Toksičnost srebrnih nanočestica

Mićak, Ana-Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:266470

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Ana-Marija Mićak

Toksičnost srebrnih nanočestica

(Toxicity of silver nanoparticles)

Završni rad

Mentor:

doc. dr. sc. Mirela Samardžić

Neposredni voditelj:

dr. sc. Olivera Galović

Osijek, 2015.

Sažetak

Toksičnost srebrnih nanočestica (AgNP) se istražuje na mnogim područjima. Najviše se istražuju njihova antibakterijska svojstva. Također se istražuje i njihov utjecaj na viruse i gljivice, a posebno toksičnost pri određenim koncentracijama. Pokazalo se kako čestice koje su veće, djeluju jače toksično od manjih. Također se pokazalo da će suspenzije u kojima se nalazi veća količina čestica srebra, odnosno iona, biti toksičnije od onih koje sadrže manju količinu čestica. Istraživao se utjecaj citotoksičnosti i genotoksičnosti AgNP, te se pokazalo kako veće koncentracije iona srebra djeluju toksičnije. Općenito, AgNP su veoma reaktivne, te zbog toga u većim količinama djeluju toksično. Pojedina istraživanja se slažu oko toksičnog utjecaja srebrnih nanočestica, dok određena istraživanja pobijaju te činjenice.

Ključne riječi: toksičnost, nanočestice, ioni srebra

Abstract

The toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) has been explored in many areas, most of which include their antibacterial properties. The influence on viruses and fungi has also been explored, especially the toxicity in certain concentrations. It's been proved that bigger particles are more toxic than smaller ones. Suspensions which contain greater amount of AgNPs or ions will be more toxic than those which contain smaller amount of those particles. The influence of cytotoxicity and genotoxicity of AgNPs has been explored and it has shown that greater concentrations of silver ions are more toxic. In general, AgNPs are very reactive and because of that, they are more toxic in greater amounts. Some researches agree about toxic effect of silver nanoparticles, while other disapprove those facts.

Key words: toxicity, nanoparticles, silver ions

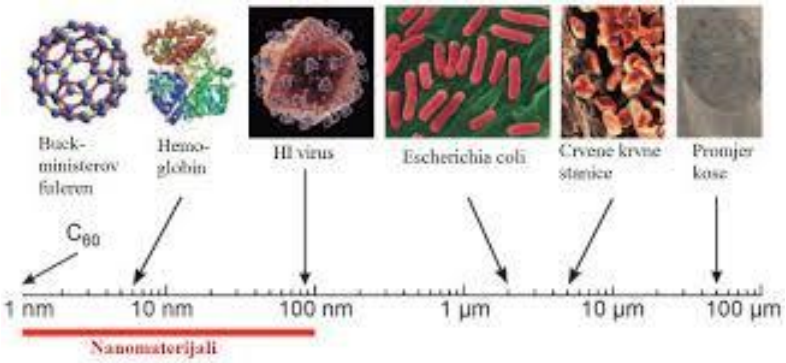
Sadržaj

1. Uvod 1
1.1. Nanočestice 1
1.2. Nanočestice srebra 2
1.3. Toksikologija srebrnih nanočestica 4
2. Citotoksičnost AgNP 5
2.1. Ovisnost citotoksičnosti AgNP suspenzija o koncentraciji srebrovih iona 6
2.2. Utjecaj razmjera srebrovih iona na toksičnost AgNP suspenzija 6
2.3. Utjecaj srebrovih iona i AgNP na proizvodnju ROS (reaktivnih metabolita kisika) 7
2.4. Utjecaj srebrovih iona i AgNP na ciklus stanice 7
2.5. Raspodjela $Ag^{(0)}$–montmorilonita u raznim organima 8
2.5.1. Moždana funkcija 9
3. Genotoksičnost 9
3.1. Utjecaj AgNP na fibroblaste i makrofage 9
3.2. Metabolička aktivnost (WST-1) u fibroblastima i makrofagima 10
3.3. Integritet staničnih membrana (LDH) u fibroblastima i makrofagima 10
4. Utjecaj srebra na bakterije, viruse i gljivice 11
4.1. Utjecaj srebra na *Escherichiu coli* 12
4.2. Utjecaj srebra na virus HIV-a 13
4.3. Utjecaj srebra na stanice karcinoma 14
5. Zaključak 16
6. Popis literature 17

1. Uvod

1.1. Nanočestice

Nanotehnologija je danas jedna od najbrže rastućih industrijskih područja. Nanomaterijali se definiraju kao prirodni ili proizvedeni materijali koji sadrže čestice u nevezanom stanju, agregatima ili aglomeratima od kojih 50% čestica ili više ima jednu ili više dimenzija u rasponu od 1 do 100 nm što se može vidjeti na slici 1. Zbog toga što su veoma male, posjeduju neka posebna fizikalna i kemijska (optička, mehanička, magnetska, električna) svojstva u usporedbi sa česticama normalne veličine neke supstance. No, zbog svih tih boljih svojstava, došlo se do zaključka kako one možda negativno djeluju na ljude i okoliš. Kako su reaktivnije od većih čestica, vjerovalo se da bi zbog te puno jače reaktivnosti mogle reagirati nepredvidljivo u biološkim sustavima. Naime, radila su se brojna istraživanja oko toksičnosti nanočestica i još uvijek nije istraženo do kraja jesu li i kako su nanočestice toksične. Znanstveni odbor za nove i novoutvrđene zdravstvene rizike (SCENIHR, eng. *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*) je nakon brojnih istraživanja zaključio kako nanočestica možda ima različito toksično djelovanje od normalne čestice, ali rizik nije jedinstven za sve čestice, razlikuje se od slučaja do slučaja [1]. Za nanočestice je karakteristična pojava površinske plazmonske rezonancije (SPR, eng. *surface plasmon resonance*) koja je posljedica kolektivnih oscilacija ili fluktuacija u elektronskoj gustoći s interaktivnim elektromagnetskim poljem. Takve oscilacije su jako osjetljive na adsorpciju molekula na metalne površine. Zbog svih tih svojstava metalne nanočestice danas imaju vrlo raširenu primjenu i upotrebu u mnogim gospodarskim područjima, što uključuje energiju, potrošačke proizvode, transport i agronomiju.



