

## *Studium vlivu stříbra a nanozlata na experimentální model zánětu*

### **CYTOTOXICITA VZORKŮ STŘÍBRA A NANOZLATA**

některé závěry z dizertační práce Mgr. Veroniky Pivodové, PhD s názvem

### **Hodnocení materiálů pro implantologii a hojení ran**

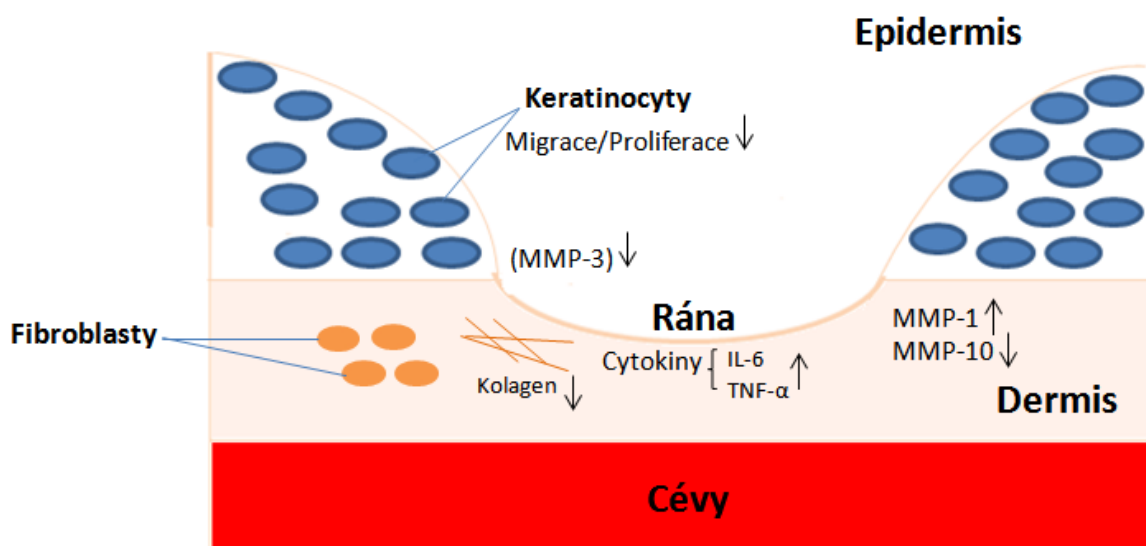
Stříbro je po mnoho let využíváno k hojení ran. Dříve se používalo stříbro ve formě fólií nebo roztoků jako dusičnan stříbrný. Vzhledem ke spektru antimikrobiálních účinků je v současné době studováno především iontové stříbro, které se využívá jako profylaktické antibakteriální činidlo v obvazech. Zjistilo se, že působí proti aerobním, anaerobním gram-negativním a gram-positivním bakteriím a stejně tak proti plísním. Antibakteriální vliv stříbra může být vysvětlen několika způsoby. Usuzuje se, že stříbro zasahuje do dýchacího řetězce bakterií. Ionty stříbra reagují se složkami bakteriálního transportního systému elektronů a váží se na DNA a tím inhibují její replikaci (Barnea a kol., 2010).

Kromě stříbra se dnes v medicíně využívá i nanozlato díky svému unikátnímu povrchu, optickým, magnetickým a elektronickým vlastnostem. Na rozdíl od stříbra nebyly v literatuře zmíněny žádné jeho toxické účinky na buňky. Tento fakt koreluje s našimi výsledky. Testovali jsme cytotoxické účinky dvou vzorků stříbra (metalické a iontové) a jednoho vzorku nanozlata na lidské epidermální keratinocyty a buněčnou linii HaCaT. V případě nanozlata nebyl prokázán žádný cytotoxický účinek na zvolený typ buňek. U metalického stříbra, obdobně jako u zlata, se také neprojevil žádné cytotoxické účinky na buňky, ale u lidských epidermálních keratinocytů byla u koncentrací 11 ppm a 33 ppm pozorována snížená proliferace buněk. Podle autorů Poon a kol.(2004) bylo potvrzeno, že ionty Ag, Cu, Hg a Ni mohou mít antiproliferativní účinky. Předpokládá se, že snížená nebo zastavená proliferace může být vyvolaná usmrcením buněk nebo zabráněním jejich dělení, popřípadě oběma mechanismy. Iontové stříbro při vysokých koncentracích jevílo silný cytotoxický vliv jak na keratinocyty, tak na HaCaT. Z našich výsledků tedy vyplývá, že pro bioaplikace stříbra není vhodné používat koncentrace nad 3,7 ppm.

Otázkou zůstává, zda-li jsou nanočástice biologicky bezpečné. Huang a kol. (2010) ve své práci diskutuje možnost tzv. nano-biointerakcí především zlatých částic, jejichž velikost je menší než 10 nm. Uvažuje se tedy, že by nanozlato mohlo reagovat s membránovými lipidy ve *Stratum corneum*, tím ji otevřít a penetrovat do kůže (Daniel a kol., 2004; Leu a kol., 2012). V případě biobezpečnosti stříbra Kokura a kol.(2010) ve

své práci uvádí, že nanočástice Ag nejsou schopny proniknout neporušenou lidskou kůží. Penetrace hrozí pouze při narušení bariérní funkce kůže.

