

Nanocząstki srebra i złota odpowiedzią na leczenie infekcji błon śluzowych

Silver and gold nanoparticles the answer to treating infections of mucous membranes

dr n. chem. inż. Marta Pawłowska¹, dr Paweł Lisiecki², mgr farm. Piotr Hudemowicz,
prof. dr hab. n. farm. Andrzej Stańczak²

¹ACC Chemicals Sp z o.o., WSIIZ

²Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Wydział Farmaceutyczny

Piotr Hudemowicz – ORCID: 0000-0002-9165-6701

Nr art. GP.202305.04 © P

■ **Słowa kluczowe:** nanocząstki srebra, AgNPs, nanocząstki złota, AuNPs, aktywność mikrobiologiczna, błony śluzowe.

■ **Streszczenie:** Lecnicze zastosowanie srebra jako miejscowego środka przeciwdrobnoustrojowego rozpoznało się w Europie dopiero w XIX w., chociaż już w starożytności używano go do zachowania stabilności wody pitnej. Powszechne stosowanie srebra w produktach medycznych i konsumenckich rozpoczęło się od udokumentowania jego działania przeciwko bakteriom, wirusom i grzybom. Obecnie metale te, stanowiące alternatywę dla powszechnie stosowanych antybiotyków, przeżywają renesans dzięki nanotechnologii, która dostarcza materiałów o zwiększonej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Nanocząstki (NPs), w tym najpowszechniej stosowane nanocząsteczki srebra (AgNPs) i złota (AuNPs), charakteryzują się wysoką aktywnością przy braku lub niskiej toksyczności dla komórek ludzkich. Nanocząsteczki metali, w szczególności srebra, są powszechnie wykorzystywane w środkach dezynfekujących i mogą być stosowane jako składnik produktów do higieny jamy ustnej, kropli do oczu, specjalistycznych opatrunków medycznych, globulek i maści ginekologicznych. Wykazują bowiem wysoką skuteczność wobec szczepów drobnoustrojów kolonizujących powierzchnię błon śluzowych i przyczyniających się do rozwoju infekcji w obrębie nosogardzieli i układu moczowo-płciowego. Celem prezentowanej pracy jest uzyskanie optymalnych formuł farmakologicznych i doświadczalna weryfikacja w skali laboratoryjnej skuteczności otrzymanych preparatów zawierających nanomateriały – Nanosilver aXonnite i Nanogold aXonnite. Formułacje badane były wobec wybranej, reprezentatywnej grupy szczepów chorobotwórczych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz grzybów. Badanie zostało rozszerzone o wykorzystanie w tworzeniu formułacji substancji ułatwiających przenikanie, zakładając, że zastosowane promotory będą wspierać aktywność nanometali poprzez ułatwienie ich migracji w podłożach mikrobiologicznych, co przy warunkach rzeczywistych miało wpłynąć pozytywnie na przenikanie nanometali przez ściany komórkowe drobnoustrojów. Przedstawione badania stanowią wstępny etap prac rozwojowych nad produktami przeznaczonymi do higieny błon śluzowych, a tym samym wspomagającymi proces leczenia stanów zapalnych.

■ **Keywords:** silver nanoparticles, AgNPs, gold nanoparticles, AuNPs, microbial activity, mucosal.

■ **Abstract:** The medicinal use of silver as a topical antimicrobial agent did not become widespread in Europe until the 19th century, although it was used in ancient times to maintain the stability of drinking water. The widespread use of silver in medical and consumer products began with the documentation of its activity against bacteria, viruses and fungi. Today, these metals, an alternative to commonly used antibiotics, are experiencing a renaissance thanks to nanotechnology, which provides materials with enhanced antimicrobial activity. Nanoparticles (NPs) including the most widely used silver nanoparticles (AgNPs) and gold nanoparticles (AuNPs) are characterized by high activity with no or low toxicity to human cells. Metal nanoparticles, especially silver, are commonly used in disinfectants and can be used as an ingredient in oral hygiene products, eye drops, specialized medical dressings, globules and gynecological ointments. This is because they

show high efficacy against strains of microorganisms that colonize the surface of mucous membranes and contribute to the development of infections in the nasopharynx and genitourinary tract.