Slika 1. Prikaz veličine nanočestica u odnosu na druge veličine

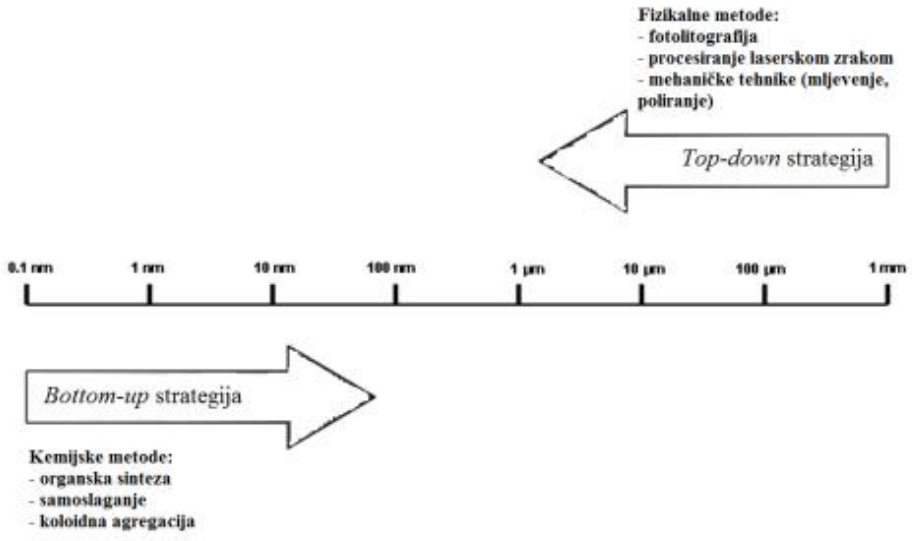
Upotreba i primjena nanomaterijala označena je REACH-om (eng. *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) koji označava „Registraciju, evaluaciju, autorizaciju i restrikciju kemikalija“, a odnosi se na proizvodnju i upotrebu kemijskih tvari te njihov potencijalni utjecaj na ljudsko zdravlje i okoliš. Pošto su nanočestice kemijski jednake svojoj makroformi, one imaju jednaki CAS broj (eng. *Chemical Abstract Service*), te se u industriji ne prepoznaju kao neka nova vrsta kemijskih tvari. Postoji još jedan sustav po kojem Europska unija klasificira nanomaterijale, a to je „Klasifikacija, označavanje i pakiranje“ (CLP, eng. *Classification, Labelling and Packaging*). Nanomaterijali su po oba sustava, REACH-u i CLP-u, definirani kao kemijske „supstance“. Nanomaterijali koji ispunjavaju kriterij za klasifikaciju kao opasni, po Regulaciji (EC) No 1272/2008 u CLP tvari i mješavina moraju se označiti kao takvi [2].

1.2. Nanočestice srebra

Primjena srebrnih nanomaterijala se vidi u SERS (od eng. *surface enhanced Raman scattering*) spektroskopiji, laserskoj desorpciji, kolorimetrijskom određivanju histidina i herbicida, detekciji DNA sljedova, ionizacijskoj masenoj spektrometriji peptida, identifikaciji bakterija te u mnogim drugim područjima. U industriji se koriste kao katalizatori, srebrne žice od nanomaterijala služe kao nanokonektori i nanoelektrode za elektroničke uređaje. Nanočestice srebra (AgNPs) dokazano imaju antibakterijska svojstva te se zbog tih svojstava primjenjuju u medicinskim proizvodima i u svakodnevnim proizvodima, kao na primjer u tekstilu s antibakterijskim svojstvima, krpama za čišćenje, šamponima, filterima za zrak, premazima na hladnjacima i perilicama za rublje, spremnicima za hranu itd. Osim antibakterijskih svojstava, posjeduju i određena toksična djelovanja. Mnoga toksična djelovanja AgNPs dokazana su u *in vitro* istraživanjima. Istraživanje toksičnosti AgNPs upućuje na to da veličina, oblik, kemijski sastav, topljivost, površinska aktivnost, sposobnost vezanja i biološki utjecaji, kao što su metabolizam i izlučivanje, utječu na toksičnost NPs [1].

Dvije su osnovne sintetske strategije prikazane na slici 2:

- top-down;
- bottom-up.

