

KRYSTYNA IZABELLA WOLSKA¹, KATARZYNA MARKOWSKA¹, MAGDALENA WYPIJ²,
PATRYCJA GOLIŃSKA², HANNA DAHM²

¹*Zakład Genetyki Bakterii
Instytut Mikrobiologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa*

²*Zakład Mikrobiologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Lwowska 1, 87-100 Toruń
E-mail: izabelaw@biol.uw.edu.pl
kgrzes@biol.uw.edu.pl
mwypij@umk.pl
golinska@umk.pl
dahm@umk.pl*

NANOCZĄSTKI SREBRA, SYNTEZA I BIOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ

WSTĘP

Rosnąca oporność bakterii na dostępne chemioterapeutyki zmusza do poszukiwania produktów lub strategii, które stworzyłyby nowe możliwości terapeutyczne. Zdolność prawie wszystkich szczepów bakterii, również patogennych, do tworzenia biofilmów, których oporność na antybiotyki jest większa niż komórek wolno-żyjących, jeszcze bardziej pogłębia zagrożenia płynące z oporności na antybiotyki. Obserwowane ostatnio, coraz mniejsze zainteresowanie firm farmaceutycznych poszukiwaniem, projektowaniem i wprowadzaniem na rynek nowych antybiotyków, dodatkowo wpłynęło na przyspieszenie badań nad nowymi sposobami terapii schorzeń wywołanych przez bakterie. Nowe związki i strategie mogą stanowić uzupełnienie standardowej terapii, a tym samym podnieść skuteczność jej działania, lub po prostu zastąpić już nieprzydatne antybiotyki. Potencjalne możliwości zastąpienia klasycznych antybiotyków opierają się na wykorzystaniu peptydów przeciwbakteryjnych, probiotyków, inhibitorów wirulencji szczepów patogennych, przeciwciał, immunostymulato-

rów, związków pochodzenia roślinnego, bakteriofagów i ich enzymów litycznych, terapii fotodynamicznej czy najnowszych produktów nanotechnologii, w tym zastosowaniu nanocząstek metali (CZAPLEWSKI i współaut. 2016).

Osiągnięcia nanotechnologii ostatnich lat są znaczące, bardzo obiecujące i dostarczają nowych metod walki z drobnoustrojami. Znane są metody syntezy nanocząstek i nanokompozytów o ściśle określonych właściwościach fizyko-chemicznych i znacznym potencjale biologicznym. Szczególnym zainteresowaniem badaczy cieszą się nanocząstki tlenku cynku, tlenku tytanu, tlenku magnezu, miedzi, tlenku miedzi, selenku kadmu i tellurku kadmu oraz nanocząstki złota o stosunkowo małym potencjale antybakteryjnym, ale niezwykle skuteczne w diagnostyce molekularnej. Jednak największy nacisk położony jest na nanocząstki srebra, będące przedmiotem tego artykułu. Należy zaznaczyć, że oprócz możliwości wykorzystania potencjału antybakteryjnego, nanocząstki mogą być również stosowane do precyzyjnego dostarczania leków, np. antybiotyków do miejsca infekcji bakteryjnej. Taka strategia

pozwała na zmniejszenie dawki oraz częstotliwości ich dozowania, umożliwia akumulację leku jedynie w obrębie konkretnego narządu, co z kolei zmniejsza efekty uboczne oraz ułatwia jego dostarczenie do wnętrza komórek. W literaturze pojawiają się również doniesienia o wykorzystaniu nanocząstek magnetycznych w biologii i medycynie, np. w sortowaniu komórek do celów diagnostycznych czy w terapiach przeciwnowotworowych (NIEMIROWICZ i współaut. 2012).

SYNTEZA NANOCZĄSTEK SREBRA

Synteza nanocząstek metali, w tym nanocząstek srebra (ang. *Ag nanoparticles*, AgNPs) może być przeprowadzona na drodze chemicznej, fizycznej, fizyko-chemicznej lub biologicznej.

METODY CHEMICZNE

Metody chemiczne syntezy nanocząstek srebra są liczne, powszechnie używane i nie wymagają zastosowania skomplikowanej aparatury. Najczęściej wykorzystuje się reakcje redukcji chemicznej w roztworach wodnych lub alkoholowych i systemy odwrotnej miceli. Metoda redukcji chemicznej polega na redukcji soli srebra przez czynnik redukujący. Reakcja zachodzi w obecności czynnika stabilizującego, który chroni nanocząstki przed agregacją. Morfologię oraz stabilność nanocząstek można kontrolować przez dobór parametrów syntezy, takich jak stężenie soli srebra i stabilizatora czy stosunek molowy reduktora do soli srebra (MALINA i współaut. 2010).

W pierwszym etapie syntezy na drodze redukcji chemicznej, poprzez reakcję redoks powstają wolne atomy srebra. Elektronny pochodzący z reduktora są przenoszone na atom srebra. Zredukowane atomy srebra zderzają się ze sobą, co prowadzi do powstawania stabilnych jąder. W kolejnym etapie następuje wzrost nanocząstek srebra polegający na dalszej redukcji jonów metalu na powierzchni powstałych jąder. Proces ten trwa do momentu wyczerpania jonów metalu. Warunki reakcji, takie jak temperatura, pH, mieszanie i czas syntezy oraz rodzaj stosowanych odczynników, mają wpływ na kształt (sferyczny, sześcienny, trójkątny, włókna, pręty, rurki) i wielkość produkowanych nanocząstek (MALINA i współaut. 2010). Najczęściej stosowanym źródłem jonów srebra jest azotan srebra, chociaż inne sole srebrne (AgBF_4 , AgPF_6 czy AgOCl_4) mogą być także wykorzystywane. Sole inne niż azotan srebra powodują jednak spadek początkowej szybkości reakcji. Do redukcji jonów srebra wykorzystuje się witaminę C, etanol, borowodorek sodu, cytrynian sodu,

formaldehyd, kwas galusowy, glikol etylenowy czy hydrochinon i utropinę (PATAKFAŁVI i współaut. 2004; SHARMA i współaut. 2009).

Niektóre metody redukcji jonów srebra do nanocząstek nie wymagają dodatku reduktora. W tych metodach wykorzystuje się alkoholowe roztwory azotanu srebra i warunki ciągłego mieszania, a następnie, po redukcji, dodanie stabilizatora, np. organoalkoksylanów. Znane są również metody redukcji chemicznej jonów srebra, w której jeden związek może być jednocześnie reduktorem i stabilizatorem. Przykładem takiego związku jest wodny roztwór cytrynianu sodu, który dodawany do wrzącego roztworu azotanu srebra prowadzi do powstania stabilnych AgNPs; taką samą rolę może pełnić kwas galusowy.

Najpowszechniej stosowanymi stabilizatorami są poliwinylpirolidon (PVP), alkohol poliwinylowy (PVA), dodecylosiarczan sodu (SDS) i bromek cetylitrimetyloamoniowy (CTAB). Związki stabilizujące posiadają grupy polarne, które wykazują silne powinowactwo do jonów i nanocząstek srebra. Pokrywając powierzchnię nanocząstek, zapobiegają łączeniu się i tworzeniu aglomeratów, wpływając na ich stabilność przez kilka do kilkunastu miesięcy (KRAJCZEWSKI i KUDELSKI 2015).

Do syntezy nanocząstek srebra stosuje się także micelle typu woda w oleju (W/O). Takie mikroemulsje składają się z kropelek wody o rozmiarach nanometrycznych, zawieszonych w rozpraszającej fazie olejowej i stabilizowanych przez cząsteczki surfaktanta na granicy faz (emulsja trójskładnikowa). Krople wody otoczone surfaktantem stanowią mikroreaktory, w których zachodzą reakcje syntezy. Nanocząstki srebra są syntetyzowane w micelach, gdzie przebiega proces ich nukleacji i wzrostu. Surfaktant pełni rolę stabilizatora w tym układzie, otaczając krople wody zapobiegając aglomeracji powstających nanocząstek i ograniczając ich rozmiary. Średnicę mikrokropli można łatwo zmieniać przez dobór odpowiednich parametrów reakcji (np. stężenie i rodzaj surfaktanta, typ fazy rozpraszającej), a tym samym wpływać na wielkość syntetyzowanych nanocząstek. Synteza AgNPs w systemie odwrotnej miceli jest reakcją redukcji jonów srebra, przebiegającą w kilku etapach i polegającą na zmieszaniu dwóch mikroemulsji zawierających sól srebrową i reduktor. Po zmieszaniu emulsji następuje kolizja kropli, otwarcie warstwy surfaktanta i wymiana reagentów między micelami drogą dyfuzji. Następne etapy to redukcja jonów srebra, wytworzenie jądra nanocząstki, zamknięcie miceli i wzrost nanocząstki w jej wnętrzu (MALINA i współaut. 2010, KRAJCZEWSKI i KUDELSKI 2015).

Do środków powierzchniowo czynnych, najczęściej wykorzystywanych do tworzenia emulsji należą SDS, Triton-X, biosurfaktant ramnolipid, surfaktanty gemini czy AOT [bis(2-etyloheksylo) bursztynianosulfonian sodowy] (MALINA i współaut. 2010, KRAJCZEWSKI i KUDELSKI 2015). Rozerwanie miceli prowadzi do uwolnienia dojrzałych nanocząstek, które można wyizolować z roztworu przez odwirowanie.

