

Působení nanomateriálů na imunitní systém

Mgr. Monika Dušková, Ph.D.

Co jsou nanomateriály, nanotechnologie ?

- Pracují s částicemi v měřítku nanometrů cca 1–100 nm, 10^{-9} m
- Koloidní částice: 1 – 1 000 nm,
1 – 500 nm



Využití: medicína (tkáňové inženýrství), textilní průmysl, čištění odpadních vod, výroba akumulátorů

Rizika: jsou biologicky aktivnější než větší částice, mají větší měrný povrch a schopnost dlouhodobě přetrvávat v životním prostředí a hromadit se tam. Účinky jsou studovány na celé řadě modelových organismů, ale interakce s buňkami, zejména s imunocyty, jsou zatím málo popsány.

Často využívanými prvky v medicínských nanotechnologiích jsou **stříbro, zlato, titan**.

Stříbro:

v přírodě se nachází hlavně v sulfidických rudách = argentit Ag_2S
(leštěnec stříbrný)

získává se jako vedlejší produkt při výrobě jiných kovů (mědi)

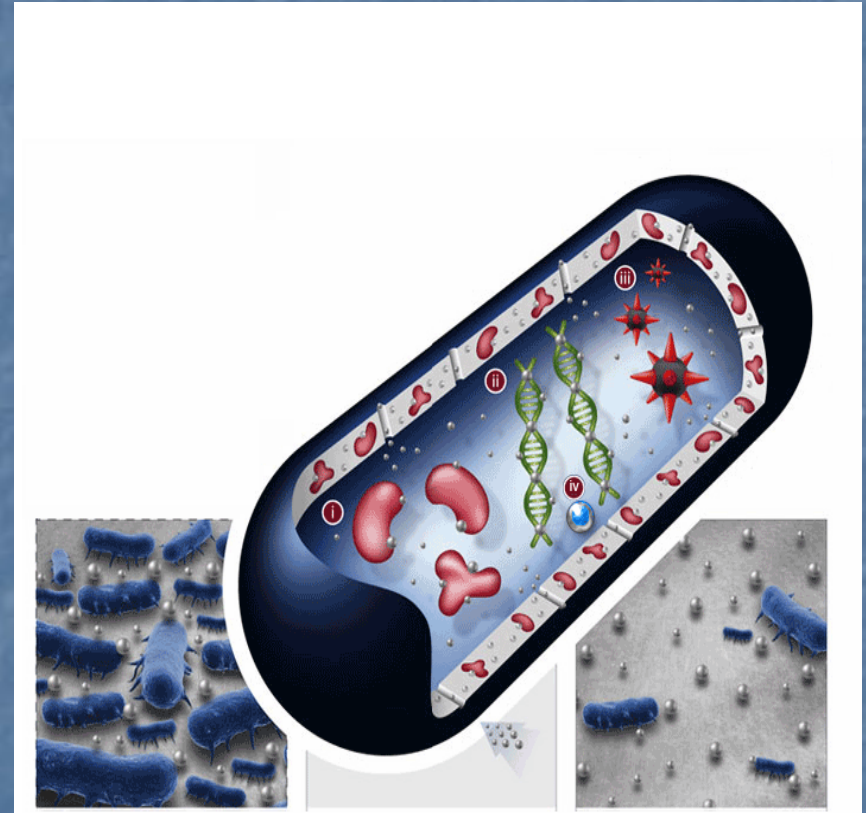
měkký, snadno kujný a tažný kov

velká afinita k síře (černání stříbrných předmětů)



V medicíně jsou důležité zejména **mikrobicidní vlastnosti nanostříbra**

- strukturální změny v bakteriálních buněčných stěnách
- inhibuje respirační proces
- denaturace proteinů
- inhibice replikace