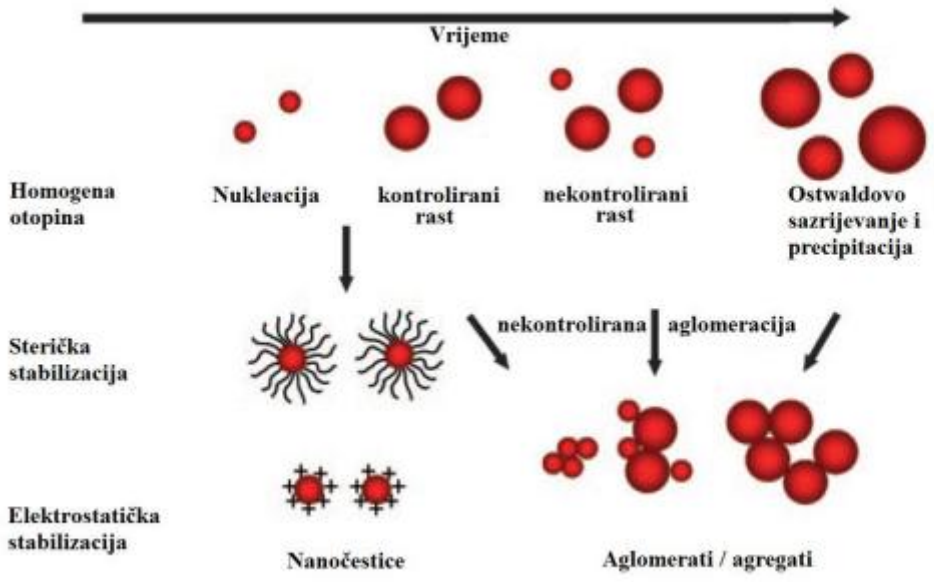


Slika 2. Top-down i bottom-up pristupi sintezi nanočestica

Top-down tehnika se temelji na stvaranju izoliranih atoma iz većih komada materijala koristeći razne tehnike distribucije. Obično se primjenjuju fizikalne metode poput mljevenja, rezanja, ponavljajućeg suzbijanja ili fotolitografije. Nedostatak ove tehnike je prisutnost površinskih nedostataka na nanostrukturama koje značajno utječu na njihova svojstva. Bottom-up tehnike započinju s otopljenim solima srebra koje se reduciraju pri čemu nastaju nanočestice procesom nukleacije i rasta. Konvencionalne metode u sintezi koriste citrat, borhidrid, dvofazne sustave, organske reducense ili inverzne micelarne sustave, dok se u nekonvencionalnim metodama koriste tehnike poput laserske ablacije, radiokatalize, vakuumskog isparavanja metala ili Svedbergova metoda elektrokondenzacije. Nedostaci bottom-up tehnike su nemogućnost masovne proizvodnje za industrijsku primjenu i akumulacija zaostalih kemikalija u suspenzijama nanočestica. Od tih nečistoća najčešće je ionsko srebro, jer učinkovitost redukcije nikad nije 100% [2].

Nastajanje nanočestica odvija se u tri faze: nukleacija, evolucija jezgri u klice i rast klica u nanokristale, što se vidi na slici 3. Klice se definiraju kao čestice veće od jezgara koje više nemaju fluktuacije strukture. Nukleacija predstavlja prvi korak u procesu kristalizacije. Polaganim porastom koncentracije atoma dolazi se do točke superzasićenja gdje se atomi počinju agregirati u male nakupine procesom samonukleacije. Tako formirane jezgre zatim ubrzano rastu i koncentracija metalnih atoma u otopini pada. Kontinuiranim dovođenjem atoma putem kemijske reakcije, jezgre će rasti u sve veće nanokristale dok se ne postigne ravnoteža između atoma na površini nanokristala i atoma u otopini. Također, čestice se mogu spajati u veće procesom aglomeracije što se vidi na slici 3. Kod dobivanja atoma

redukcijom iz viših oksidacijskih stanja, kao što je slučaj kod redukcije Ag^+, nije sigurno je li srebro prvo reducirano u metalno srebro koje se zatim agregira u jezgre i raste u nanokristale ili nereducirane specije tvore jezgre prije same redukcije. Jednom kada je nakupina čestica narasla do kritične veličine, strukturne fluktuacije postaju energetski nepovoljne i nakupina ostaje u dobro definiranoj strukturi. Ova kritična točka dovodi do nastanka klice [2].



Slika 3. Rast nanočestica

1.3. Toksikologija srebrnih nanočestica

Zbog posebnih fizičko–kemijskih svojstava nanočestice mogu biti veoma reaktivne i, osim povoljnih učinaka, izazvati i neke toksične. Stoga se razvila posebna grana toksikologije – nanotoksikologija – koja proučava interakcije nanostruktura s biološkim sustavima, s naglaskom na objašnjavanje veze između fizikalnih i kemijskih svojstava nanočestica i toksičnih učinaka [2]. AgNPs se koriste u borbi protiv HIV-1 virusa, te također za zacjeljivanje rana. Također, ionsko srebro pospješuje aktivnost stanica i pojačava djelovanje imunosnog sustava. Ionsko srebro ne izaziva alergije i nema kumulativni učinak, a danas se uobičajeno koristi u gazama, zavojima, kremama. Biološka toksičnost nanočestica može se pripisati nekim od slijedećih svojstava:

- kemijski sastav čestice povećava reaktivnost;

- topljivost, koja zbog interakcija s komponentama biološkog medija poput aminokiselina i proteina, može izazvati toksičnost;
- visoki omjer površine i volumena povećava interakcije s okolnim molekulama, što neizravno povećava toksičnost;
- hidrofobnost može omogućiti česticama da ulaze u interakcije s proteinima i staničnim membranama;
- komplementarnost nanostruktura može prouzročiti inhibiciju enzimske aktivnosti, kompetitivno ili nekompetitivno;
- površinski naboj koji sudjeluje u elektrostatskim interakcijama, a koji je karakteriziran potencijalom, važan je faktor kod stvaranja agregata te, u interakciji nanočestica i stanica, utječe na količinu adsorbiranih proteina na površini čestice;
- mogućnost adsorpcije biomolekula dovodi do učinka „Trojanskog konja" – unos stranih čestica, koje na sebe imaju adsorbiranu biomolekulu, u stanicu;
- akumulacija inertne čestice u tijelu može pokrenuti stvaranje tkiva oko stranog tijela i dovesti do nastanka ožiljka [2].

2. Citotoksičnost AgNP

Radila su se istraživanja kako na citotoksičnost utječu nanočestice srebra, a kako ioni srebra. Nanočestice prodiru i u stanice sisavaca i oštećuju genotip. Postoji dokaz da AgNPs mogu aktivno pronaći put u stanice putem endocitoze. Do povećanja toksičnosti dolazi zbog oksidacije vodikovog peroksida koji se formira pri staničnom disanju te dolazi do oslobađanja iona srebra, što povećava toksičnost. Također je pokazano da AgNPs probijaju kožu preko pora i žlijezda. Pošto se u nekim premazima koriste AgNPs, trebala bi se obratiti pažnja na njihovo otpuštanje. Prema finskim istraživačima, prevlake bi se trebale temeljiti na srebrnim ionima koji se otapaju iz njih. Prema tome, nanočestice bi trebale biti vezane na premaz što je više moguće, te tako smanjiti redukciju u mogućoj izloženosti AgNPs [3].

Mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, ali prema nekim istraživanjima moguća su i citotoksična i genotoksična djelovanja. Radila su se tri istraživanja *in vivo* na štakorima, kojima se dokazala određena genotoksičnost AgNPs. U prvom istraživanju se dala intravenozna injekcija (40 mg kg^{-1}) koja je uzrokovala povećana oštećenja jednostruke i dvostruke DNA molekule u štakorima. U drugom istraživanju zebrica je tretirana oralnim AgNPs (5 nm na 20 nm) – rezultat je bio povećana koncentracija γ-H2AX markera za

dvostruku DNA koja je prekinuta. Izlaganjem AgNPs rezultiralo je beznačajnim dozama koje su povećale p-33 mRNA u jetri, koja je prekursor za supresor proteina tumora i indirektno oštećenje DNA markera. Prema zadnjem, trećem istraživanju došlo je do laganog oštećenja jetre, ali ono nije pokazalo znakove za povećanje genotoksičnosti. Štakori su bili izloženi duljem periodu izlaganja i oralno tretirani sa različitim koncentracijama (maksimalno 1000 mg kg^{-1}) 60 nm AgNPs [4].

2.1. Ovisnost citotoksičnosti AgNP suspenzija o koncentraciji srebrovih iona

Nekoliko studija je pokazalo da su AgNP suspenzije toksične. Ipak, nije bilo sistematskih studija, čije analize pokazuju do koje mjere varijabilne količine srebrovih iona u AgNP suspenzijama doprinose toksičnosti. U jednom od istraživanja, A549 stanice su se tretirale tijekom 24 h s dvije različite serije AgNP suspenzija koje su sadržavale 39% (serija 2) i 69% (serija 3) srebrovih iona. Prema očekivanjima, AgNP suspenzija s nižim udjelom srebrovih iona (39%, serija 2) je bila manje toksična od one s višim udjelom srebrovih iona (69%, serija 3). Za usporedbu, životni vijek stanica izloženih laboratorijski sintetiziranim AgNP suspenzijama s puno nižim udjelom srebrovih iona (2.6%, serija 4) se smanjio samo na mnogo višim ukupnim koncentracijama srebra. Može se pretpostaviti da toksičnost AgNP suspenzija ovisi o početnom sadržaju srebrovih iona [1].

2.2. Utjecaj razmjera srebrovih iona na toksičnost AgNP suspenzija

Kako bi se dodatno istražilo koliko srebrovi ioni utječu na cjelokupnu toksičnost AgNP suspenzija, u istom istraživanju, većina AgNP je peletirana ultracentrifugiranjem, a supernatant je iskorišten za proučavanje životnog vijeka. A549 stanice su inkubirane tijekom 24 h jednakim volumenima AgNP supernatanta ili AgNP suspenzije te jednakom količinom srebrovih iona. Udio srebrovih iona ispitanih AgNP suspenzija je bio između 39 i 71%. Da bi se isključila mogućnost da PVP (polivinil pirolidon) u AgNP suspenzijama dovodi do toksičnosti supernatanta, istražila se toksičnost PVP-a. Ipak, nije pronađena nikakva značajna toksičnost PVP-a do 0.5% PVP-a, što odgovara udjelu od 50% PVP-a u praškastom AgNP. Kada su se koristile laboratorijski sintetizirane AgNP suspenzije s početnim udjelom srebrovih iona između 1 i 2.6%, AgNP suspenzija je bila mnogo više toksična od odgovarajućeg supernatanta [1].

2.3. Utjecaj srebrovih iona i AgNP na proizvodnju ROS (reaktivnih metabolita kisika)

AgNP i srebrovi ioni potiču proizvodnju reaktivnih metabolita kisika u A549 stanicama. Da bi se istražilo do koje mjere AgNP i srebrovi ioni potiču njihovu proizvodnju, A549 stanice su se tretirale tijekom 24 h AgNP suspenzijom ili AgNP supernatantom. AgNP supernatant potiče proizvodnju 2.6 i 6 puta više reaktivnih metabolita kisika, nego AgNP suspenzija, što sugerira da do proizvodnje reaktivnih metabolita kisika uglavnom dolazi zbog prisutnosti srebrovih iona [1].

2.4. Utjecaj srebrovih iona i AgNP na ciklus stanice

A549 stanice su bile inkubirane istim volumenima AgNP suspenzija ili AgNP supernatanata. Nakon 24 h inkubacije, stanice su tripsinizirane, njihov DNA je obojan i analiziran pomoću citometrije toka. Nije bilo značajne razlike u broju stanica u G2/M fazi staničnog ciklusa kada su AgNP suspenzijski i supernatantni tretmani uspoređeni s kontrolnim uzorkom. Podaci govore da nema razlike u staničnom ciklusu stanica tretiranih AgNP suspenzijom ili AgNP supernatantom [1]. Za srebrove ione se zna da su toksični za mnoge vrste, pa tako i za čovjeka. U mnogim istraživanjima $AgNO_3$ se koristio za usporedbu toksičnosti srebrovih iona i AgNP. Međutim, analizirane količine srebrovih iona u AgNP suspenzijama su prikazane u samo nekim istraživanjima, dok većina istraživanja nije objasnila kako srebrovi ioni pridonose toksičnosti AgNP suspenzija. U pripravljenim AgNP suspenzijama iz komercijalnih praškastih AgNP, udio srebrovih iona je bio između 39 i 71%. Izgleda da je visoka koncentracija srebrovih iona posljedica pripravljanja, gdje su se centrifugiranjem i filtracijom veći AgNP agregati odstranili, dok su nanočestice i njihovi agregati promjera manjih od 450 nm te srebrovi ioni ostali u suspenziji. Ovo vodi ka proporcionalnom povećanju srebrovih iona u usporedbi s preostalim AgNP u suspenziji. Pri nižim udjelima srebrovih iona (2.6% i manje) toksičnost AgNP suspenzija je bila značajno viša, nego u supernatantu, što bi moglo sugerirati na prisutnost drugih faktora, osim srebrovih iona. Neprimjetan učinak AgNP suspenzija i njihovih supernatanata na životni vijek stanica pri višim koncentracijama srebrovih iona očituje se u staničnom ciklusu, iako je neznatna promjena u ciklusu stanica tretiranima AgNP i AgNP supernatantima neočekivana, pošto je na te stanice ovaj tretman očito utjecao, što se vidi iz MTT testova i mikroskopskih promatranja. Nije bilo značajne razlike u omjeru apoptotskih ili nekrotskih stanica bez obzira na tretman AgNP suspenzijama ili AgNP supernatantima.