METODY FIZYCZNE

Do metod fizycznych wykorzystywanych do syntezy nanocząstek srebra należy metoda odparowywania w połączeniu ze skraplaniem. Zaletą metod fizycznych jest powstawanie nanocząstek jednolitych pod względem wielkości i brak zanieczyszczeń pochodzących od rozpuszczalników, które stosuje się w metodach syntezy chemicznej. Czasem jednak metody fizyczne wymagają użycia aparatury (np. piec) zajmującej dużą powierzchnię lub wymagających dużego nakładu energii lub czasu potrzebnego do osiągnięcia pożądanej temperatury, co jest ich wadą (IRAVANI i współaut. 2014). Srebro jest ogrzewane w wysokiej temperaturze, co prowadzi do jego odparowania i powstania jonów srebra. W procesie nukleacji wytwarzane są zarodki, które dojrzewając dają nanocząstki. Proces schładzania prowadzi do kondensacji nanocząstek metalu. Powolne obniżanie temperatury po procesie syntezy wpływa na efektywność procesu: uzyskanie wyższego stężenia i stabilność nanocząstek (JUNG i współaut. 2006, IRAVANI i współaut. 2014). Autorzy zaobserwowali, że stężenie wytwarzanych AgNPs wzrastało wraz ze wzrostem temperatury, a uzyskane nanocząstki były małych rozmiarów (6,2-21,5 nm), sferyczne i nie wykazywały agregacji.

METODY FIZYKO-CHEMICZNE

Do fizyko-chemicznych metod syntezy AgNPs należy metoda elektrochemiczna, która jest rzadziej wykorzystywana niż metody chemiczne. W metodzie tej redukcja soli srebrowej zachodzi na elektrodzie katodowej, prowadząc do powstania nanocząstek srebra stabilizowanych przez określoną sól (MALINA i współaut. 2010).

Metody syntezy elektrochemicznej umożliwiają wytwarzanie stabilnych nanocząstek o określonych rozmiarach i kształcie. Stabilizatorami, jeśli są wymagane, są najczęściej PVP, PEG (poliglikol etylenowy) lub sole tetraoctyloamonowe. Jednak stabilizatory polimerowe, takie jak DNA, są również stosowane. Matryca DNA umożliwia wytworzenie nanocząstek srebra dendrytycznych lub w formie drutów, które układają się wzdłuż długich nici polimeru. Stosowanie matrycy

DNA o różnej długości umożliwia syntezę nanocząstek o różnej wielkości (JIN i współaut. 2011).

Elektrochemiczną redukcję srebra można przeprowadzić za pomocą cyklicznej woltametrii lub metodą galwanostatyczną. W pierwszej metodzie stosuje się trójelektrodowy system złożony ze srebrnego pręta stanowiącego elektrodę pracującą, blaszki platynowej będącej elektrodą pomocniczą i elektrodę odniesienia – Ag/AgCl. System zanurzony jest w roztworze NaNO_3 . W drugiej metodzie używa się trzech srebrnych elektrod anodowych i dwóch srebrnych drutów jako katody. W systemie trójelektrodowym elektrodę odniesienia może stanowić acetonitryl, a sole tetraoctyloamonowe w acetonitrylu elektrolitem (MALINA i współaut. 2010).

Znana jest również elektrochemiczna synteza wysoce stabilnych nanocząstek srebra, bez użycia czynników stabilizujących. Kształt i rozmiar syntetyzowanych elektrochemicznie nanocząstek może być kontrolowany przez zmianę parametrów elektrosyntezy, takich jak potencjał elektrody pracującej i gęstość prądu.

Metoda syntezy AgNPs z wykorzystaniem ablacji laserowej polega na działaniu wiązki laserowej o dużej mocy na sztabkę srebra, z którego odparowują atomy metalu i przechodzą do roztworu zawierającego stabilizator (KRAJCZEWSKI i KUDELSKI 2015). Ablację laserową najczęściej prowadzi się w wodnych roztworach SDS czy cytrynianu sodu. Na wielkość nanocząstek ma wpływ stężenie roztworu i moc wiązki laserowej. Wykazano, że większe stężenie SDS prowadzi do powstawania nanocząstek o mniejszej średnicy, zaś większa moc wiązki laserowej do wytwarzania nanostruktur o średnicy większej. Niektórzy badacze uważają, że zaletą zastosowania ablacji laserowej do syntezy koloidalnych nanocząstek srebra, w porównaniu z innymi metodami, jest brak stosowania związków chemicznych w roztworze (abłacja w wodzie). Powstające nanocząstki są czyste, nietoksyczne i w związku z tym mają potencjał aplikacyjny (KRAJCZEWSKI i KUDELSKI 2015).

Mechanizm syntezy nanocząstek srebra poprzez naświetlanie roztworu azotanu srebra i SDS światłem laserowym polega na fotolizie wody i powstaniu wolnych rodników. Energia kwantu promieniowania laserowego jest energią potrzebną do powstania rodników OH i H^+ oraz „wolnych elektronów” e^- . Ze względu na wielofotonowy charakter procesu jego wydajność jest niewielka. Powstające rodniki lub „wolne elektrony”, mimo krótkiego czasu trwania, mogą redukować jony srebra Ag^+ do metalicznego srebra, tworząc zarodki nanocząstek. Zarodkowe na-

nocząstki srebra rosną w wyniku fotoredukcji kolejnych jonów srebra na ich powierzchni (KRAJCZEWSKI i KUDELSKI 2015).

W metodzie sonochemicznej do syntezy AgNPs wykorzystuje się ultradźwięki w atmosferze gazu obojętnego (argon lub azot). Ultradźwięki powodują rozerwanie wiązań chemicznych. Metoda ta nie pozwala jednak na kontrolowanie rozmiarów powstających nanocząstek, a ich wielkość zależy głównie od stężenia prekursora w roztworze poddawanym działaniu ultradźwięków.

W metodzie fotochemicznej do redukcji jonów srebra i syntezy nanocząstek wykorzystuje się promieniowanie ultrafioletowe. Metoda ta wymaga obecności w roztworze substancji wychwytyjących fotony UV, najczęściej bis(*p*-sulfonatofenylo)fenylofosfiny (BSPP). Powstające nanostruktury są monodispersyjne, o niewielkich rozmiarach, nawet kilku nm. Metoda ta pozwala na kontrolowaną redukcję metalu poprzez kontrolę czasu naświetlania. W ten sposób udaje się często precyzyjnie kontrolować morfologię otrzymywanych nanostruktur przez zmianę długości fali użytego światła. Wadą większości metod fotochemicznych jest ograniczona objętość roztworu, który poddaje się naświetlaniu (KRAJCZEWSKI i KUDELSKI 2015). Rozwiązaniem tego problemu może być zastosowanie fotoreaktora przepływowego do pracy ciągłej, w którym objętość mieszaniny reakcyjnej może być bardzo duża, a naświetlanie zachodzi praktycznie w całej objętości próbki. Dodatkowo, powstające w fotoreaktorze nanocząstki koloidalne są bardziej stabilne, gdyż tworzenie się agregatów jest zdecydowanie mniejsze (SILVESTRINI i współaut. 2013). Zaletą metody fotochemicznej jest szybkie, wydajne i tanie pozyskiwanie jednorodnych nanocząstek.

BIOGENICZNA SYNTEZA NANOCZĄSTEK SREBRA

Wymienione powyżej metody syntezy są często niekorzystne, ze względu na wykorzystywanie toksycznych związków chemicznych lub promieniowania. Z tego powodu uwaga badaczy skierowana jest na biologiczne metody pozyskiwania nanocząstek metali, które są szybkie, niekosztowne i przyjazne dla środowiska.

Powszechnie wiadomo, że wiele mikroorganizmów, takich jak bakterie, promieniowce i grzyby, zdolnych jest do syntezy nanocząstek metali. Zdolność taką wykazują również rośliny.

Inną możliwością pozyskiwania nanocząstek metali jest wykorzystywanie peptydów.

Opublikowano wiele prac na temat biologicznej syntezy nanocząstek metali, głównie srebra i złota, oraz ich zastosowania w wie-

lu obszarach życia i działalności człowieka. Jednakże dokładny mechanizm syntezy tych nanostruktur przez mikroorganizmy i rośliny jest nadal problemem otwartym.

Peptydy. Idea, że peptydy mogą być stabilizatorami nanocząstek srebra datuje się od 2002 r. (NAIK i współaut. 2002). Peptydy, przylegając do nanoklastrów srebra, wzmagają redukcję jonu srebra i stymulują wzrost kryształu, osiągającego wielkość 60-150 nm. Aminokwasy zawarte w peptydach (wolne aminokwasy nie oddziałują) redukują jony srebra, tworząc kryształy srebra. Właściwości takie mają arginina, cysteina, lizyna, metionina i tyrozyna. Tyrozyna działa jako czynnik redukujący w środowisku zasadowym. W wysokim pH redukcja jonu srebra zachodzi wskutek jonizacji grupy fenolowej tyrozyny, która redukując jony srebra przekształca się w strukturę semi-chinonu. W tworzeniu nanocząstek srebra może również uczestniczyć tryptofan. Tryptofan obecny w białku jest przekształcany w formę przejściową, która jest donorem elektronu dla jonu metalu. Do syntezy AgNPs, opłaszczonych peptydami, mogą być wykorzystane białka zawierające wiązania dwusiarczkowe. Wielkość takich nanocząstek zmienia się pod wpływem pH środowiska i procesów agregacji. Sugeruje to, że taki nanomateriał może być interesujący do medycznego i biotechnologicznego wykorzystania. Znaczącego postępu w poznaniu mechanizmów powstawania nanocząstek metali dokonali SŁOČIK i współaut. (2005), wykorzystując modelową cząstkę wirusa roślinnego do syntezy nanocząstek złota. Reszty tyrozynowe na powierzchni wirusowego kapsydu redukowały AuCl₄, tworząc nanocząstki złota, gromadzone na powierzchni wirusa. Podobne zjawisko może zachodzić w powstawaniu nanocząstek srebra.