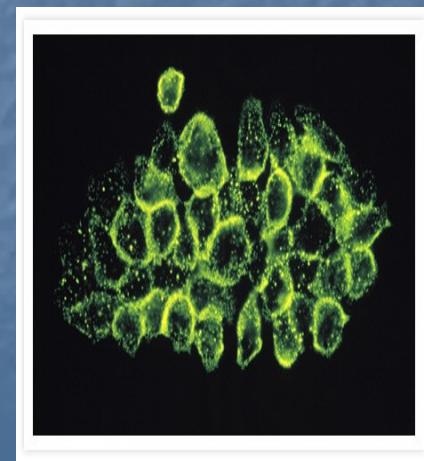
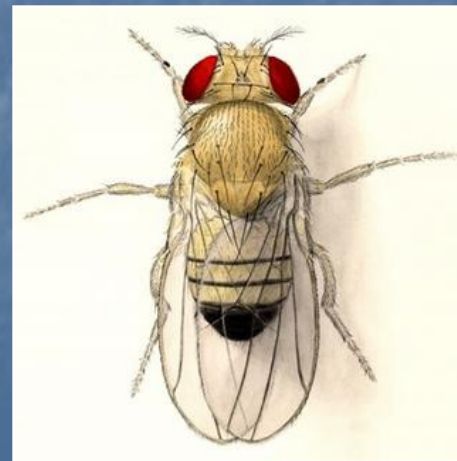
(<http://www.silversol.us/wp-content/uploads/2009/10/silver-bacteria.gif>)

Působení na eukaryotické buňky

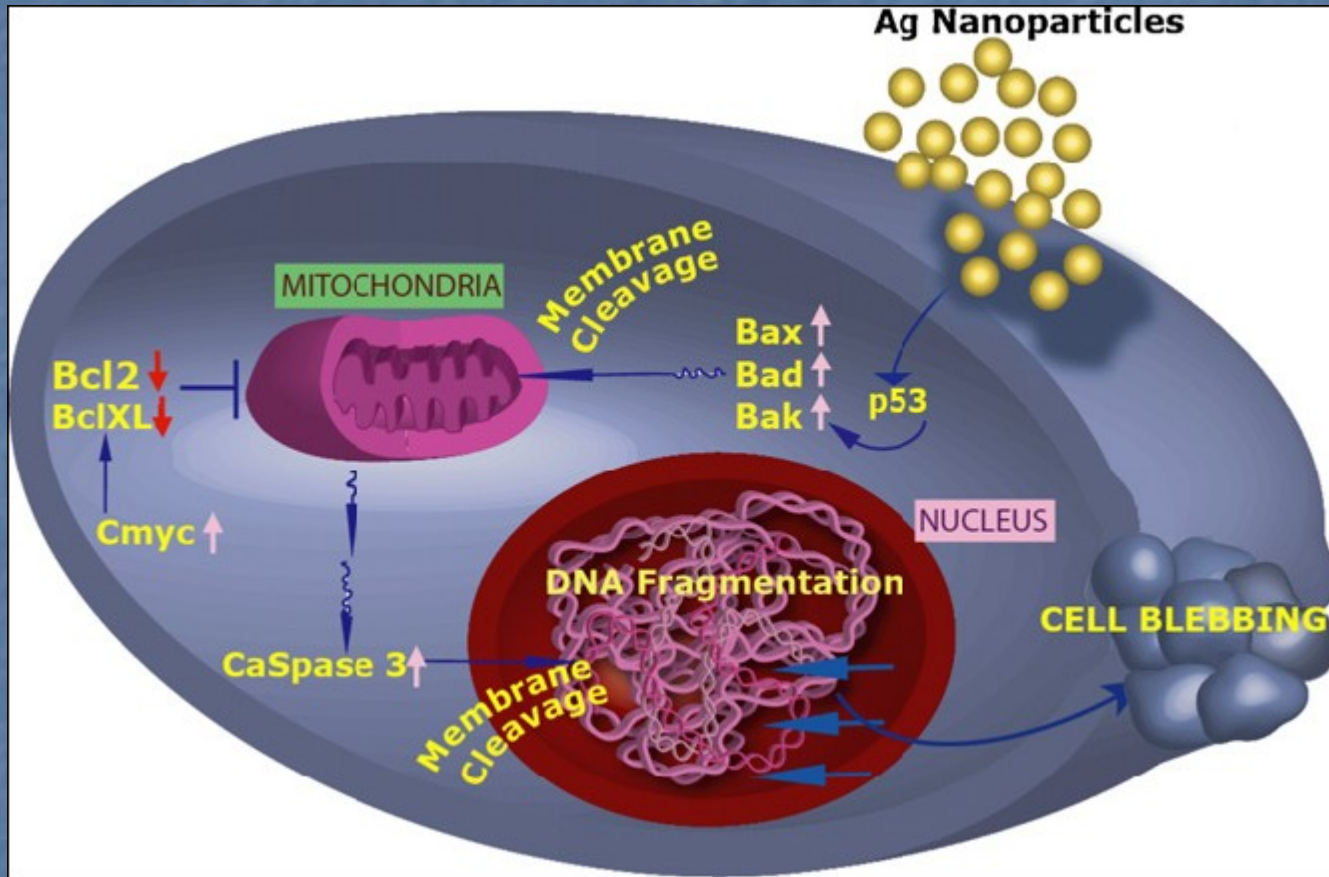
- ukládání v buňkách
- změna morfologie buněk
- změna exprese genů – Hsp70, p53, p38
- respirační stres
- oxidační stres
- apoptóza