Bilo je, međutim, laganog povećanja u ranim apoptotskim stanicama koje je jednako kao i za stanice tretirane AgNP suspenzijma ili AgNP supernatantima. Srebrovi ioni i/ili AgNP potiču proizvodnju reaktivnih metabolita kisika u A549 stanicama. Prema tome, ako se upotrijebi ista masa srebra, vjerojatnija će biti veća proizvodnja stanica reaktivnih metabolita kisika tretiranim AgNP supernatantom zbog većih količina srebrovih iona kojima su izložene ove stanice [1].

2.5. Raspodjela $Ag^{(0)}$–montmorilonita u raznim organima

Montmorilonit (poznat kao „zelena glina“) je monoklinski mineral, glavni sastojak bentonitnih glina, raširenih u tlima te sedimentnim i metamorfnim stijenama.

AgNPs su dobivene različitim postupcima iz montmorilonita. Dvije različite koncentracije (5 i 20 mg) srebrnih nanočestica u obliku $Ag^{(0)}$–montmorilonita su injektirane intraperitonealno u miševe i, nakon 4 dana, tkiva životinja su izrezana. $Ag^{(0)}$–montmorilonit je otkriven u mozgu, jetrima, plućima, bubrezima, slezeni i srcu. AgNPs su se rasporedile u svim organima, uključujući jetru i slezenu koje sadrže fagocite. U bubrezima su nanočestice srebra pronađene čak i 4 dana nakon ubrizgavanja, dok nijedna čestica nije pronađena u urinu, što pokazuje odsutnost izlučivanja putem bubrega. Pronađene su u bubrezima zbog odsutnosti izlučivanja putem bubrega glomerularnom filtracijom, pošto su nanočestice bile veličine 20 nm. Općenito, udaljenost staničnih membrana je između 6 i 10 nm i makromolekularni agensi s molekulskim promjerom manjim od 8 nm prolaze krvlju glomerularnom filtracijom i tubularnim izlučivanjem putem bubrega, iako elektrostatski naboj čestica također ima ulogu u njihovoj mogućnosti prolaska kroz glomerularne membrane. Prisutnost nanočestica u mozgu je pokazala prolazak nanosrebrnih materijala kroz krvnu barijeru mozga bez ispoljavanja vidljive toksičnosti, ali i poboljšanje funkcije mozga povećanjem aktivnosti glutamin-sintaze, što je važno za neurotransmisiju i ostale aktivnosti. AgNPs su promatrane i u ostalim tkivima, osobito u plućima, gdje je zasićenje bilo 5 mg. Povećano vrijeme poluživota AgNPs u krvi je pokazalo da se vrijeme poluživota veoma malih čestica u krvi povećalo [5].

U slučaju $Ag^{(0)}$–montmorilonita, modulatorni učinak srebra u citokinima bi mogao biti razlog slabog ili nikakvog imunog odgovora. Istraživanja moguće upotrebe montmorilonita kao nosača lijekova su pokazala da su sistemi kod AgNPs potencijalna alternativa za uobičajenu kemoterapiju za bilo koje organe, a osobito za mozak i pluća [5].

2.5.1. Moždana funkcija

Nanočestice su otkrivene u mozgu UV-VIS analizama. Za procjenu potencijalnih učinaka $Ag^{(0)}$–montmorilonita na neuropsihologiju mozga, testirana je razina glutamin-sintaze. Otkrivena je prosječno dva puta veća aktivnost glutamin-sintaze. Upotrijebljena je X-slika cijelog tijela za otkrivanje metastaza nanočestica srebra. Upadljivo povećanje srebra promatralo se u svim tkivima, osobito u plućima i mozgu, u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Kako je pokazala koncentracija srebra pronađena u krvi 4 dana nakon ubrizgavanja, AgNPs su imale duže vrijeme poluživota [5].

3. Genotoksičnost

AgNPs veličine 20 nm nisu inducirale povećanje učestalosti genske mutacije, a iznad tih koncentracija su bile previše toksične da bi se sakupilo dovoljno DNA iz plazme. Promatralo se povećanje učestalosti genske mutacije u stanicama tretiranim AgNPs veličine 113 nm u usporedbi sa kontrolnim uzorkom, no to povećanje nije bilo niti povezano doziranjem niti je bilo statistički značajno. Povećanje učestalosti genske mutacije povezano doziranjem je promatrano u stanicama tretiranim s AgNPs veličine 80 nm, ali također nije bilo statistički značajno. Koncentracije, koje su uzrokovale povećanje učestalosti genske mutacije su bile citotoksične [6].