Bakterie. Wiadomo, że metale są toksyczne dla większości mikroorganizmów, ale np. srebro nie wywiera żadnego wpływu na niektóre bakterie. Oporność bakterii na srebro może być związana z akumulacją nanocząstek w przestrzeni międzykomórkowej, np. u bakterii rodzaju *Morganella* (PARIKH i współaut. 2008). Takie bakterie mogą redukować metal właśnie dzięki zwiększonej oporności na toksyczność. Cecha ta może być użyteczna w bioremediacji. Laboratoryjne wytwarzanie nanocząstek srebra przez bakterie budzi zainteresowanie ze względu na nieskomplikowaną procedurę, możliwość modyfikowania procesu i wzmacniania efektu przy użyciu technik genetycznych. Pierwsze doniesienie o biosyntezie nanocząstek srebra dotyczyło bakterii *Pseudomonas stutzeri* AG 259. Wytworzone przez tę bakterię nanocząstki tworzyły pojedyncze kryształy o

określonym kształcie, które zostały dokładnie scharakteryzowane przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM), energii dyspersyjnej promieniowania X (EDX) i elektronowej spektroskopii dyfrakcyjnej (EDS). Kryształy zawierające srebro były otoczone substancją organiczną bakterii, osiągały wielkość do 200 nm i miały kształt trójkątny lub sześciokątny.

Obserwacje syntezy nanocząstek srebra przez bakterie rodzaju *Morganella* sp. wykazały, że proces ten był zainicjowany po godzinie i wzrastał do 18 godzin, kiedy wytworzonych zostało 90% nanocząstek. Osiągały one wielkość ok. 20 nm i miały kształt sferyczny. Synteza nanocząstek srebra była zewnątrzkomórkowa, a nanocząstki były opłaszczane białkiem, nadającym im stabilność. W składzie aminokwasowym białka obecne były aromatyczne atomy węgla. Zewnątrzkomórkową syntezę AgNPs (5-50 nm) w obecności jonów srebra zaobserwowano również w hodowli *Bacillus subtilis*. Nanocząstki były stabilne, nie ulegały agregacji, a stabilność zapewniało białkowe opłaszczenie. Płyn po hodowli tej bakterii wykazywał wysoką aktywność reduktazy azotanowej. Właśnie ten enzym, wraz z przenośnikami elektronów (NADH) i innymi białkami, może być odpowiedzialny za redukcję jonów srebra, a następnie tworzenie nanocząstek u większości bakterii. Reduktaza azotanowa indukowana przez jony azotanowe redukuje jony srebra do srebra metalicznego. Poznano mechanizm syntezy nanocząstek srebra u bakterii fermentacji mlekowej. Wraz ze wzrostem pH wzrasta współzawodnictwo pomiędzy protonami i jonami metalu o ujemnie naładowane miejsca. Wysokie pH katalizuje otwarcie pierścienia monocukrów, np. glukozy, i utworzenie otwartego łańcucha oddechowego. Aldehyd dostarcza siły redukującej, bowiem w obecności jonów metalu ulega utlenieniu do kwasu karboksylowego, a jony metalu ulegają redukcji. W tym przypadku nie wyjaśniono, które struktury komórkowe są odpowiedzialne za biosorpcję i redukcję srebra.

Grzyby. Badania wskazują, że w syntezie grzybowej nanocząstek srebra uczestniczy NADH-zależna reduktaza azotanowa, i przenośniki chinonowe, a nanocząstki, podobnie jak u bakterii, są stabilizowane przez białko (DURAN i współaut. 2007). Analiza ekstraktu komórkowego *Trichoderma asperellum*, po usunięciu wytworzonych nanocząstek srebra, wykazała wzrost wiązań II aminowych, wiązań O-H oraz S-H, jak również wiązań karbonylowych i karboksylowych C=O wskazujących na wzrost stężenia białek w roztworach po wytworzeniu nanocząstek. Zakłada się, że aminokwasy z wiązaniami S-H (cyste-

ina) aktywnie uczestniczą w procesie redukcji jonów srebra.

Rośliny. Biosynteza nanocząstek srebra przez ekstrakty roślinne jest przedmiotem intensywnych badań, ale jej mechanizm nie jest dokładnie poznany, chociaż proponowanych jest kilka możliwości. W badaniach nad wytwarzaniem AgNPs w ekstrakcie z liści geranium wykazano, że grupy hydroksylowe obecne w terpenoidach są utleniane do grup karbonylowych, które działają jako czynnik redukujący jony srebra (SHANKAR i współaut. 2003). W roślinnej syntezie nanocząstek srebra podkreśla się udział peptydów. Mleczo *Jatropha curcas* zawiera cykliczny oktapeptyd kurkacyklinę A oraz cykliczny nanopeptyd kurkacyklinę B. Analiza FTIR tych związków, przed i po syntezie nanocząstek, wykazała wzrost podwójnych wiązań aminowych i zmianę wibracji grup (NH) C=O. Wskazuje to na udział cyklicznych peptydów w redukcji jonów srebra do nanocząstek srebra oraz w ich stabilizacji. Inny, możliwy mechanizm redukcji jonów srebra i wytwarzania nanocząstek wykryto u *Cyperus* sp. Był on związany z tautomerizacją chinonów (benzochinonów, cyperchinonów).

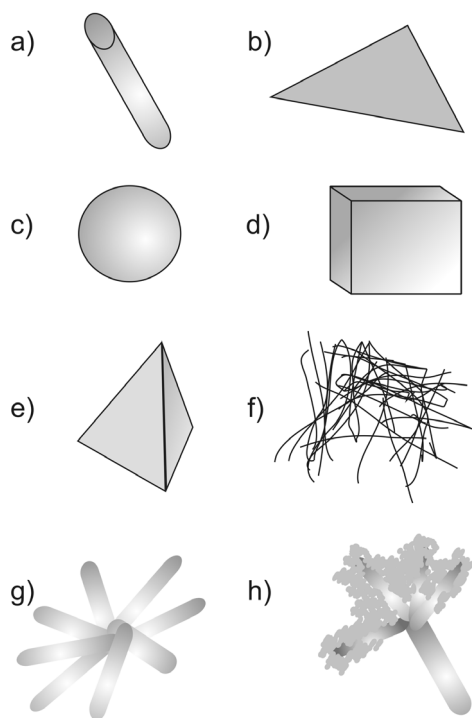
ANTYBAKTERYJNY POTENCJAŁ NANOCZĄSTEK SREBRA I MECHANIZM ICH DZIAŁANIA

Właściwości antybakteryjne srebra i jego związków są znane od dawna. Już w XIX w. sole srebra i jego koloidy były powszechnie stosowane w leczeniu i prewencji infekcji wywołanych przez drobnoustroje towarzyszące m.in. owrzodzeniom, oparzeniom czy przewlekłym ranom, ale również w przypadku sepsy, ostrego zapalenia najądrza, migdałków, a u niemowląt również zapalenia spojówek (SINTUBIN i współaut. 2012). Wraz z rozwojem ery antybiotykowej, po odkryciu właściwości antybakteryjnych penicyliny, użycie srebra zmniejszyło się. Jednak obecnie, w związku z brakiem dostępnych, skutecznych chemioterapeutyków, lecznicze znaczenie srebra wzrasta. Srebro jonowe, ze względu na podatność na tworzenie kompleksów oraz precypitacji, a wskutek tego łatwo ulegające inaktywacji, zostało zastąpione przez nanocząstki. Sugeruje się ponadto, że AgNPs wywołują mniej skutków ubocznych, a ich bezpieczeństwo i potencjał antybakteryjny mogą być dodatkowo wzmacniane przez różnego rodzaju modyfikacje, jak np. dodatek stabilizatorów.

W ostatnich latach liczba zastosowań i ilość zużywanego nanosrebra znacząco wzrosły. Udowodniono, że AgNPs hamują wzrost i przeżywalność bakterii, w tym patogenów człowieka i zwierząt, a także grzybów, pier-

wotniaków i stawonogów. Działają również antywirusowo i przeciwnowotworowo. Obecnie są najbardziej skomercjalizowanymi nanocząstkami metali i wchodzi w skład ponad 200 produktów, takich jak antybakteryjne opatrunki, urządzenia medyczne (np. cewniki, implanty czy protezy), materiały stosowane w stomatologii, przydomowe oczyszczalnie wody, tekstylia, kosmetyki, farby i artykuły gospodarstwa domowego. Z powodzeniem są wykorzystywane również w nano-inżynierii medycznej i farmaceutycznej jako nośniki służące do precyzyjnego dostarczenia związków terapeutycznych w miejsce infekcji, w diagnostyce chorób przewlekłych, optyce oraz chemii, gdzie pełnią rolę sensorów, przewodników i substratów do różnorodnych syntez.

Wszystkie nanocząstki, w tym również AgNPs, charakteryzują się wysokim stosunkiem powierzchni do objętości, rosnącym w miarę zmniejszania ich rozmiaru (średnicy). Mniejsze nanocząstki mają większą aktywność antybakteryjną. Oprócz wielkości, antybakteryjny potencjał AgNPs zależy od ich kształtu; te o kształcie trójkątnym działają silniej niż te wydłużone lub sferyczne. Różnorodność kształtu nanocząstek została zobrazowana na Ryc. 1. Wykazano także, że czynniki środowiskowe, takie jak obecność tlenu, pH i temperatura mogą wpływać na



Ryc. 1. Przykładowe kształty nanocząstek srebra.