Pozitivně: pokles tvorby prozánětlivých cytokinů

Negativně: podpora tvorby reaktivních kyslíkových metabolitů



Apoptóza



Současný stav problematiky koloidního stříbra:

- Vytvořena metodika a prozkoumán vliv na vybrané druhy bakterií
Bc. Kamila Krejčí
- Vytvořena metodika a prozkoumán vliv na fagocyty v plné krvi
Bc. Lenka Kavanová
- Optimalizuje se metodika pro sledování vlivu stříbra na další mechanismy nespecifické imunity (lyzozym, komplement)
- Bc. Lenka Kavanová
- Do budoucna: sledování vlivu na nespecifickou imunitu bezobratlých

Sledování vlivu nanočástic stříbra na viabilitu bakterií a funkci fagocytů



¹Žáková A., ¹Duřková M., ¹Kavanová L., ¹Krejčí K., ¹Hubinka V.,
²A. Panáček

¹Oddělení fyziologie a imunologie živočichů, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Kottlářská 2, 61137 Brno, Česká republika

²Oddělení fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Svobody 26, 77515 Olomouc, Česká republika

Úvod

Mikrobicidní vlastnosti stříbra jsou známy již od starověku. Většího využití dosáhl tento kov v období před rozšířením antibiotik. V současné době dochází ke zvýšení zájmu o stříbro z důvodů zvyšující se rezistence mikroorganismů k antibiotikům, dále se stříbro využívá pro úpravu vody, desinfekci povrchů apod. Zajímavé možnosti nabízí použití stříbra v tzv. nanotechnologiích, kdy lze využít unikátní chemické, fyzikální i biologické vlastnosti částic. Nanočástice dosahují velikosti do 100nm a v případě stříbra obsahují 20 – 15 000 atomů tohoto kovu.

V literatuře se objevuje řada dokladů o baktericidních vlastnostech nanočástic stříbra, objevují se však také údaje o jejich inhibičním až toxickém působení na různé eukaryotické buňky, včetně buněk imunitního systému.

Cíl práce:

V práci byl sledován vliv vybraných koncentrací koloidního stříbra a) na viabilitu bakterií a dále b) na funkci fagocytů in vitro pomocí luminiscenční metody. Cílem bylo ověřit, zda koncentrace, které vykazují baktericidní efekt, nepůsobí zároveň inhibičně na oxidativní vzplanutí fagocytů.

Metody

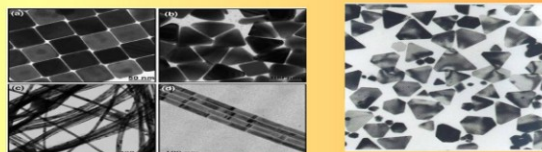
Bioluminiscenční stanovení viability bakterií (vyvinuto na Department of biochemistry and Food Chemistry, University of Turku, Finsko) je založeno na měření světelné emise, která je výsledkem reakce:

ATP + D-luciferin + O₂ + ADP + PPI + oxyluciferin + H₂O

Luciferase i D-luciferin je produkován použitým nepatogenním G- bakterijním kmenem. Reakce je závislá na přítomnosti luciferázy a vyžaduje přítomnost ATP. ATP je produkováno pouze živými buňkami, což umožňuje využít této reakce pro stanovení viability bakterií. Čím větší je účinek Ag, tím víc bakterií žije a tudíž je nižší bioluminiscence.

Chemiluminiscenční (CL) stanovení oxidativního vzplanutí fagocytů, kde velikost CL signálu je přímo úměrná produkci reaktivních kyslíkových metabolitů. Vzorky pro chemiluminiscenční stanovení obsahovaly luminol (1 mM), zymosanové částice 2 mg/ml (v případě spontánní CL Hanks pufr), plnou krev 8 μl/ml. Fyzikálně připravené Ag⁺ bez kaseinu bylo ke vzorkům přidáváno v okamžiku začátku měření, v koncentračním rozmezí 50 – 0,014 mg/l ředěno fosfátovým pufrům. Na celkový objem 250 μl byly vzorky doplněny Hanks pufrům. Měření byla prováděna na mikrotržnicí desce po dobu jedné hodiny.