## PROTEINY ZAPOJENÉ DO EPIDERMÁLNÍHO HOJENÍ



Obr. 33 Schéma poraněné kůže během 24 hodin (upraveno podle Xu a kol., 2013).

	Metalické stříbro		Iontové stříbro		Nanozlato	Pozitivní kontrola	Kontrola
	0,13 ppm	0,4 ppm	0,13 ppm	0,4 ppm	1,2 ppm	TNF- $\alpha$ (50 ng/ml)	
IL-6	↓	↓	↓	↓	↓	↑*	
MMP-1						↑*	
MMP-3				↑*			
MMP-10				↑*		↑*	
Kolagen I	↑	↑	↑	↑	↑	↓	

■ HaCaT      \* Tato hodnota je signifikantně odlišná od kontroly ( $p < 0,05$ )

Obr. 34 Přehled vybraných proteinů účastnících se procesu hojení na experimentálním modelu zánětu.

Nadworny a kol. (2010) ve své práci uvádí, že stříbro v infekčních ranách vykazuje současně s antimikrobiální také protizánětlivou aktivitu. Jeho protizánětlivé účinky však nejsou závislé na jeho antimikrobiální aktivitě. Mechanismus jeho protizánětlivých účinků není zcela objasněn, ale předpokládá se, že ionty stříbra jsou schopné přímo interagovat s jednotlivými zánětlivými buňkami. To způsobuje jejich apoptózu a snižování zánětu přes indukci nebo aktivaci MMP a prozánětlivých signálních molekul. Podobně jako u stříbra, tak i u zlata se prokázaly protizánětlivé účinky. Eisler a kol. (2003) ve své práci uvádí, že zlato má pozitivní vliv na hojení revmatoidní artritidy. Dnes se pro léčbu využívá koloidní zlato  $Au^0$ , které se zdá být efektivnější a bezpečnější alternativou než sloučeniny zlata využívané dříve. Bylo prokázáno, že sloučeniny zlata obsahující ionty  $Au^+$  nebo  $Au^{3+}$  vykazovaly během léčby revmatoidní artritidy toxické účinky. Dle literatury se dá shrnout, že stříbro a zlato podporují hojení kožních ran potlačením exprese cytokinů a indukci aktivace MMP, které jsou nezbytné během procesu hojení. Naše výsledky dokazují, že jak zlato, tak stříbro potlačovaly produkci IL-6 a navíc iontové stříbro indukovalo zvýšení produkce MMP-3 (Obr. 34).

V naší práci byla stanovována produkce kolagenu I. Z literatury je známo, že MMP-1 společně s MMP-10 podporují migraci keratinocytů přes kolagen I během hojení (Dumin a kol., 2001; Martins a kol., 2012). Pilcher a kol. (1997) ve své práci uvádí, že nativní kolagen I selektivně podporuje adhezi keratinocytů a indukuje produkci MMP-1. Navíc produkce MMP-1 je zvýšena na počátku zánětu a je tedy jeho indikátorem. Naše data ukázala souvislost mezi těmito vybranými proteiny u iontového stříbra při koncentraci 0,4 ppm, kde společně s nárůstem produkce MMP-1 a -10, byla zvýšena i produkce kolagenu I (Obr. 34). To by potvrzovalo skutečnost, že pro migraci keratinocytů během hojení je důležité spojení mezi MMP-1, -10 a kolagenem I.

## ***Studium vlivu stříbra a nanozlata na experimentální model zánětu***

Byla hodnocena cytotoxicita metalického, iontového stříbra a nanozlata na buněčnou linii HaCaT a primární kulturu lidských epidermálních keratinocytů. Dále byl studován vliv stříbra a zlata na experimentální model zánětu vyvolaný pomocí TNF- $\alpha$  v keratinocytech. Byla stanovena hladina vybraných proteinových markerů exprimovaných keratinocyty během procesu hojení (IL-6, MMP-1, -3 a -10 a kolagen I).

### Iontové stříbro

- Koncentrace iontového stříbra 3,7 ppm, 11 ppm a 33 ppm vykazovaly silné cytotoxické účinky na oba buněčné modely. Pro aplikaci iontového stříbra na buňky je proto vhodné volit nižší koncentrace řádově od 0,4 ppm.
- Z našich výsledků lze usoudit, že iontové stříbro by mohlo podporovat hojení na základě stanovených proteinů:
  - Snižovalo hladinu IL-6.
  - Signifikantně zvyšovalo MMP-3 a -10, tedy proteiny, které jsou důležité během migrace keratinocytů při hojení.

### Metalické stříbro

- Metalické stříbro nevykazovalo žádný cytotoxický účinek na buňky. Avšak u koncentrací 11 ppm a 33 ppm byl pozorován antiproliferační vliv. Z tohoto důvodu je vhodnější pracovat s koncentracemi v rozmezí 0,013 ppm- 3,7 ppm.
- Metalické stříbro vykazovalo protizánětlivé účinky, protože snižovalo hladinu prozánětlivého cytokinu IL-6.

### Nanozlato

- Nanozlato stejně jako metalické stříbro nevykazovalo žádné cytotoxické účinky na buňky.
- U nanozlata byly také prokázány protizánětlivé účinky jako u obou typů stříbra, snížením hladiny IL-6.