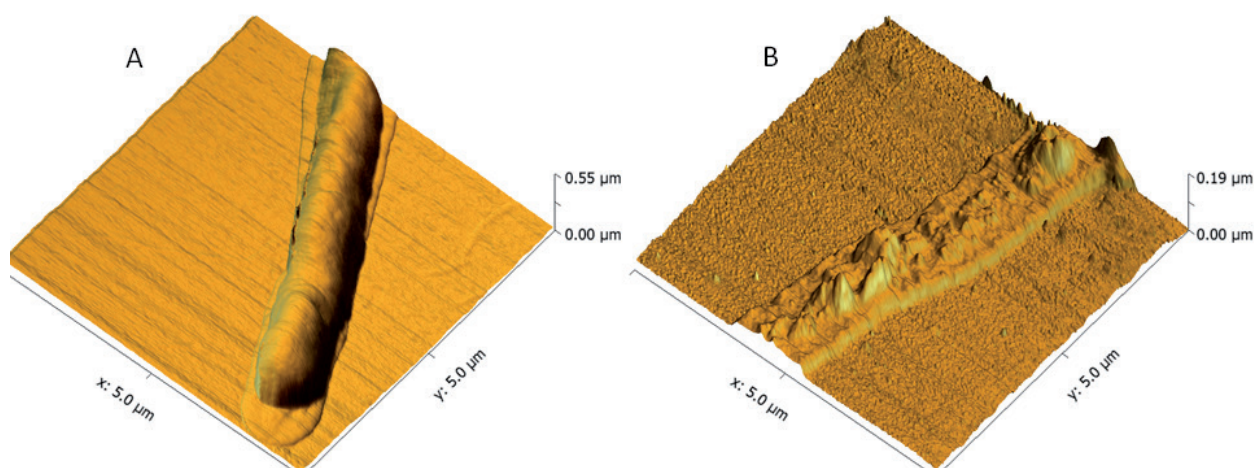
Schematy przedstawiają AgNPs w kształcie: a) pręta, b) trójkątów, c) kul, d) kostek, e) ostrosłupów, f) drutów, g-h) kwiatów.

aktywność preparatów AgNPs (SINGH i współaut. 2015).

Liczne doniesienia literaturowe podkreślają plejotropowy efekt wywierany przez nanocząstki na komórki bakteryjne, co jest związane z istnieniem licznych miejsc (celów) i mechanizmów ich działania. Pomimo intensywnych prac wielu zespołów badawczych, obecny stan wiedzy wciąż nie pozwala na wskazanie wszystkich celów i wytłumaczenie wszystkich mechanizmów aktywności nanosrebra. Pierwsze publikacje opisywały działanie AgNPs na modelowy gatunek bakterii Gram-ujemnej, *Escherichia coli*. Zaobserwowano pojawienie się otworów w osłonach bakteryjnych, co doprowadziło do zwiększenia ich przepuszczalności i w efekcie do śmierci komórki. Późniejsze badania, obejmujące inne gatunki bakterii, doprowadziły do postulowania trzech głównych mechanizmów działania nanocząstek na komórki bakteryjne. Są nimi: (i) bezpośrednie oddziaływanie AgNPs z błoną komórkową skutkujące jej zniszczeniem, (ii) produkcja reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) prowadząca do stresu oksydacyjnego i (iii) tworzenie kompleksów ze związkami zlokalizowanymi we wnętrzu komórki (LEMIRE i współaut. 2013).

Obserwacje mikroskopowe pokazały, że nanocząstki, atakując osłony, zmieniają morfologię komórek. Po opłaszczeniu komórki bakteryjnej powodują powstanie zagłębień na jej powierzchni i modyfikują potencjał elektrostatyczny osłon (Ryc. 2).

Hipotezy dotyczące sposobu przenikania AgNPs przez osłony komórkowe dotyczą właśnie oddziaływań elektrostatycznych z powierzchnią osłon, w tym z białkami obecnymi w osłonach, szczególnie tymi, które zawierają grupy tiolowe. Po dostaniu się do wnętrza komórek AgNPs powodują uszkodzenia DNA wskutek oddziaływań z resztkami fosforanowymi w szkieletcie fosfocukrowym. Poza tym upośledzają funkcjonowanie łańcucha oddechowego, podziały komórkowe i funkcje licznych enzymów, zwłaszcza tych bogatych w aminokwasy zawierające siarkę. Zaobserwowano również zaburzenia w produkcji trifosforanu adenozyнового (ATP) i zwiększoną podatność białek na denaturację. Analiza proteomiczna, przy użyciu metody elektroforezy dwukierunkowej w połączeniu ze spektroskopią masową, wykazała zmiany w ekspresji licznych genów w komórkach *E. coli* poddanych działaniu nanosrebra. Już krótka inkubacja z nanocząstkami prowadzi do nagromadzenia prekursorów ściany komórkowej, niektórych białek opiekuńczych i białka S6 będącego składnikiem małej podjednostki rybosomu (LOK i współaut. 2007).



Ryc. 2. Komórki *Bacillus subtilis* przed (A) i po traktowaniu (B) bionanocząstkami srebra (dokumentacja własna)

Na szczególną uwagę zasługuje zdolność nanocząstek do hamowania powszechnego u bakterii systemu komunikowania się opartego na zdolności do wyczuwania liczebności (ang. quorum sensing, QS). Przekroczenie przez liczbę bakterii wartości progowej, różnej dla różnych gatunków, a nawet szczepów i zależnej od środowiska, związane jest z osiągnięciem wartości progowej stężenia drobnocząsteczkowych substancji sygnałowych, autoinduktorów. Sygnał ten odbierany jest przez bakterie obecne w danym środowisku, co skutkuje zmianą ekspresji genów kontrolowaną przez regulatory transkrypcji. Funkcje regulatorów pełnią białka i małe cząsteczki RNA (ang. small RNA, sRNA). Liczba genów kontrolowanych przez QS jest duża, może przekraczać 10% genomu. Geny te kodują różnorodne funkcje, w tym te konieczne do życia i wzrostu komórek, rządzące zachowaniem się komórek w danym środowisku, warunkujące horyzontalny transfer genów oraz interakcję z innymi organizmami (NG i BASSLER 2009). Do najlepiej poznanych należą systemy QS u dwóch groźnych patogenów bakteryjnych, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Zaburzenie ich funkcjonowania przez nanocząstki srebra prowadzi do zmian wirulencji tych bakterii, np. zdolności do tworzenia biofilmów, co będzie opisane w dalszych częściach opracowania.

Należy zaznaczyć, że jony srebrne powstające z nanocząstek we wnętrzu komórki również przyczyniają się do antybakteryjnego efektu nanosrebra, działając bezpośrednio lub przez indukcję powstawania ROS. Wykazano, że Ag^+ oddziałują z cytochromami, co prowadzi do zahamowania transportu elektronów, a więc do zaburzeń funkcjonowania łańcucha oddechowego. Oprócz tego

Ag^+ hamują podziały komórkowe i systemy przekazywania sygnałów. Z kolei, ze względu na zdolność do wiązania się z kwasami nukleinowymi, interferują z procesami replikacji i transkrypcji, a w wyższych stężeniach prowadzą do degradacji DNA i RNA (RAI i współaut. 2012).

Duża liczba komórkowych celów, a w konsekwencji szerokie spektrum działania nanocząstek jest ich niewątpliwą zaletą i daje przewagę nad konwencjonalnymi antybiotykami. Postuluje się, że powstanie oporności na nanocząstki wiąże się z koniecznością wykształcenia wielu mechanizmów obronnych. Szansa na zajście różnych mutacji jednocześnie lub jednoczesne przekazanie determinantów oporności nie jest wysoka. Mimo to, w ostatnim roku pojawiło się doniesienie o wykształceniu oporności na nanosrebro u *E. coli*, a jeszcze wcześniej u *Salmonella* sp. Wiadomo też, że niektóre gatunki, np. *Morganella* sp., tolerują obecność dużego stężenia AgNPs, co umożliwia ich wykorzystanie w biologicznej syntezie nanocząstek.