3.1. Utjecaj AgNP na fibroblaste i makrofage

U istraživanju koje je provedeno [3], usporedili su se učinci AgNPs različitih veličina na staničnu metaboličku aktivnost, integritet membrana, razvoj toksičnosti i genotoksičnosti. Od svih nabrojanih, najveći učinak je bio na L929 fibroblaste, gdje su AgNPs svih veličina ugrozile integritet stanične membrane i, pri višim koncentracijama, metaboličku aktivnost. Obrnuti učinak je bio u RAW 264.7 makrofaga, gdje se učinak na metaboličku aktivnost odvijao pri nižim koncentracijama od onih na aktivnost stanične membrane. Učinci u makrofaga su zamijećeni na višim koncentracijama u usporedbi sa fibroblastima i može se pretpostaviti da su membrane makrofaga otpornije na AgNPs. Na temelju masenih koncentracija, u usporedbi s većim nanočesticaama, AgNPs veličine 20 nm su uzrokovale jači odgovor na sve testove uključene u ovo istraživanje. Manje nanočestice mogu otpustiti više srebrovih iona sa svoje površine, nego veće. Ipak, ostaje nejasno do koje mjere srebrovi ioni doprinose učinku promatranih AgNPs. U jednom od istraživanja, L929 fibroblasti su bili osjetljiviji na učinak nanočestica veličine 20 nm. Peritonealni makrofagi

su bili prosječno jednako osjetljivi na učinke srebrovih iona i nanočestice srebra veličine 20 nm, dok su velike čestice bile manje toksične od srebrovih iona. Izgleda da učinci nanočestica srebra u usporedbi s učincima srebrovih iona ovise o tipu stanice, ali i o veličini nanočestice [6].

3.2. Metabolička aktivnost (WST-1) u fibroblastima i makrofagima

I u L929 fibroblastima i u RAW 264.7 makrofagima, metabolička aktivnost se smanjila u ovisnosti o koncentraciji AgNPs i srebrovih iona, što je mjereno smanjivanjem WST-1. Za srebrove ione, smanjenje metaboličke aktivnosti je bilo slično između ovih tipova stanica i njihove granice vjerodostojnosti su se preklapale, navodeći na pomisao da nije bilo statistički značajne razlike između dva tipa stanica. Suprotno tome, metabolička aktivnost za AgNPs u L929 fibroblastima je bila drugačija od RAW 264.7 makrofaga. U oba tipa stanica, najmanje AgNPs veličine 20 nm, su imale veći utjecaj na smanjivanje metaboličke aktivnosti. Za RAW 264.7 makrofage, EC_{20} vrijednost je bila slična onoj za srebrove ione. Nasuprot tome, u L929 fibroblastima, na metaboličku aktivnost su više utjecale AgNPs veličine 20 nm nego srebrovi ioni. U oba tipa stanica, veće nanočestice (80 i 113 nm) nisu imale veći učinak u smanjivanju metaboličke aktivnosti, u usporedbi sa srebrovim ionima [6].

3.3. Integritet staničnih membrana (LDH) u fibroblastima i makrofagima

Mjerenje aktivnosti izvanstaničnog LDH, pokazalo je da je integritet staničnih membrana u L929 fibroblastima ugrožen svima trima nanočesticama srebra, najviše onima veličine 20 nm (u odnosu na one veličine 80 i 113 nm). Suprotno tome, na integritet staničnih membrana RAW 264.7 makrofaga su utjecale samo ograničeno AgNPs veličine 20 nm, dok one veće ne. Iako je bilo velikih razlika između učinaka tipova stanica za nanočestice srebra, srebrovi ioni su utjecali i na integritet staničnih membrana RAW 264.7 i na onaj L929, u istom opsegu. AgNPs veličine 20 nm su imale veći utjecaj na smanjivanje integriteta staničnih membrana L929 fibroblasta, nego srebrovi ioni. U RAW 264.7 makrofagima, srebrovi ioni su imali veći utjecaj na integritet staničnih membrana, nego bilo koja druga nanočestica [6].

Još jedna uznemiravajuća činjenica u genotoksičnom istraživanju je da na toksičnost utječe i različito vrijeme izlaganja. Kratko izlaganje AgNPs od dan ili dva uzrokuje oštećenje DNA. Dužim izlaganjem oko 28 dana, pokazalo se na štakorima da AgNPs nisu

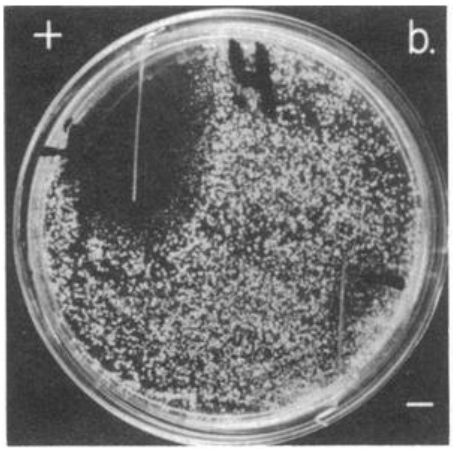
genotoksične. No, također ovisi o metodi koja se primjenjivala, jer nakon dužeg izlaganja tijekom nekih istraživanja otkriveno je ireverzibilno oštećenje kromosoma [4].

4. Utjecaj srebra na bakterije, viruse i gljivice

Srebro mikro veličine prodire u stanice i uništava bakterije, viruse i gljivice tako što inhibira enzime koji su im potrebni za metabolizam kisika, što rezultira njihovim potpunim iskorjenjivanjem. AgNPs služe u borbi protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, gljivica i virusa.

Baktericidno i bakteriostatsko djelovanje elektrolitičkog ionskog srebra istraženo je na 16 vrsta bakterija. Pripremljene bakterijske kulture tretirane su različitim dozama srebra da bi se ustanovile minimalne koncentracije potrebne za ograničenje rasta (MIC) i za njihovo uništenje (MBC). MIC je za svih 16 vrsta bakterija bila 1.25 ppm ili manja, dok je MBC bila 10.05 ppm ili manja. To pokazuje 10 do 100 puta veću učinkovitost elektrolitičkog ionskog srebra. Istim koncentracijama su istovremeno tretirane i osjetljive stanice mišje koštane srži, s ciljem da se ustanovi eventualna toksičnost srebra. Nisu uočene značajne razlike između tretiranih stanica i kontrolnih uzoraka koji nisu bili u kontaktu sa srebrom [7].