The aim of the presented work is to develop optimal pharmacological formulations and experimental verification on a laboratory scale of the effectiveness of the obtained formulations containing nanomaterials – Nanosilver aXonnite and Nanogold aXonnite. The formulations were tested against a selected representative group of strains of pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi. The study was extended to include the use of in formulation development, substances facilitating permeation, assuming that the promoters used would promote the activity of nanometals by facilitating their migration in microbial media, which under real conditions was expected to positively affect the permeation of nanometals through the cell walls of microorganisms. The research presented here represents the initial stage of development work on products geared toward mucosal hygiene, and thus aiding in the treatment of inflammation.

Wprowadzenie

Srebro i złoto to metale szlachetne cenione od tysięcy lat ze względu na walory użytkowe, ale znane już starożytnym ze swych leczniczych, antyseptycznych i kosmetycznych właściwości. Złote nici znajdowano w z mumifikowanych ciałach bogatych Egipcjan, które wszywano w skórę, w celu zachowania pięknego i młodego wyglądu [1]. Chociaż wiedza o właściwościach leczniczych złota znana była w Chinach od ok. 2500 r. p.n.e., w Europie zostało ono wykorzystane w leczeniu dopiero po 1890 r., gdy Robert Koch udowodnił, że cyjanek złota może hamować rozwój prątków gruźlicy [2].

Dużo więcej informacji można znaleźć w źródłach pisanych na temat srebra. Właściwości dezynfekujące i sprzyjające zachowaniu trwałości wykorzystywali starożytni mieszkańcy basenu Morza Śródziemnego, którzy przechowywali wodę pitną w srebrnych lub posrebrzanych naczyniach [3]. Choć nie wiązano tego jeszcze z antyseptycznymi właściwościami, lekarze-praktycy dokumentowali, że w tych warstwach społecznych Europy, które przy spożywaniu posiłków korzystały ze srebrnych naczyń i sztućców, dochodziło istotnie rzadziej do zakażeń przewodu pokarmowego [4].

Od czasów średniowiecznych aż do lat 70. XX w. używano jednak głównie srebra metalicznego (także w formie koloidów) oraz jego związków (azotanu srebra *in lapis* lub sulfadiazyny srebra), wykorzystując szeroko ich działanie antyseptyczne zarówno w medycynie, jak i w kosmologii [5]. Dopiero współczesne prace poświęcone badaniom nad metalami szlachetnymi

i półszlachetnymi w rozmiarze *nano* dowiodły, że substancje te przeniesione do tej skali posiadają znakomite właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Jak udowodniono, nanocząstki srebra (ang. *Silver Nanoparticles*, AgNPs) i złota (ang. *Gold Nanoparticles*, AuNPs) cechuje wysoka skuteczność, a jednocześnie nie wykazują lub wykazują niską toksyczność w stosunku do komórek ludzkich [6].