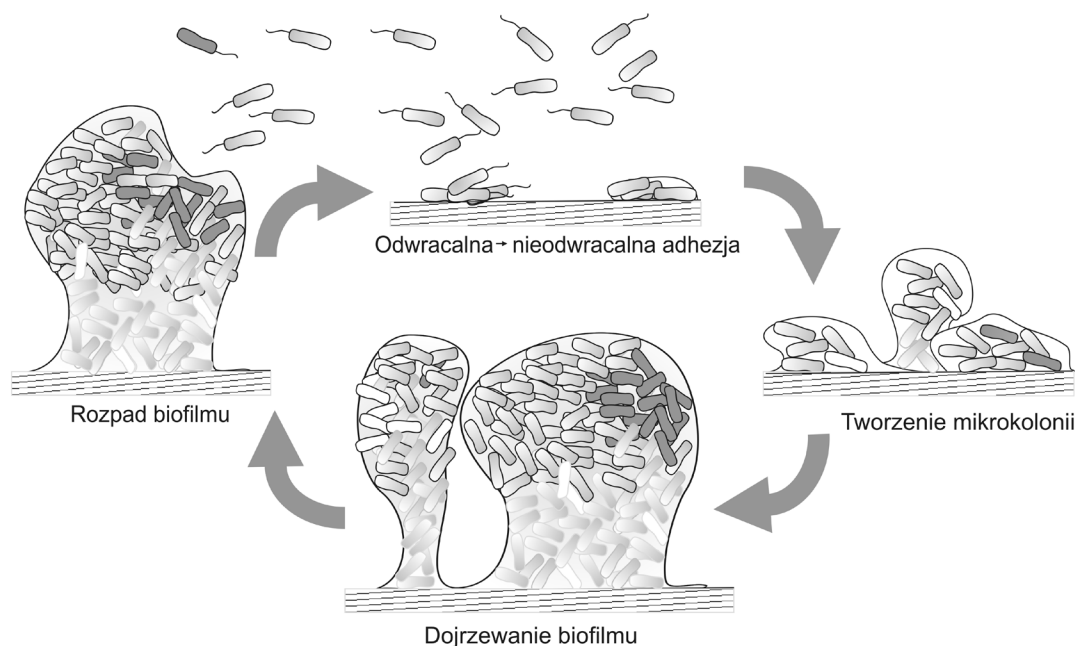
HAMOWANIE BIOFILMÓW BAKTERYJNYCH PRZEZ NANOCZĄSTKI

Biofilmy to osiadłe populacje jednego lub wielu gatunków mikroorganizmów, które są przytwierdzone do biotycznej lub abiotycznej powierzchni stałej, bądź tworzą się na granicy faz (PERCIVAL i współaut. 2011). Komórki w biofilmach otoczone są zewnątrzkomórkową substancją polimeryczną, złożoną głównie z wielocukrów, ale również z białek i kwasów nukleinowych, zwaną macierzą lub matriks biofilmu. Często w zespołach mikroorganizmów koegzystuje wiele gatunków bakterii, a także inne mikroorganizmy, jak

np. grzyby i pierwotniaki. Biofilmy występują powszechnie w różnych środowiskach, zarówno naturalnych, jak i sztucznych (stworzonych przez człowieka). Powstają na prawie wszystkich wilgotnych powierzchniach i zasiedlają niemal każdy żywy organizm. Komórki wchodzące w skład biofilmu różnią się pod względem fizjologicznym i morfologicznym od wolno-żyjących komórek tego samego gatunku. Złożony proces tworzenia się biofilmu składa się z kilku charakterystycznych, następujących po sobie stadiów, którymi są: adhezja, tworzenie mikrokolonii, dojrzewanie biofilmu i jego rozpad (Ryc. 3). Obserwowano liczne zależności między komórkami różnych gatunków wspólnie występującymi w biofilmach. Relacje między nimi mogą być pozytywne – synergistyczne lub antagonistyczne. Komórki mogą współdziałać w tworzeniu biofilmu, w lepszym wykorzystaniu substancji pokarmowych dostępnych w otoczeniu, co polega na aktywnej wymianie produktów niezbędnych do życia, czy w zwiększeniu zdolności przetrwania w niekorzystnych warunkach. Przykładami mikroorganizmów oddziałujących synergistycznie są bakterie w biofilmie tworzonym na zębach. Z drugiej strony, opisano przypadki antagonizmu między poszczególnymi gatunkami. Niektóre bakterie skutecznie konkurują z innymi gatunkami, wydzielając do podłoża różnorodne biosurfaktanty, enzymy czy metabolity, które mogą hamować każdy etap tworzenia się biofilmu, a nawet prowadzić do rozpadu tej struktury (RENDUELES i GHI-GO 2012). Stwierdzono między innymi eli-

minację patogennego gatunku *Enterococcus faecalis* przez bakterie mlekowe z gatunku *Lactobacillus*.

Literatura dotycząca biofilmów szczególnie dużo miejsca poświęca strukturom tworzonym przez bakterie patogenne. Ponad 80% bakterii patogennych zdolnych jest do wzrostu w postaci biofilmu podczas kolonizacji ludzkiego organizmu, a 65% wszystkich infekcji szpitalnych jest wywołanych właśnie przez biofilmy bakteryjne, w tym głównie tworzone przez *E. faecalis*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *P. aeruginosa* (DONLAN i COSTERTON 2002). Zdolność do tworzenia biofilmu ma bezpośrednie znaczenie w patogenezie m. in. chorób płuc u osób cierpiących na mukowiscydozę, zapalenia dróg oddechowych i zapalenia ucha środkowego. Bakterie żyjące w biofilmie z łatwością mogą się rozprzestrzeniać w organizmie, prowadząc do powstania chronicznych i trudnych do wyleczenia infekcji. Sprzyja temu spowolniony wzrost komórek i ich zdolność do uniknięcia ataku ze strony układu odpornościowego gospodarza. Przyjmuje się, że do powstania chronicznych infekcji w dużym stopniu przyczyniają się sub-populacje komórek przetrwałych, zwanych „persister cells”, które maksymalnie ograniczyły swój metabolizm w odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiska. Komórki te mogą przetrwać nawet przedłużającą się terapię antybiotykową, a następnie odłączyć się od biofilmu i kolonizować kolejne nisze ekologiczne.



Ryc. 3. Kolejne stadia tworzenia biofilmów bakteryjnych, opis w tekście (MARKOWSKA 2016).

Powszechnie wiadomo, że komórki w biofilmach charakteryzują się zwiększoną opornością na terapeutki; w porównaniu z komórkami wolno-żyjącymi tolerują obecność nawet 1000-krotnie wyższych dawek związków toksycznych, np. antybiotyków (MAH i O'TOOLE 2001). Obserwowana antybiotykoporność bakterii w biofilmach jest efektem wielu mechanizmów. Na pierwszym miejscu należy wymienić obecność macierzy, która stanowi barierę ograniczającą penetrację antybiotyku w strukturę biofilmu; dotyczy to zwłaszcza dojrzałych, rozbudowanych biofilmów. Wydłużenie czasu wnikania antybiotyków umożliwia bakteriom uruchomienie innych mechanizmów ochronnych, takich jak: produkcja enzymów, np. β -laktamaz katalizujących hydrolizę antybiotyków β -laktamowych. Drugą przyczyną oporności jest istnienie znacznej frakcji komórek przetrwałych, których cechy omówione były powyżej. W końcu, nie bez znaczenia jest efektywne funkcjonowanie transporterów wielolekowych, pomp MDR, obecnych np. u bakterii patogennych *P. aeruginosa* czy *S. aureus*, które odpowiadają za usuwanie substancji szkodliwych z komórek. Czynniki warunkujące oporność biofilmów na konkretny terapeutyk niejednokrotnie indukowane są przez jego obecność w środowisku (BALCAZAR i współaut. 2015).

Oporność biofilmów bakterii patogennych sprawia, że skuteczne ich zwalczanie stanowi jedno z największych wyzwań, jakim musi poddać współczesna medycyna. Duży wysiłek położony jest w poszukiwanie nowych technologii czy strategii oraz otrzymywanie nowych związków terapeutycznych, które mogłyby znaleźć zastosowanie w skutecznej terapii infekcji wywołanych przez biofilmy. Badania nad potencjałem nanocząstek srebra w zwalczaniu biofilmów doskońale wpisują się w oczekiwania medycyny. Jednak, jak dotąd, liczba publikacji opisujących to zagadnienie jest stosunkowo niewielka, jeśli porównać z doniesieniami dotyczącymi aktywności AgNPs na komórki wolno-żyjące. Nie w pełni również poznano mechanizm działania AgNPs na biofilmy, choć z pewnością część mechanizmów i celów komórkowego działania jest tożsama z efektem wywieranym na komórki planktoniczne. Wiadomo, że chociaż nanosrebro bardzo wydajnie zapobiega tworzeniu się i dalszym etapom rozwoju biofilmów, to uzyskany efekt zależy od gatunku, a nawet szczepu bakterii i generalnie jest silniejszy wobec biofilmów tworzonych przez bakterie Gram-ujemne; są jednak doniesienia przeczące tej prawidłowości. Warto przytoczyć kilka przykładów aktywności AgNPs skierowanej przeciw biofilmom bakterii patogennych. Wykazano,

że 24-godzinne biofilmy *P. aeruginosa* i *S. epidermidis* były hamowane w ponad 95% przez nanocząstki o kształcie sferycznym i przeciętnej średnicy 50 nm. Udowodniono również bardzo silne zahamowanie biofilmów tworzonych przez *Mycobacterium tuberculosis* (a także bakterii środowiskowych pochodzących z wody morskiej). Z kolei biofilmy tworzone przez niektóre szczepy *E. coli* były odporne na działanie AgNPs. Należy jednak zaznaczyć, że brak efektu był spowodowany nie tyle opornością komórek wchodzących w skład biofilmu lub jego rozbudowaną strukturą, ale wynikał raczej z agregacji nanocząstek, w efekcie czego powstawały skupiska cząstek o rozmiarach nawet 40-krotnie większych niż nanocząstki wyjściowe. Skuteczność działania nanocząstek została udowodniona nie tylko wobec biofilmów rozwijających się w warunkach statycznych, ale również powstających w bioreaktorach, a obserwacja ta ma duże znaczenie aplikacyjne. Z aplikacyjnego punktu widzenia istotne są również doniesienia dotyczące hamowania przez AgNPs powstawania biofilmów na urządzeniach medycznych. Wykazano na przykład, że cewniki urologiczne, których powierzchnia była pokryta nanosrebrem, charakteryzowały się opornością na zasiedlanie przez *E. coli*, *S. aureus*, a także przez grzyb *Candida albicans*, nawet w warunkach ciągłego przepływu płynu. Stwierdzono również, że powleczenie zębiny nanosrebrem skutecznie zapobiega tworzeniu się biofilmu na tej powierzchni, a także w jej najbliższym otoczeniu. Skuteczność AgNPs w zapobieganiu powstawania, a nawet w usuwaniu (eradykacji) już utworzonych biofilmów z urządzeń medycznych i przemysłowych spowodowała intensywne próby zwiększenia aktywności nanocząstek, a zwłaszcza ich stabilności, głównie przez zapobieganie ich naturalnej tendencji do agregacji. Aby osiągnąć ten cel testuje się różne stabilizatory, takie jak skrobia, cytrynian i aminokrzemionka, a także sprawdza się liczne kompozyty złożone z nanosrebra i innych związków.

