

Koloidní stříbro a jeho biologická aktivita

Renata Večeřová

Ústav mikrobiologie LF UP v Olomouci

Práce ve své obecné části stručně shrnuje antimikrobiální potenciál stříbra, včetně historicky známých faktů, a charakterizuje jeho využití ve formě nanočástic v rámci koloidních systémů nebo jako součást nanokompozitů. Dále jsou shrnuty výsledky testů týkající se biologické aktivity koloidního stříbra provedené na Přírodovědecké fakultě a Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci. Konkrétně se jedná o antibakteriální a antifungální aktivitu nanočástic stříbra, testy cytotoxicity, synergický efekt nanočástic stříbra v kombinaci s vybranými antibiotiky, vývoj a testování nanokompozitů pro možné medicínské aplikace.

Klíčová slova: koloidní stříbro, nanočástice stříbra, antimikrobiální aktivita.

Colloid silver and its biological activity

The theoretical part of this article summarizes the antimicrobial potential of silver, including well-known historical facts, and its application in the form of nanoparticles within colloidal systems or as a part of nanocomposites. The outcomes of biological activity of colloidal silver tested at the Faculty of Medicine and Dentistry and Faculty of Science, Palacky University Olomouc, are also summarized in this article. The tests undertaken were focused on silver nanoparticles and their antibacterial and antifungal activity, cytotoxicity and synergic effect with selected antibiotics, and the development and testing of nanocomposites with possible medical application.

Key words: colloid silver, silver nanoparticles, antimicrobial activity.

Úvod

Vzrůstající rezistence bakterií ke stávajícím antimikrobiálním přípravkům představuje závažný problém ve zdravotnictví a infekce způsobené multirezistentními bakteriemi zvyšují nemocnost a úmrtnost pacientů z důvodu selhávání antibiotické léčby (1). Jednou z možností překonání bakteriální rezistence je využití a důkladné studium již známých látek s antibakteriálním účinkem. V současné době je v odborné literatuře velké množství informací zabývajících se účinkem koloidního stříbra. V databázi „Pubmed“ po zadání hesla „silver nanoparticles“ ke dni 22. 10. 2016 bylo nalezeno 10 146 odborných publikací mladších 10 let. Tato práce si neklade za cíl komplexní přehled publikovaných výsledků, cílem sdělení je blíže popsat příspěvek jedné pracovní skupiny z Univerzity Palackého v Olomouci k tomuto tématu.

Stříbro a historie jeho použití v medicíně

Stříbro (latinsky Argentum, chemická značka Ag) je ušlechtilý kov bílé barvy používaný člověkem pro své antimikrobiální účinky již od starověku. Stříbrné nádoby se používaly k uchovávání potravin, do mléka a tekutin se vkládaly stříbrné mince pro prodloužení trvanlivosti. Používání stříbrných přístrojů mělo sloužit pro prevenci chorob. V 15. století se na stolech šlechty dokonce objevovaly slánky s mletým stříbrem, které se přidávalo do jídla. U privilegovaných šlechtických rodin používajících stříbrné nádoby se často vyvinulo šedo-modré zbarvení kůže, odtud označení „modrá krev“. Od konce 19. století se používala metoda tzv. kredeizace, tj. profylaktické opatření k zabránění hnisavé gonokokové konjunktivitidy novorozenců pomocí 1% roztoku AgNO_3 . Počátkem 20. století se stříbro užívalo jako lék na různé druhy infekcí a chorob, ale také lokálně

na ošetření popálenin a léčení plísňových nákaz. S příchodem antibiotické éry používání stříbra v medicíně ustupovalo a používalo se pouze pro dezinfekci pitné vody nebo pro povrchové lokální ošetření ran přípravky s obsahem sulfo-diazinu stříbrného (2, 3).

