 108, 892-896.

HARTEMANN, P., a kol. Nanosilver: Safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. *Materials today*, 2015, 18, 122-123.

HENDRICKSON, O. D., a kol. Toxicity of nanosilver in intragastric studies: Biodistribution and metabolic effects. *Toxicology Letters*, 2016, 241, 184-192.

HOUSECROFT, C. E. a SHARPE, A. G. *Anorganická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014, ISBN 9788070808726.

HSIN, Y.-H., a kol. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters*, 2008, 179, 130-139.

HU, Y., a kol. Size-controlled synthesis of highly water-soluble silver nanocrystals. *Journal of Solid State Chemistry*, 2008, 181, 1524-1529.

CHALOUPKA, K., a kol. Nanosilver as a new generation of nanoprodukt in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28, 580-588.

CHAPMAN, J., a kol. *Nanoparticles in Anti-Microbial Materials: Use and Characterisation*. The Royal Society of Chemistry, 2012, ISBN 9781849731591.

CHEN, X. a SCHLUESENER, H. J. A nanosilver: A nanoprodukt in medical application. *Toxicology Letters*, 2008, 176, 1-12.

JUNG, J. H., a kol. Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area. *Journal of Aerosol Science*, 2006, 37, 1662-1670.

KVÍTEK, L., a kol. Nanočástice stříbra - příprava, vlastnosti a aplikace. [online]. *NANOCON*, 2009. [cit. 2016-04-07]. Dostupné z: http://konsys-t.tanger.cz/files/proceedings/nanocon_09/Lists/Papers/008.pdf.

MAGALHAES, A. P. R., a kol. Nanosilver Application in Dental Cements. *International Scholarly Research Network Technology*, 2012, 2012, 6.

MAILARD, J.-Y. a HARTEMANN, P. Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. *Critical Reviews in Microbiology*, 2013, 39, 373-383.

MCSHAN, D., a kol. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2014, 22, 116-127.

MUNGER, M. A., a kol. In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2014, 10, 1-9.

NAIDU, K. S. B., a kol. Biomedical Applications and Toxicity of Nanosilver: A Review. *Medical Technology SA*, 2015, 29, 13-19.

NANDA, A. a SARAVANAN, M. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2009, 5, 452-456.

NEDDERSEN, J., a kol. Laser Ablation of Metals: A New Method for Preparing SERS Active Colloids. *Applied Spectroscopy*, 1993, 47, 1959-1964.

PANDIAN, A. M. K., a kol. Synthesis of silver nanoparticle and its application. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 121, 211-217.

REZAZADEH-REYHANI, Z., a kol. Cytotoxic effect of nanosilver particles on testicular tissue: Evidence for biochemical stress and Hsp70-2 protein expression. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2015, 40, 626-638.

ŘEZNÍČKOVÁ, A., a kol. Příprava, frakcionalizace a roubování nanočástic ušlechtilých kovů na aktivovaný polymer. *Chemické listy*, 2014, 108, 865-874.

Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. [online]. 2014. [cit. 2016-05-27]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_039.pdf.

SHEEHY, K., a kol. Antimicrobial properties of nano-silver: A cautionary approach to ionic interference. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015, 443, 56-64.

SCHACHT, V. J., a kol. Effects of silver nanoparticles on microbial growth dynamics. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114, 25-35.

SIEGEL, J., a kol. Nanočástice ušlechtilých kovů připravené v kapalinách. *Chemické listy*, 2014, 108, 1102-1112.

SINTUBIN, L., a kol. Biologically produced nanosilver: Current state and future perspectives. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109, 2422-2436.

SOVOVÁ, T. a KOČÍ, V. Ekotoxikologie nanomateriálů. *Chemické listy*, 2012, 106, 82-87.

STERLING, J. P. Silver-resistance, allergy, and blue skin: Truth or urban legend? *Burns*, 2014, 40, Supplement 1, S19-S23.

WEI, L., a kol. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*, 2015, 20, 595-601.

ZHANG, S., a kol. A Review on Preparation and Applications of Silver-Containing Nanofibers. *Nanoscale Research Letters*, 2016, 11, 1-8.

ZÍTKA, O., a kol. Nanotechnologie pro efektivnější cévní náhrady. *Chemické listy*, 2013, 107, 24-29.

Internetové zdroje

AQUACEL. [online]. 2013 [cit.2016-06-08]. Dostupné z: <http://www.vlhkehojeni.cz/>

CONVATEC. [online]. 2016 [cit.2016-06-08]. Dostupné z: <http://www.convatec.cz/>

SMITH&NEPHEW. [online]. 2016 [cit.2016-04-21]. Dostupné z: <http://www.smith-nephew.com>

SPIEGELBERG. [online]. 2015 [cit.2016-06-08]. Dostupné z: <http://www.spiegelberg.de/>

HENRY SCHEIN. [online]. 2016 [cit.2016-06-15]. Dostupné z: <https://www.henryschein.com/>