WSPÓLDZIAŁANIE NANOCZĄSTEK Z KONWENCJONALNYMI ANTYBIOTYKAMI

W badaniach łącznego efektu działania związków np. o potencjale antybakteryjnym, najbardziej pożądaną interakcją jest synergizm między badanymi komponentami. Wśród wielu definicji synergii przytoczyć można tę autorstwa BERENBAUMA (1989). Postuluje ona, że z synergia mamy do czynienia, gdy działanie mieszaniny badanych związków jest silniejsze od sumy ich oddzielnych efektów. Pozostałe rodzaje interakcji to: (i) oddziaływanie addytywne, również

o charakterze dodatnim, lecz nie tak silnym efekcie działania jak synergizm, (ii) oddziaływanie zerowe, zwane również neutralnym, gdy nie zachodzi znoszenie ani wzmocnienie działania związków po ich połączeniu oraz (iii) oddziaływanie antagonistyczne. Antagonizmem określanym jest efekt mniejszy niż suma oddziaływań indywidualnych związków.

Do niewątpliwych zalet stosowania kombinacji związków aktywnych biologicznie, a działających synergicznie, można zaliczyć redukcję ewentualnych skutków ubocznych każdej substancji z osobna, gdyż w tej sytuacji możliwe jest zastosowanie niższych dawek obu związków przy zachowaniu takiego samego, a nawet większego efektu. Takie kombinacje mogą przywracać skuteczność działania wielu terapeutycznym, w tym antybiotycznym, które utraciły skuteczność ze względu na mechanizmy oporności wykształcone przez drobnoustroje. Terapia skojarzona daje szansę na krótsze i bardziej skuteczne leczenie chorób bakteryjnych. W badaniach *in vitro* wykazano, że nanocząstki srebra szczególnie skutecznie podnoszą efektywność działania obecnych na rynku chemioterapeutyków. Stwierdzono istnienie oddziaływań synergistycznych między AgNPs a ampicylina, gentamycyna, streptomycyna i wankomycyna wobec komórek *E. coli* i *P. aeruginosa*. Synergizm odnotowano również dla chloramfenikolu. W tym przypadku za obserwowany efekt odpowiedzialny jest prawdopodobnie aktywny transport antybiotyku do wnętrza komórki przez AgNPs. Istnieją jednak sugestie, że współdziałanie może wynikać z generowania powstania ROS w komórce, podczas gdy sam antybiotyk mający działanie bakteriostatyczne nie wywołuje stresu oksydacyjnego. Z kolei współdziałanie nanocząstek srebra z ampicylina polega na tworzeniu kompleksów efektywnie działających na ścianę komórkową bakterii, czego wynikiem jest zmniejszenie usieciowania głównego polimeru budującego ścianę, peptydoglikanu, co w rezultacie prowadzi do lizy komórki. Na szczególną uwagę zasługuje synergizm między nanosrebrem a cefalosporyną w przypadku *E. coli* oraz nanosrebrem a wankomycyna w przypadku *K. pneumoniae*. Te dwa antybiotyki były do niedawna nielicznymi skutecznymi w leczeniu chorób wywołanych przez wymienione bakterie, a więc pojawienie się szczepów opornych stanowi bardzo poważne zagrożenie terapeutyczne (FAYAZ i współaut. 2010). Synergizm obserwowano również w przypadku działania kombinacji związków na biofilmy bakteryjne (MARKOWSKA 2016). Odnotowano pozytywny efekt AgNPs podanych z: (i) chloramfenikolem na biofilm *S. typhi*, (ii) kanamycyna na

biofilm kilku gatunków bakterii patogennych, (iii) ampicylina i aztreonamem (monobaktamem) na biofilm *P. aeruginosa*. Wykazano, że im mniejsze są nanocząstki srebra, tym silniej oddziałują z antybiotykiem.

Obserwowane synergiczne oddziaływania dają nadzieję na wykorzystanie w przyszłości kombinacji nanosrebra i konwencjonalnych, choć już często mało skutecznych farmaceutyków, w terapiach przewlekłych chorób wywołanych przez bakterie.

WPŁYW NANOCZĄSTEK SREBRA NA EUKARYOTA

Bardzo znaczna, niemal powszechna, obecność produktów nanotechnologii, zarówno w rozwiązaniach przemysłowych, jak i w przedmiotach codziennego użytku, stwarza obawy związane z bezpieczeństwem tak szerokiego zastosowania. Pociąga to za sobą obserwowany w ostatnich latach wzrost liczby badań nad efektem działania nanocząstek, zwłaszcza srebra, na komórki organizmów wyższych. Pierwotnie AgNPs uważane były za nietoksyczne dla komórek ssaków, obserwowano jedynie efekt uboczny, spowodowany ich przedawkowaniem, a objawiający się zmianą pigmentacji skóry, zwaną argyrią (srebrzycą). Jednak wyniki ostatnich prac badawczych coraz częściej wskazują na toksyczność nanosrebra wobec organizmów zwierząt, zwłaszcza ssaków, choć nie brakuje doniesień polemizujących z tą teorią (WJNHOVEN i współaut. 2009). Mimo dynamicznego rozwoju badań, liczba dostępnych informacji na temat toksyczności nanomateriałów nie jest duża, jeśli zważyć dynamikę rozwoju nanotechnologii. Z kolei niejednoznaczność uzyskanych danych spowodowana jest wpływem wielu czynników, takich jak rozmiar nanocząstek, wielkość i właściwości chemiczne powierzchni, stan agregacji lub rozpuszczalność w wodzie, na wyniki badań.

Postuluje się, że najsilniejszym efektem toksycznym charakteryzują się nanocząstki srebra. Większość badań toksykologicznych prowadzonych jest w układzie *in vitro*. Jak dotąd badania wykonywano na komórkach alg, skorupiaków, ryb, nicieni, pierwotniaków i ssących liniach komórkowych (BONDARENKO i współaut. 2013). Udowodniono nanotoksyczny efekt AgNPs na komórki szczurze i mysie, w tym na komórki guza nadnerczy linii A549 i PC-12. Podkreśla się jednak istnienie wprost proporcjonalnej zależności między ilością jonów srebrowych powstających z nanocząstek a ich efektem toksycznym. Stosunkowo dużo badań dotyczyło wpływu AgNPs na komórki ludzkie, w tym makrofagi i komórki włókniako-mięsaka ludzkiego linii HT-1080 oraz nabłonka po-

chwy linii A431. Udowodniono, że w komórkach makrofagów AgNPs indukowały sekrecję cytokin prozapalnych, interleukin Il-6 i Il-10 oraz TNF- α , z kolei w komórkach linii A431 po dodaniu nanocząstek srebra obserwowano oznaki stresu oksydacyjnego, zwiększoną peroksydację lipidów I fragmentację DNA sugerującą apoptozę. Testowano również wpływ nanocząstek na linie komórkowe A549 i SGC-7901 (raka żołądka), HepG2 (raka wątroby) i MCF-7 (raka piersi) (ARORA i wspaut. 2008). Wykazano zmiany w morfologii komórek, osłabienie integracji osłon, zwiększoną produkcję ROS, wstrzymanie cyklu rozwojowego w fazie S i apoptozę niewielkiego odsetka komórek.

Organizmy wyższe są narażone na ekspozycję na nanocząstki głównie przez ich respirację i kontakt ze skórą, a organizm ludzki dodatkowo przez aplikację na powierzchnię ran lub implantację biomateriałów. Toksyczność i biodystrybucję nanosrebra badano *in vivo* na modelu rybim (*Danio rerio*), szczurzym i mysim, a także na śwince morskiej i świni domowej (LIKUS i współaut. 2013). Udowodniono, że AgNPs dostarczone do organizmu przez układ oddechowy, pokarmowy czy wstrzyknięcie były następnie identyfikowane we krwi zwierząt, a po pewnym czasie wywierały efekt toksyczny na kilka narządów, w tym mózg. Obserwowano zmniejszanie wydajności pracy płuc i pojawienie się tam stanu zapalnego oraz niewielkie zmiany w wątrobie. W innych testach sprawdzono poziom przeciwciał (IgG i IgM) we krwi, proliferację limfocytów i poziom uwalnianych cytokin w organizmie szczura po doustnej ekspozycji na nanosrebro. Wyniki nie wskazywały na immunotoksyczność AgNPs, jednak zauważono akumulację srebra w mózgu i jądrach. Z kolei AgNPs aplikowane powierzchniowo na skórę świnki morskiej powodowały pojawienie się miejscowego odczynu zapalnego, a także penetrowały inne części organizmu, wywołując niewielkie uszkodzenia wątroby i śledziony. U *D. rerio* obserwowano opóźnienie w wylęganiu jaj, zaburzenia osi ciała, skrócenie struny grzbietowej i zaburzenia rytmu serca. Należy podkreślić, że wszystkie te zaburzenia były notowane po zastosowaniu dużych dawek nanosrebra i stosunkowo długiego czasu jego aplikacji. Stosowanie niskich dawek, przez krótki czas nie wywoływało żadnego skutku, albo efekt był minimalny.