Dnešní doba přináší renesanci používání stříbra pro medicínské i průmyslové aplikace. Příkladem jsou lokální přípravky k ošetření ran (náplasti, obvazový materiál), kosmetické přípravky, hygienické potřeby, roušky, textil a obuv, matrace nebo nátěrové hmoty. Biologickým vlastnostem stříbra je věnována velká pozornost. Intenzivně studované jsou zejména antimikrobiální vlastnosti a toxicita koloidního stříbra. Prokázaný antimikrobiální efekt koloidního stříbra je ve svém možném uplatnění omezen nežádoucími vedlejšími účinky. Při lokální aplikaci byly popsány reakce z přecitlivělosti. Dlouhodobé celkové i lokální užívání může vést

k ukládání stříbra a jeho solí do tkání. Výsledkem je nevratné šedomodré zabarvení – argyrie. Tyto nežádoucí účinky byly důvodem zákazu vnitřního užívání koloidního stříbra v rámci EU s platností od 1. 1. 2010 (2, 3, 4).

Koloidní stříbro

Koloid je označení pro disperzní soustavu, ve které jsou rozptýlené částice o velikosti 1–500 nm. Koloidní částice v tomto rozmezí udělují danému systému unikátní vlastnosti, které se nevyskytují u částic jiných rozměrů. Tyto vlastnosti souvisí s malým rozměrem částic a velkou plochou jejich povrchu, charakterem fázového rozhraní a jeho interakcí s okolním prostředím (4). Koloidní stříbro je vyráběno ve formě vodní disperze. Obvykle se jedná o nanočástice stříbra o velikosti 5–100 nm. Nejužívanějšími metodami přípravy jsou chemické redukční metody, které použitím různých redukčních činidel a jejich koncentrací umožňují ovlivnění konečných vlastností nanočástic stříbra, jako je jejich velikost, tvar a povrchový náboj (5, 6). Nanočástice stříbra lze vyrobit také elektrochemickým procesem za použití stříbrných elektrod nebo syntetizovat pomocí různých mikroorganismů, např. enterobakterií, stafylokoků nebo vláknitých hub, které jsou zdrojem redukčních enzymů. Nevýhodou biologické výroby nanočástic je omezená možnost ovlivnění jejich vlastností (7, 8).

Antimikrobiální účinky

Nanočástice stříbra jsou všeobecně považovány za látky s vysokým antibakteriálním účinkem (3–21). Antimikrobiální účinek nanočástic stříbra je dán jejich tvarem a velikostí, čím menší částice, tím vyšší antibakteriální efekt (20, 21). Ke stejným závěrům došli autoři studie zaměřené na srovnání antimikrobiálních vlastností nanočástic stříbra připravených chemickou redukcí modifikovaným Tollensovým procesem (5). Nanočástice stříbra o velikosti 25 nm redukované maltózou měly nejnížší hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC), a to v rozmezí 1,69–13,5 mg/l, přičemž aktivita částic redukovaných galaktózou o velikosti 50 nm byla nižší (MIC = > 54 mg/l) (5).

Stabilita koloidního stříbra

Koloidní disperze stříbra jsou nestabilní a poměrně snadno dochází k jejich nevratné agregaci. Vzhledem k tomu, že velikost částic

má pro antibakteriální účinek i toxicitu klíčový význam, je nutná stabilizace velikosti částic a zábrana jejich agregace. Pro omezení těsného přiblížení jednotlivých částic se osvědčilo do disperze přidat povrchově aktivní látky a polymery, které se adsorbují na povrchu částic a vytváří tenkou povrchovou vrstvu. Z použitých povrchově aktivních látek se pro stabilizaci částic o velikosti 25 nm nejlépe osvědčily SDS (Sodium dodecylsulfát) a Tween v 1% koncentraci. Z polymerů se osvědčil pouze polyvinylpyrrolidon s molekulovou hmotností 360 000 (10). Stabilizace nanočástic stříbra vedla ke snížení hodnot MIC zejména u grampozitivních bakterií (10).