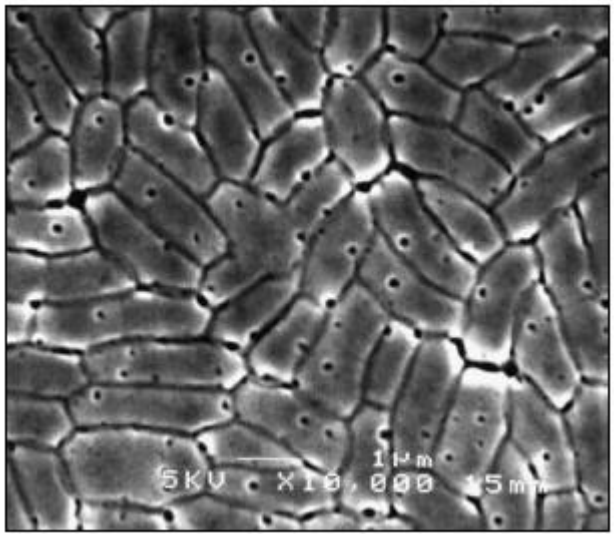
Fungicidno djelovanje je istraženo na dva soja gljivica: *Candida albicans* i *Candida krusei*. Korištenjem elektroda od različitih kovina (srebro, bakar, cink i titan) još se jednom pokazalo da je djelotvornost vezana baš za ione srebra, što se vidi na slici 4. Minimalne koncentracije potrebne za zaustavljanje rasta bile su niske: između 0.5 i 4.7 ppm. Minimalne koncentracije za uništenje gljivica bile su između 1.9 i 13.8 ppm [7].



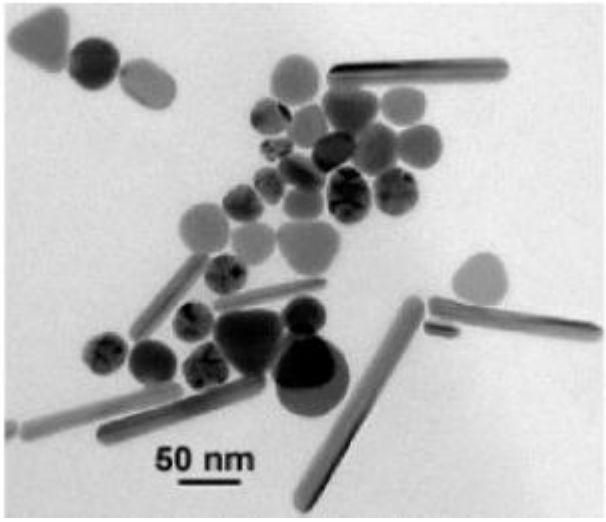
Slika 4. *Candida* u području gdje su prisutni ioni srebra (Ag^+) koji su izlučeni s pozitivne elektrode

4.1. Utjecaj srebra na *Escherichiu coli*

Bakterija *Escherichia coli* je uzeta kao tipičan predstavnik gram-negativnih bakterija. Ako se bakterije izlože različitim koncentracijama srebrnih čestica, dolazi do oštećenja staničnih stijenki bakterija (Slika 5) na kojima su se formirali otvori, a AgNPs su se akumulirale na stijenkama. Membrane u takvom stanju imaju značajno povećanu propusnost, pa je rezultat toga ugibanje bakterije. Prema tome, može se zaključiti da bi se AgNPs, kao netoksičan materijal, mogle koristiti za izradu novih tipova baktericidnih sredstava. Također se ustanovilo da najbolje djelovanje pokazuju čestice sferičnog i krnjeg piramidalnog oblika, što se može vidjeti na slici 6, dok su najmanje aktivne čestice štapičastog oblika. Ono što je bitno jest činjenica da čestice srebra djeluju na isti način kao ioni srebra – ometaju respiratorni sustav mikroorganizama, čime ometaju njihov razvoj, a u većim koncentracijama ih i ubijaju. Za zaključiti je da se u stvari iz površine čestica izlučuju ioni srebra i djeluju na opisani način [7].



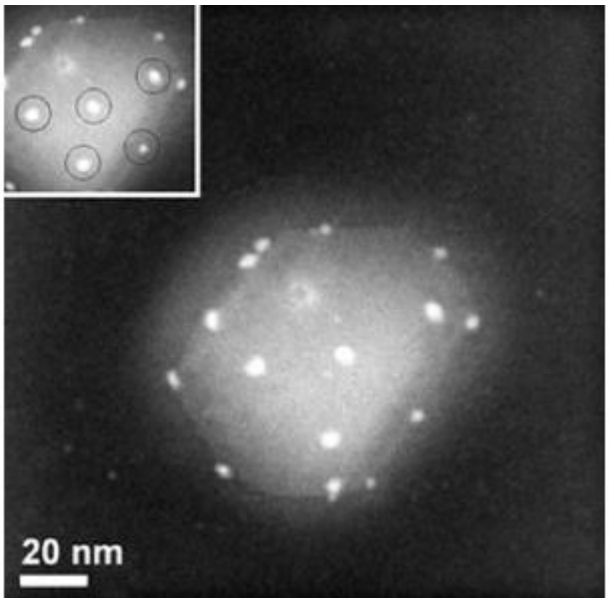
Slika 5. *Escherichia Coli*: oštećenja na staničnim membranama zbog 4-satnog djelovanja srebrnih nanočestica