Brakuje badań dotyczących wpływu nanocząstek metali na stan zdrowia ludzi, szczególnie narażonych zawodowo. Zwrócono uwagę, że objawy spotykane w praktyce klinicznej, jak np. wysięk z ran, obniżają cytotoxyczność stosowanych nanocząstek srebra, w tym wypadku wysokie stężenie białek

w wysiękach może neutralizować toksyczność nanosrebra względem sąsiednich tkanek (WONG i LIU 2010).

WPŁYW NANOCZĄSTEK NA ŚRODOWISKO

Rozwój nanotechnologii umożliwił wprowadzenie nanomateriałów i nanocząstek do wielu produktów użytkowych. Prawdopodobieństwo ich niepożądanego działania na organizmy żywe i środowisko stanowi obecnie przedmiot badań biologów, toksykologów i ekologów (TOLAYMAT i współaut. 2010). Biologiczna aktywność nanocząstek srebra wpływa na zwiększenie ryzyka środowiskowego. Nanostruktury, w tym nanocząstki metali przedostające się do środowiska, nie tracą swojej toksyczności. Stanowią problem dla prawidłowego funkcjonowania różnych ekosystemów, a szczególnie mikrobiomu gleby. Wykazano, że bakterie glebowe wykazują wysoką wrażliwość na działanie nanoproduktów (VLACHOGIANNI i VALAVANIDIS 2014). Nanoprodukty i nanocząstki mogą przedostawać się do środowiska glebowego poprzez bezpośrednie dodawanie ich do gleby w postaci komponentów środków ochrony roślin lub w postaci odpadów (TOLAYMAT i współaut. 2010).

Nanocząstki srebra wykazują szeroki zakres aktywności biobójczej, przez co mogą obniżać bioróżnorodność zasobów, eliminując gatunki podatne na ich działanie. Mogą stanowić zagrożenie dla gatunków wykorzystywanych w biodegradacji zanieczyszczeń środowiska i w procesach bioremediacji gruntów (KUMAR i współaut. 2011). Zaburzenia w funkcjonowaniu drobnoustrojów glebowych, w szczególności bakterii wiążących azot z rodzaju *Bradyrhizobium*, mogą prowadzić do zakłócenia cyklu obiegu pierwiastków (KUMAR i współaut. 2011).

Nanocząstki wymagają ciągłego monitoringu w środowisku, ważna jest ciągła kontrola kierunku ich migracji (TOLAYMAT i współaut. 2010). Istotna jest również potrzeba opisywania zależności pomiędzy nanomateriałami a kontaktującymi się z nimi organizmami żywymi, głównie bakteriami i grzybami glebowymi, stanowiącymi pierwszą barierę pomiędzy produktami nanotechnologicznymi a środowiskiem naturalnym (HASTINGS i współaut. 2015). Ocena ryzyka środowiskowego nanomateriałów i nanocząstek oparta jest na określeniu ich krótko- i długoterminowego wpływu na środowisko i na organizmy w nim występujące oraz możliwość ich transformacji (TOLAYMAT i współaut. 2010). Analiza ryzyka polega na porównaniu przewidywanego stężenia danej substancji w środowisku (ang. predicted environmen-

tal concentration, PEC) do wartości stężenia tej substancji bez przewidywanego działania szkodliwego w środowisku (ang. predicted no-effect concentration, PNEC). Jeśli współczynnik PEC/PNEC jest ≤ 1 , wtedy ryzyko dla środowiska nie występuje, natomiast, gdy PEC/PNEC wynosi > 1 , stwierdza się występowanie zagrożenia (TOLAYMAT i współaut. 2010).

Przedostawanie się nanoproduktów i nanocząstek do środowiska może następować ze źródeł punktowych lub powierzchniowych. Źródłami punktowymi mogą być miejsca produkcji nanomateriałów i NPs, składowiska i spalarnie odpadów oraz oczyszczalnie ścieków. Natomiast źródła powierzchniowe (obszarowe) związane są z uwalnianiem nanomateriałów na drodze użytkowania produktów zawierających je w swoim składzie (VLACHOGIANNI i VALAVANIDIS 2014). Na przykład, w procesie prania skarpetek z nanosrebrem uwalniane są do wody jony srebra i srebro w postaci koloidalnej. Ponadto, wykazano, że w wodach odpływowych z pralki wzbogaconej w nanomateriały zawartość uwolnionego nanosrebra wynosiła 11 $\mu\text{g/L}$ (BENN i WESTERHOFF 2008).

Spalarnie odpadów, utylizując wyeksploatowane produkty zawierające nanomateriały, mogą uwalniać nanoskładniki. Atmosfera jest w mniejszym stopniu obciążona tego typu zanieczyszczeniami, w porównaniu z innymi komponentami środowiska. Jest to związane głównie ze stosunkowo krótkim czasem przebywania cząstek mniejszych niż 100 nm w atmosferze (ok. 10 dni) (VLACHOGIANNI i VALAVANIDIS 2014).

Nieznany jest stopień zagrożenia wód powierzchniowych i gruntowych przez nanocząstki metali. Uważa się, że zagrożenie to byłoby dużo wyższe, gdyby nanocząstki srebra mogły tworzyć stabilne zawiesiny w wodzie. Biodostępność i toksyczność nanocząstek srebra związana jest ze stabilnością koloidalną. Stabilność tę charakteryzują różne czynniki, takie jak rodzaj użytego stabilizatora i warunki środowiskowe. Występujące w środowisku wodnym naturalne substancje organiczne znacząco wpływają na rozkład wielkości cząstek, ich stabilność i właściwości powierzchniowe srebra w fazie wodnej. Właściwości te wpływają na transport i toksyczność nanocząstek srebra w systemach wodnych (TOLAYMAT i współaut. 2010).

Synteza chemiczna wymaga zastosowania wielu związków (często toksycznych), będących reduktorami czy stabilizatorami, które wpływają na toksyczność procesu wytwarzania nanocząstek srebra i są potencjalnym zagrożeniem dla środowiska naturalnego (MALINA i współaut. 2010). Obecnie brakuje badań dotyczących oceny właściwo-

ści chemicznych powszechnie stosowanych stabilizatorów na mobilność i zachowanie nanocząstek srebra w środowisku naturalnym (TOLAYMAT i współaut. 2010). Metody fizykochemiczne, oprócz wad wspomnianych powyżej, wymagają dużego nakładu energii.

Nadal brakuje odpowiednich i precyzyjnych uwarunkowań prawnych dotyczących obrotu nanomateriałami i zasad regulujących ich bezpieczne stosowanie (HASTINGS i współaut. 2015).

PODSUMOWANIE

Nanocząstki srebra charakteryzują się dużym potencjałem antybakteryjnym, przewyższającym potencjał jonów srebrowych, poza tym lepiej przenikają do komórek bakteryjnych. Hamują również rozwój biofilmów, a nawet eradykują już utworzone struktury. W związku z tym mogą stanowić bardzo obiecującą alternatywę dla konwencjonalnych antybiotyków. Do niewątpliwych zalet AgNPs można zaliczyć obecność wielu komórkowych celów i różnorodne mechanizmy ich działania, co pociąga za sobą brak lub ograniczenie możliwości wykształcenia bakteryjnej oporności. Natomiast pewną wadą nanosrebra jako potencjalnego terapeutyku jest brak specyficzności działania i znaczny efekt wywierany na komórki eukariotyczne (linie tkankowe) i organizmy wyższe. Należy tu jednak zaznaczyć, że dawki cytostatyczne przewyższają stężenia przeciwbakteryjne, a i sam efekt cytotoksyczny może znaleźć terapeutyczne zastosowanie, np. w terapii nowotworów. Opracowanie metod bezpiecznej dla środowiska, biologicznej syntezy AgNPs zwiększyłoby produkcję oraz biologiczne zastosowanie nanosrebra. Mimo że preparaty AgNPs, często w postaci kompozytów zawierających inne związki, są używane powszechnie w przemyśle, np. tekstylnym, i przy produkcji narzędzi medycznych, to w terapii chorób wywoływanych przez bakterie stosowane są bardzo ostrożnie, głównie przy leczeniu infekcji powierzchniowych. Z pewnością liczne badania podstawowe prowadzone *in vitro* muszą być uzupełnione badaniami *in vivo*, wraz z przejściem całej wymaganej procedury, przed uzyskaniem atestu do klinicznego zastosowania określonego preparatu nanosrebra.

Streszczenie

Rosnąca oporność bakterii, zwłaszcza rosnących w biofilmach, na konwencjonalne antybiotyki jest przyczyną szerokich poszukiwań nowych środków terapeutycznych. Nanocząstki srebra, ze względu na udowodniony potencjał antybakteryjny, są intensywnie badane. Istnieje kilka metod syntezy nanosrebra, najbardziej przyjazna dla środowiska jest synteza biogeniczna. Nanocząstki srebra charakteryzują się mnogością wewnątrzkomór-

kowych celów działania. Mechanizm ich antybakteryjnej aktywności opiera się głównie na uszkodzeniu osłon bakteryjnych i indukcji reaktywnych form tlenu. Nanocząstki srebra, oprócz dużego potencjału antybakteryjnego, zdolne są do współdziałania z konwencjonalnymi antybiotykami, w ten sposób potęgowana jest ich aktywność. Wiele badań *in vitro* i *in vivo* wskazuje na toksyczność nanosrebra wobec Eukaryota, obiecujący jest zwłaszcza ich potencjał anty-nowotworowy. Powszechne użycie nanocząstek wymusza konieczność rygorystycznego monitoringu ich syntezy i stosowania.