Antifungální aktivita

Panáček a kol. použili pro stanovení antifungální aktivity nanočástice stříbra o velikosti 25 nm připravené redukcí maltózou a stabilizované různými povrchově aktivními látkami (11). Inhibiční účinek stříbra byl u kvasinek silnější než u bakterií a MIC dosahovaly hodnot 0,1–1,69 mg/l. Ve většině případů se hodnota MIC nanočástic stříbra rovnala hodnotě MIC iontového stříbra (11).

Nanočástice stříbra v kombinaci s antibiotiky

Za důležitou součást výzkumu lze považovat hodnocení synergického efektu nanočástic stříbra a antibiotik. Panáček a kol. prokázali, že nanočástice stříbra (v koncentraci nižší než jejich vlastní MIC) v kombinaci s jednotlivými antibiotiky snižují hodnotu MIC příslušných antibiotik a zesilují jejich účinnost. Například MIC ampicilinu pro *Escherichia coli* CCM 4225 byla ≥ 64 mg/l, MIC nanočástic stříbra 7,5 mg/l. Přidání nanočástic stříbra v koncentraci 2,5 mg/l snížilo MIC ampicilinu na 0,03 mg/l (13). V další studii byly do testování zahrnuty multirezistentní bakterie, včetně ESBL a KPC kmenů a i v tomto případě byl zaznamenán synergický efekt, který ve svém důsledku znamenal obnovení účinku testovaného antibiotika s výrazným snížením jeho MIC (14). Synergický účinek byl potvrzen také při použití fenotypových testů pro průkaz ESBL producentů. Kmen *Klebsiella pneumoniae* produkující ESBL se při kultivaci na agaru obsahujícím 5 mg/l nanočástic stříbra jeví jako citlivý k testovaným antibiotikům a produkce ESBL není zřejmá (14).

Synergické působení antibiotik a koloidního stříbra se jeví jako nadějně pro využití v medicíně. Pracuje s nízkými koncentracemi stříbra a tím minimalizuje rizika spojená s vedlejším toxickým efektem nanočástic.

Magnetické nanokompozity oxidů železa a stříbra

Snížit možné vedlejší účinky nanočástic umožňuje jejich vazba na další složku. Při vazbě částic do velikosti 100 nm se jedná o nanokompozity (15–17). Magnetické nanokompozity, ve kterých jsou nanočástice stříbra vázány na oxidy železa magnetit a maghemit, si zachovávají antimikrobiální vlastnosti srovnatelné se samotnými nanočásticemi stříbra (15). Zároveň zůstaly beze změny i vynikající magnetické vlastnosti oxidů železa, což je důležité z hlediska aplikace, kdy mohou být připravené nanokompozity využity k cílenému směřování biologických účinků stříbra a následně odstraněny pomocí vnějšího magnetického pole (15).

Nanokompozit Ag/PDDA-křemelina

Křemelina je běžně používána k filtracím v potravinářském průmyslu. Jedná se o lehký práškový materiál s velkým množstvím pórů o velikosti 10–200 μm, které zachytí hrubé nečistoty a kvasinky, ale propustí bakterie. Nanesením nanočástic stříbra na křemelinu byl získán kompozit vhodný k mechanické i biologické filtraci a byla prokázána vysoká inhibiční i baktericidní aktivita (17). Vysoká stabilita nanokompozitu Ag/PDDA-křemelina spolu s výraznou baktericidní aktivitou i proti multirezistentním bakteriím představují dobré předpoklady pro využití nanokompozitu například k čištění kontaminovaných vod (17).

Toxicita

Testy toxicity nanočástic stříbra na eukaryotické buňky byly provedeny na buněčné linii BJ lidských fibroblastů. Buněčná toxicita byla kvantifikována stanovením indexu LC₅₀ (lethality concentration), která udává koncentraci látky potřebnou k usmrcení 50 % organismů. Nanočástice stříbra byly cytotoxické až při koncentracích převyšujících 30 mg/l, zatímco roztok AgNO₃ vykazoval cytotoxické účinky už při koncentracích 1 mg/l (11).