Vyhodnocovacím parametrem byl integrál CL křivky, který odráží celkovou produkci RKM po dobu měření. Statistické hodnocení bylo provedeno T- testem.

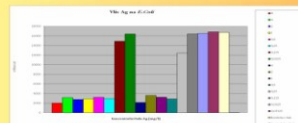


Nanočástice stříbra z (transmisního el. mikroskopu různých tvarů (Sharma *et al.*, 2009).

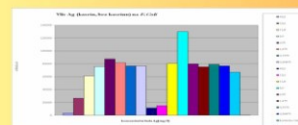
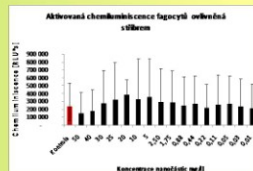
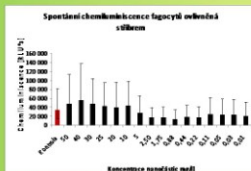
Nanočástice stříbra (Prnka a Šperlík, 2009).

Detekce baktericidního působení:

Chemiluminiscenční metodou byl sledován inhibiční účinek dvou různých připravených nanočástic stříbra (a) fyzikálně a (b) chemicky na patogenní bakterie *Escherichia coli* s plasmidem (K12pGFlux Ramp) vyznačující se schopností luminescence. Koloidní stříbro bylo ke vzorkům přidáváno v okamžiku začátku měření. ID₅₀ se u chemicky připraveného Ag⁺ s kaseinem (stabilizační činidlo) pohybovala v rozmezí 11,8-23,6mg/l, bez kaseinu 23,6mg/l (Obr. č. ...). Fyzikálně připravené Ag⁺ bez kaseinu použité v rozmezí koncentrací 50 – 0,014 mg/l vykazoval ID₅₀ při koncentracích 0,25 – 0,125mg/l (Obr. č. ...). Vyšší dávky u obou typů koloidů inhibovaly zcela růst bakterií.



Fyzikálně připravené Ag⁺ bez kaseinu použité v rozmezí koncentrací 8 – 0,031 mg/l vykazoval ID₅₀ při koncentracích 0,25 – 0,125mg/l. Vyšší dávky u obou typů koloidů inhibovaly zcela růst bakterií.



ID₅₀ se u chemicky připraveného Ag⁺ s kaseinem (stabilizační činidlo) pohybovala v rozmezí 11,8-23,6mg/l, bez kaseinu 23,6mg/l.

Výsledky

Spontánní chemiluminiscence vykazovala při vyšších koncentracích stříbra tendenci k mírnému navýšení CL signálu, naopak u koncentrací nižších než 5 mg/l se projevoval spíše pokles v rozmezí 62 – 40 % kontroly.

Aktivovaná chemiluminiscence vykazovala ve většině testovaných koncentrací mírné zvýšení. Pokles byl pozorován pouze u nejvyšších testovaných koncentrací a to na 74, resp. 62 % kontroly. Pozorované rozdíly nebyly statisticky významné.

Závěr

Fyzikálně připravené stříbro vykazovalo velký účinek na bakterie a způsobovalo poloviční přežití bakterií v koncentraci mezi hodnotami 0,25- 0,125mg/l Ag. Chemicky připravené Ag⁺ (s kaseinem i bez) vykazovalo nižší účinek.

Fagocyty v prostředí různých koncentrací fyzikálně připraveného koloidního stříbra byly schopny fagocytózy a produkce kyslíkových radikálů. Pozorované změny v produkci RKM oproti kontrole nebyly významné a nevykazovaly jednoznačné koncentrační závislosti. Nelze vyloučit, že jiné způsoby přípravy nanočástic nebo použití stabilizátorů budou fagocytózu ovlivňovat výrazněji.

Citované literární zdroje

Prnka T., Šperlík K.: *Nanotechnologie*. 1 vyd. Ostrava: Reprints, 2006. 177 s. ISBN 80-7329-134-7.

Sharma V. K., Yngard R. A., Lin Y.: Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2009, roč. 145, č. 1, s. 83–96.