LITERATURA

- ARORA S., JAIN J., RAJWADE J. M., PAKNIKAR K. M., 2008. *Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies*. *Toxicol. Lett.* 179, 93-100.
- BALCAZAR J. L., SUBIRATS J., BORREGO C. M., 2015. *The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance*. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2015.01216
- BENN T. M., WESTERHOFF P., 2008. *Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics*. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4133-4139.
- BERENBAUM M. C., 1989. *What is synergy?* *Pharmacol. Rev.* 41, 93-141.
- BONDARENKO O., JUGANSON K., IVASK A., KASEMETS K., MORTIMER M., KAHRU A., 2013. *Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review*. *Arch. Toxicol.* 87, 1181-1200.
- CZAPLEWSKI L., BAX R., CLOKIE M., DAWSON M., FAIRHEAD H., FISCHETTI V. A., FOSTER S., GILMORE B. F., HANCOCK R. E., HARPER D., HENDERSON I. R., HILPERT K., JONES B. V., KADIOGLU A., KNOWLES D., ÓLAFSDÓTTIR S., PAYNE D., PROJAN S., SHAUNAK S., SILVERMAN J., THOMAS C. M., TRUST T. J., WARN P., REX J. H., 2016. *Alternatives to antibiotics – a pipeline portfolio review*. *Lancet Infect. Dis.* 16, 239-251.
- DONLAN R.M., COSTERTON J.W., 2002. *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167-193.
- DURAN N., MARCATO P. D., DE SOUZA G. I. H., ALVES O. L., ESPOSITO E., 2007. *Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textil fabrics and their effluent treatment*. *J. Biomed. Nanotechnol.* 3, 201-228.
- FAYAZ A. M., BALAJI K., GIRILAL M., YADAV R., KALACHELVAN P.T., VENKETESAN R., 2010. *Bio-genic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria*. *Nanomedicine* 6, 103-109.
- HASTINGS J., JELIAZKOVA N., OWEN G., TSILIKI G., MUNTEANU C. R., STEINBECK C., WILLIGHAGEN E., 2015. *eNanoMapper: harnessing ontologies to enable data integration for nanomaterial risk assessment*. *J. Biomed. Seman.* doi:10.1186/s13326-015-0005-5.
- IRAVANI S., KORBEBANDI H., MIRMHAMMADI S.V., ZOLFAGHARI B., 2014. *Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods*. *Res. Pharm. Sci.* 9, 385-406.
- JIN J. Y., OUYANG X. Y., LI J., JIANG J., WANG H., WANG Y. X., YANG R., 2011. *DNA template-synthesized silver nanoparticles: A new platform for high-performance fluorescent biosensing of biothiols*. *Sci. China* 54, 1266-1272.
- JUNG J., OH H., NOH H., JI J., KIM S., 2006. *Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area*. *J. Aerosol. Sci.* 37, 1662-1670
- KRAJCZEWSKI J., KUDELSKI A., 2015. *Fotocchemiczna synteza nanocząstek srebra i złota*. *Wiad. Chem.* 69, 3-4.
- KUMAR N., SHAH V., WALKER V. K., 2011. *Perturbation of an arctic soil microbial community by metal nanoparticles*. *J. Hazard. Mater.* 190, 816-822.
- LEMIRE J. A., HARRISON J. J., TURNER R. J., 2013. *Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications*. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 371-384.
- LIKUS W., BAJOR G., SIEMIANOWICZ K., 2013. *Nanosilver – does it have only one face*. *Acta Biochim. Pol.* 4, 495-501.
- LOK C.-N., HO C.-M., CHEN R., HE Q.-Y., YU W.-Y., SUN H., TAM P. K.-H., CHIU J.-F., CHE C.-M., 2007. *Silver nanoparticles: partial oxidation and antimicrobial activities*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12, 527-534.
- MAH T.-F. C., O'TOOLE G. A., 2001. *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents*. *Trends Microbiol.* 9, 34-39.
- MALINA D., SOB CZAK-KUPIEC A., KOWALSKI Z., 2010. *Nanocząstki srebra – przegląd chemicznych metod syntezy*. *Czasopismo Techniczne*. Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej. 107, 10.
- MARKOWSKA K., 2016. *Antybakteryjne działanie nanocząstek srebra – wpływ na strukturę i funkcje komórek bakteryjnych*. Praca doktorska, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii.
- NAIK R. R., STRINGER S. J., AGARWAL G., JONES S. E., STONE M. O., 2002. *Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles*. *Nat. Mat.* 1, 169-172.
- NG W. L., BASSLER B. L., 2009. *Bacterial quorum-sensing network architectures*. *Annu. Rev. Genet.* 43, 197-222.
- NIEMIROWICZ K., MARKIEWICZ K. H., WILCZEWSKA A. Z., CAR H., 2012. *Magnetic nanoparticles as a new diagnostics tools in medicine*. *Adv. Med. Sci.* 57, 196-207.
- PARIKH R. Y., SINGH S., PRASAD B. L.V., PATOLE M. S., SASTRY M., SHOUCHE Y. S., 2008. *Extracellular synthesis of crystalline silver nanoparticles and molecular evidence of silver resistance from Morganella sp.: towards understanding biochemical synthesis mechanism*. *Chem. Biochem.* 9, 1415-1422.
- PATAKFALVI R., VIRÁNYI Z., DÉKÁNY I., 2004. *Kinetics of silver nanoparticle growth in aqueous polymer solutions*. *Colloid Polym. Sci.* 283, 299-305.
- PERCIVAL S. L., MALIC S., CRUZ H., WILLIAMS D. W., 2011. *Introduction to biofilms*. [W:] *Biofilms and veterinary medicine*. Springer series on biofilms 6. PERCIVAL S. L., KNOTTENBELT D., COCHRANE C. (red.). Springer, Berlin, Heidelberg, 41-68.
- RENDUELES O., GHIGO J.-M., 2012. *Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors*. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 972-989.
- RAI M. K., DESHMUKH S. D., INGLE A. P., GADE A. K., 2012. *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*. *J Appl. Microbiol.* 112, 841-852.
- SHANKAR S. S., AHMAD A., SASTRY M., 2003. *Geranium leaf assisted biosynthesis of silver*

- nanoparticles*. *Biotechnol. Prog.*, 19, 1627-1631.
- SHARMA V. K., YNGARD R. A., LIN Y., 2009. *Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities*. *Adv. Colloid Interface Sci.* 145, 83-96.
- SILVESTRINI S., CAROFIGLIO T., MAGGINI M., 2013. *Shape-selective growth of silver nanoparticles under continuous flow photochemical conditions*. *Chem. Commun.* 49, 84.
- SINTUBIN L., VERSTRAETE W., BOON N., 2012. *Biologically produced nanosilver: current state and future perspectives*. *Biotech. Bioeng.* 109, 2422-2436.
- SINGH R., SHEDBALKAR U. U., WADHAWI S. A., CHOPADE B. A., 2015. *Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism and applications*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4579-4593.
- SLOCIK J. M., NAIK R. R., STONE M. O., WRIGHT D. W., 2005. *Viral templates for gold nanoparticle synthesis*. *J. Mater. Chem.* 15, 749-753.
- TOLAYMAT T. M., EL BADAWY A. M., GENAIDY A., SCHECKEL K. G., LUXTON T. P., SUIDAN M., 2010. *An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers*. *Sci. Total Environ.* 408, 999-1006.
- VLACHOGIANNI T., VALAVANIDIS A., 2014. *Nanomaterials: Environmental pollution, ecological risks and adverse health effects*. *Nano Sci. Nano Technol. Indian J.* 8, 208-226.
- WIJNHOFEN S. W. P., PEIJNENBURG W. J. G. M., HERBERTS C. A., HAGENS W. I., OOMEN A. G., HEUGENS E. H. W., ROSZEK B., BISSHOPS J., GOSENS I., VAN DE MENT D., DEKKERS S., DE JONG H., VAN ZIJVERDEN M., SIPS A. J. A. M., GEERTSMA R. E., 2009. *Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment*. *Nanotoxicology* 3, 109-138.
- WONG K. K. Y., LIU X., 2010. *Silver nanoparticles – the real “silver bullet” in clinical medicine?* *Med. Chem. Comm.* 1, 125-131.

KOSMOS Vol. 66, 1, 125–138, 2017

KRYSTYNA IZABELLA WOLSKA¹, KATARZYNA MARKOWSKA¹, MAGDALENA WYPIJ², PATRYCJA GOLIŃSKA², HANNA DAHM²

¹Department of Bacterial Genetics, Institute of Microbiology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, ²Department of Microbiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, Nicolaus Copernicus University, Lwowska 1, 87-100 Toruń, E-mail: izabelaw@biol.uw.edu.pl, kgrzes@biol.uw.edu.pl, mwypij@umk.pl, golinska@umk.pl, dahm@umk.pl

SILVER NANOPARTICLES, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Summary

The growing resistance of bacteria, especially those living in biofilms, to conventional antibiotics causes a broad search for new therapeutic agents. Silver nanoparticles, due to their known antibacterial activity, are intensively studied. Among several methods of nanosilver synthesis, the most friendly is the biogenic “green” synthesis. The targets and mechanisms of action of silver nanoparticles are pleiotrophic, and involve mainly destruction of cellular envelopes and induction of reactive oxygen species. Nanosilver particles are also able to interact with conventional antibiotics, thus enhancing their antibacterial activity. The data obtained both *in vivo* and *in vitro* demonstrate the toxic effect of nanosilver on Eukaryota, including its antitumor potential. The broad usage of silver nanoparticles calls for a restricted monitoring of their production and application.