Slika 6. Nanočestice srebra različitih oblika

4.2. Utjecaj srebra na virus HIV-a

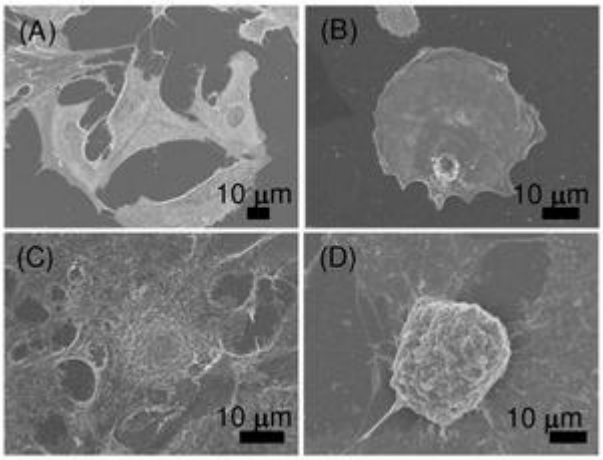
Pri istraživanju srebrnih čestica prilično je slabo istraženo djelovanje na viruse. Naime, samo čestice u rasponu 1–10 nm imaju svojstvo vezanja na virus. U jednom istraživanju su korištene otopine sa 3 vrste nanočestica: jedna je sadržavala srebrne čestice čija je površina bila uglavnom potpuno čista, dok su druge dvije sadržavale čestice prekrivene slojem materijala za stabilizaciju otopine. Najbolju aktivnost su pokazale čestice iz prve otopine. Potpuno blokiranje virusa postignuto je već pri koncetraciji od 6-7 ppm, dok su druge dvije isti učinak dostizale pri koncentraciji od 25 ppm. Prema položaju srebrnih čestica na površini virusa zaključuje se da se čestice vežu na glikoproteinske čvoriće (gp120) na površini virusa, koji inače služe virusu da se veže na stanicu koju će zaraziti. Rezultat toga je nemogućnost virusa da se prihvati za stanicu, pa je time onemogućena zaraza i razmnožavanje što se vidi na slici 7 [7].



Slika 7. Virus HIV-a pod skenirajućim elektronskim mikroskopom. Svjetle točke su čestice srebra

4.3. Utjecaj srebra na stanice karcinoma

Kao i u većini drugih istraživanja znanstvenici pripremaju srebrne nanočestice "svojom" metodom, za koju vjeruju da bi mogla biti dovoljno jednostavna i jeftina za industrijsku primjenu. Koristeći "zelenu" metodu (redukciju srebrnog nitrata geraniolom ekstrahiranim iz biljaka), dobivena je otopina sa česticama u rasponu 1-10 nm, prosječno 6 nm. Pripremile su se otopine raznih koncentracija i njima tretirale stanice karcinoma tipa Fibrosarcoma-Wehi 164. Analize toksičnosti srebrnih čestica prema tim stanicama pokazuju da ona direktno zavisi od koncentracije. Koncentracija od 5 μg/mL (5 ppm) bila je dovoljna da se rast umanji za više od 60%. Međutim, pri 1 μg/mL (1 ppm) srebrne su čestice bile sposobne umanjiti rast za manje od 30%, što se vidi na slici 8. Koncentracija potrebna da se usmrti 50% stanica karcinoma bila je 2.6 μg/mL (2.6 ppm) [7].



Slika 8. Fibroblasti i stanice karcinoma prije (A i C) i nakon tretmana nanočesticama srebra (B i D)

5. Zaključak

Srebrne nanočestice mogu veoma povoljno djelovati na ljudski organizam, te se koriste u brojnim kozmetičkim preparatima koji se primjenjuju na koži, ali i oralno. Osim što imaju mnogo povoljnih učinaka, zbog toga što su veoma reaktivne, mogu djelovati i toksično. Njihova toksičnost nije ista za sve veličine čestica. Također se pokazalo kako ioni srebra u suspenzijama u kojima je njihova koncentracija veća, djeluju više toksično, za razliku od onih u kojima ih je manje. Ioni srebra su se pokazali jače toksičnim, ako je i njihova koncentracija bila veća. Toksičnost srebrnih nanočestica se najbolje vidi u njihovom djelovanju na neke vrste bakterija, gljivica i virusa. Uništavaju stanične stijenke bakterija, blokiraju viruse, a najbolji učinak koji se zasigurno istražuje je nepovoljno djelovanje na stanice karcinoma. Upravo po tome, utjecaju na stanice karcinoma, srebrne nanočestice su veoma zanimljive znanstvenicima, te se njihov utjecaj puno istražuje. Može se zaključiti kako su općenito nanočestice i nanotehnologija nešto što nije više samo budućnost, već sadašnjost te će se u budućnosti samo još više primjenjivati.

6. Popis literature

1. Beera C., Foldbjerga R., Hayashib Y., Sutherlandb D. S., Autrupa H., Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion?, Toxicology Letters 208 (2012) 286 – 292.
2. http://www.unizg.hr/rektorova/upload/rektorovaTeaCrnkovi%C4%872015.pdf (26.09.2015.)
3. http://znanost.geek.hr/clanak/toksicnost-antimikrobnog-srebra-u-proizvodima-moze-se-smanjiti/ (25.09.2015.)
4. Klien K., Godnić-Cvar J., Genotoxicity of metal nanoparticles: Focus on *in vivo* studies, Arh Hig Rada Toksikol (2012) 63: 133 – 145.
5. Kiruba D. S. C. G., Tharmaraj V., Sironmani T. A., Pitchumani K., Toxicity and immunological activity of silver nanoparticles, Applied Clay Science 48 (2010) 547 – 551.
6. Parka V. D. Z. M., Neighc A. M., Vermeulenb J. P., J. J. de la Fonteyneb L., Verharenb H. V., Briedéa J. J., Henk van Loverena, H. de Jongb W., The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles, Biomaterials 32 (2011) 9810 – 9817.
7. http://www.omnis-mg.hr/IsZnanje.htm (26.09.2015.)