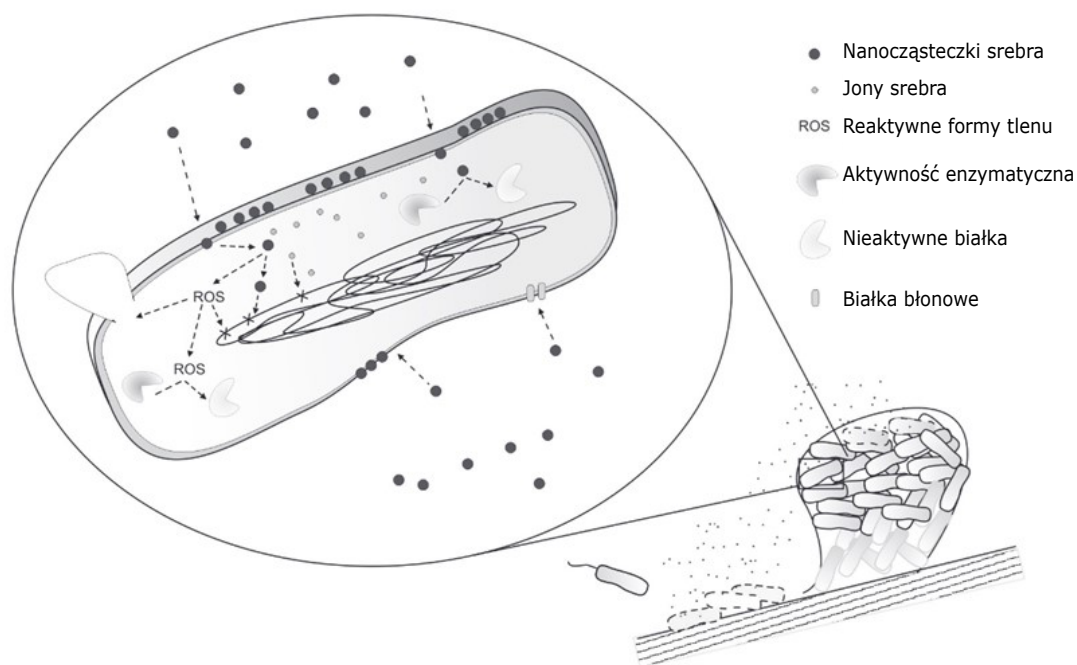
Antyseptyczny mechanizm działania AgNPs i AuNPs jest podobny, związany przede wszystkim z uszkodzeniami ściany komórkowej drobnoustrojów, zależny od wielkości, kształtu, powierzchni całkowitej nanocząstek (ang. *Nanoparticles*, NPs) [6,7]. Swoje wyjątkowe właściwości i dużą skuteczność NPs zawdzięczają wysokiemu stosunkowi powierzchni aktywnej do objętości. Szerzej wykorzystywane były związki lub jony srebra Ag^+ , gdzie podczas użytkowania zauważalny był ustawiczny spadek stężenia. Związane jest to z tworzeniem trudno rozpuszczalnych połączeń, głównie z jonami chlorkowymi obecnymi w płynach ustrojowych, co stanowiło podstawowy mankament produktów leczniczych zawierających jonową postać srebra [8].

Skuteczność, możliwość długotrwałego stosowania, a także szerokie spektrum działania na mikroorganizmy są główną zaletą NPs, a różnorodność metod eliminacji przez nie drobnoustrojów utrudnia mikroorganizmom wytworzenie procesów obronnych [9]. Mechanizm antyseptyczny srebra jest bowiem wielokierunkowy. Łańcuch procesów rozpoczyna połączenie z grupami sulfonowymi peptydoglikanu, występują-

cego w ścianie komórkowej bakterii i zmniejszenie usieciowania głównego polimeru (mureiny). Prowadzi to do perforacji lub/i odklejania się ściany od błony komórkowej, zwiększonej przepuszczalności ściany komórkowej, wylania się cytoplazmy, a w konsekwencji do śmierci drobnoustroju [10,11]. Obniżenie stopnia usieciowania sprzyja również penetracji składników z zewnątrz w głąb komórki bakteryjnej, gdzie srebro, wchodząc w interakcje z resztami fosforanowymi, imidazolowymi, sulfhydrylowymi oraz karboksylowymi białek receptorowych, transportowych, jak i enzymów, zaburza prawidłowe funkcjonowanie drobnoustroju. Srebro reaguje również z resztami fosforanowymi nukleotydów, a wbudowując się w łańcuch DNA bakterii, uniemożliwia ich replikację [12]. Srebro powoduje też zaburzenie przemieszczania się elektronów na ścianie komórkowej bakterii i tym samym ogranicza proces wytwarzania energii w cyklu oddychania komórkowego. Jak wykazano, już bardzo małe stężenia srebra lub jonów srebra zakłócają transport elektronów przez aktywowa-

ną jonami sodu oksydoreduktazę NADH/ubichinon i powodują gwałtowną ucieczkę protonów poprzez błonę komórkową, prowadząc do całkowitej utraty związków energetycznych [4].