Test akutní toxicity byl rovněž proveden na eukaryotickém jednobuněčném organismu

trepka velká (*Paramecium caudatum*), který je dobře kultivovatelný v laboratorních podmínkách a vhodný pro mikroskopické pozorování toxických účinků. Test byl vyhodnocen pomocí hodnoty $LC_{50}/1$ hodina. Nanočástice stříbra nevyvolaly akutní toxický účinek ani při koncentracích 25 mg/l, při této koncentraci přežívaly trepky déle než týden. Iontové stříbro usmrtilo všechny trepky okamžitě už při koncentraci 1 mg/l (22).

In vitro hodnocení hemokompatibility stříbrných nanočástic v lidské krvi

Možným nežádoucím účinkem nanočástic stříbra při kontaktu s plazmou a krevními elementy je ovlivnění hemostázy. V této souvislosti byly hodnoceny hematologické parametry k posouzení kompatibility lidské krve a nanočástic stříbra. Na základě měření základních hematologických parametrů nebyly ve skupině krve s koncentracemi stříbra 1 a 3 mg/l pozorovány významné změny (23). Koncentrace stříbra 30 mg/l indukovala hemolýzu erytrocytů, sekreci α -granulí trombocytů, zvýšenou expresi CD11b na granulocytech, zvýšené koagulační faktory trombin-antitrombin IIIa a aktivaci komplementové kaskády (23).

Závěr

WHO vyčíslila, že finanční náklady na léčbu infekcí způsobených rezistentními bakteriemi

100násobně překračují léčbu infekcí způsobených citlivými kmeny. Data publikovaná ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) odhadují, že každý rok zemře 25 000 lidí následkem infekcí vyvolaných rezistentními kmeny bakterií. Většina používaných antibiotik je známa ze 70.–80. let minulého století, protože vývoj nových antibakteriálních látek se za posledních 25 let výrazně zpomalil (1). Je tedy zřejmá nutnost využití všech možností antimikrobiálního účinku nových i známých látek, čili i stříbra a jeho nanočástic, a to i s rizikem možných vedlejších účinků (24). Antimikrobiální aktivita nanočástic stříbra byla laboratorně potvrzena množstvím publikací (3–21). Mechanismus účinku není přesně definován, předpokládá se postupné uvolňování účinných Ag^+ iontů z povrchu nanočástic a jejich interakce s thiolovými skupinami proteinů, inaktivace bakteriálních enzymů, interakce s bakteriální stěnou (změna permeability), ovlivnění transportu elektrolytů, zábrana replikace DNA a tvorba reaktivních forem kyslíku (3, 12, 20). Koncentrace přesně definovaných nanočástic stříbra, při kterých jsou inhibovány bakterie, nepůsobí cytotoxicky na lidské fibroblasty, krevní elementy, ale ani na jednobuněčné trepky (5, 11, 22–23).

Snížení toxicity pro makroorganismus lze dosáhnout pevným navázáním stříbrných nanočástic na vhodný nosič, jejich cíleným působením a eliminací z organismu např. pů-

sobením magnetického pole v případě magnetických nanokompozitů. Další možností je využití synergického působení nanočástic stříbra s antibiotiky, kdy je antimikrobiální aktivita dosaženo při velmi nízkých koncentracích nanočástic stříbra. Tyto nízké koncentrace jsou při synergickém působení s antibiotiky dostačující a zároveň netoxické pro eukaryotické organismy (13, 14, 25). Synergie koloidního stříbra a antibiotik u multirezistentních bakterií má v medicíně velký potenciál pro využití. Je třeba ale osvětlit mechanismus synergického působení a důkladně studovat toxikologické parametry těchto kombinací.

Koloidní stříbro je příznivci alternativní medicíny označováno za všelék léčící choroby infekční i neinfekční a také je doporučováno jako prostředek preventivní. Do roku 2010 bylo v ČR dostupné jako potravinový doplněk. Proti vnitřnímu užívání koloidního stříbra je však nutné se ohradit, jeho léčebné účinky při vnitřním užívání nebyly žádnou klinickou studií prokázány. Dále je nutné zdůraznit, že biologická aktivita prokázaná v laboratorních podmínkách in vitro se může diametrálně lišit od aktivity in vivo. Detailní znalost účinku nanočástic na živé organismy je nutná pro jejich efektivní aplikaci v medicíně bez negativních dopadů na zdraví i celý ekosystém.

Práce byla podpořena vnitřním grantem IGA_LF_2016_022.

LITERATURA

- Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013; 11: 297–308.
- Alexander JW. History of medical use of silver. *Surg Infect* 2009; 10: 289–292.
- Mijnendonckx K, Leys N, Mahillon J, et al. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biomaterials* 2013; 26: 609–621.
- Filipová Z, Kukutschková J, Mašláň M. Rizika nanomateriálů. 1st ed. Univerzita Palackého v Olomouci; 2012.
- Panáček A, Kvítek L, Pucek R, et al. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B* 2006; 110: 16248–16253.
- Wong KKY, Liu XL. Silver nanoparticles—the real “silver bullet” in clinical medicine? *Med Chem Comm* 2010; 1: 125–131.
- Likus W, Bajor G, Siemianowicz K. Nanosilver – does it have only one face? *Acta biochimica polonica* 2013; 60: 495–501.
- Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci* 2009; 145: 83–96.
- Franci G, Falanga A, Galdiero S, et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agent. *Molecules* 2015; 20: 8856–8874.
- Kvítek L, Panáček A, Soukupová J, et al. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *J Phys Chem C* 2008; 112: 5825–5834.

- Panáček A, Kolar M, Vecerova R, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 2009; 30: 6333–6340.
- Moritz M, Geszke-Moritz M. The newest achievement in synthesis, immobilization and practical application of antibacterial nanoparticles. *Chem Eng J* 2013; 228: 596–613.
- Panáček A, Směkalová M, Kilianová M, et al. Strong and nonspecific synergistic antibacterial efficiency of antibiotics combined with silver nanoparticles at very low concentrations showing no cytotoxic effect. *Molecules* 2016; 21: 26.
- Panáček A, Směkalová M, Večeřová R, et al. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant *Enterobacteriaceae*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2016; 142: 392–399.
- Pucek R, Tucek J, Kilianova M, et al. The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles. *Biomaterials* 2011; 32: 4704–4713.
- Panáček A, Balzerová A, Pucek R, et al. Preparation, characterization and antimicrobial efficiency of Ag/PDDA – diatomite nanocomposite. *Colloid Surf B-Biointerfaces* 2013; 110: 191–198.
- Panacek A, Kilianova M, Pucek R, et al. Preparation and in vitro bactericidal and fungicidal efficiency of NanoSilver/methylcellulose hydrogel. *International Journal of Chemical, Nuclear, Metallurgical and Materials Engineering* 2014; 8.

- Lara HH, Ayala-Nunez NV, Turrent LDI et al. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 2010; 26: 615–621.
- Li WR, Xie XB, Shi QS et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials* 2011; 24: 135–141.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005; 16: 2346–2353.
- Baker C, Pradhan A, Pakstis L, et al. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2005; 5: 244–249.
- Kvítek L, Vaničková M, Panáček A, et al. Initial study on the toxicity of silver nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. *J Phys Chem C* 2009; 113: 4296–4300.
- Krajewski S, Pucek R, Panáček A, et al. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. *Acta Biomaterialia* 2013; 9: 7460–7468.
- Antony JJ, Sivalingam P, Chen B. Toxicological effects of silver nanoparticles. *Environ toxicol pharmacol* 2015; 40: 729.
- Brown AN, Smith K, Samuels TA, et al. Nanoparticles Functionalized with Ampicillin Destroy Multiple Antibiotic-Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78: 2768–2774.