Antyseptyczne właściwości srebra wiążą się także z powstawaniem dużej ilości reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS), a indukowany na tej drodze stres oksydacyjny rzutuje na działanie białek i zahamowanie wzrostu oraz zniekształcenie struktury komórkowej, wewnętrznej i zewnętrznej, prowadząc ostatecznie do jej unicestwienia [13]. Należy tu jednak dodać, że wrażliwość bakterii na srebro jest różna, związana przede wszystkim z budową ściany komórkowej. W bakteriach Gram-ujemnych warstwa mureiny, złożona głównie z długich łańcuchów polisacharydowych połączonych mostkami peptydowymi, jest bowiem pojedyncza, w przeciwieństwie do bakterii Gram-dodatnich, które cechuje wielowarstwowa struktura, co w konsekwencji prowadzi do większej odporności na działanie tego metalu. Srebro jest jednak całkowicie bezpieczne dla ludzi,



Rycina 1. Działanie nanocząstek srebra na komórkę bakterii [34]

gdyż mureina nie występuje w ludzkich komórkach eukariotycznych, co uniemożliwia penetrację do wnętrza nieuszkodzonych komórek ludzi czy zwierząt [14].

Właściwości antyseptyczne AgNPs są szeroko wykorzystywane w medycynie. Współcześnie AgNPs wchodzi w skład nie tylko preparatów stosowanych do dezynfekcji skóry [15], ale także służą do powlekania implantowanych wyrobów medycznych: implantów protez, cewników, wkładek domacicznych, zastawek, itp., tworząc na ich powierzchni powłokę antybakteryjną [16]. Nanosrebro jest wykorzystywane również w chirurgii ortopedycznej (w celu zmniejszenia ryzyka infekcji) jako dodatek do polimerowego cementu kostnego (ang. *poly(methylmethacrylate)*, PMMA), który stosuje się w zabiegach implantacji protez stawów biodrowych i kolanowych [17]. W stomatologii AgNPs stosowane są w profilaktyce i infekcjach w obrębie jamy ustnej. Wchodzi także w skład nowoczesnych cementów dentystycznych [18]. Jednym z najszerszych zastosowań AgNPs są jednak nowoczesne materiały opatrunkowe, wspomagające proces leczenia, stosowane w przypadku trudno gojących się ran. Jak udowodniono, obok działania przeciwdrobnoustrojowego AgNPs wykazują także działanie przeciwzapalne, inhibując wydzielanie cytokin prozapalnych oraz aktywując apoptozę, bez szkodliwego wpływu na zdrowe komórki [19].

W przeciwieństwie do nanosrebra, wykorzystywanego głównie w produktach antyseptycznych, złoto znalazło szersze zastosowanie. Przeglądając zasoby Internetu można natknąć się na ogłoszenia klinik medycyny estetycznej, w których złote nici stosowane są do liftingu twarzy, dekoltu, piersi itp. W skali *nano* złoto działa bowiem nie tylko przeciwbakteryjnie, ale korzystnie na skórę dojrzałą, gdyż spowalnia degradację kolagenu, poprawia jej poziom ujędrnienia [20]. Z uwagi na bardzo rozwiniętą powierzchnię kontaktową i możliwość tworzenia ligandów m.in. z cząsteczkami leków, AuNPs

mogą stanowić znakomity nośnik transportu produktów leczniczych w docelowe miejsca działania w organizmie człowieka [21]. Przeprowadzone prace udokumentowały możliwość utworzenia połączeń z 70 cząsteczkami różnych substancji, w tym z *paklitakselą* – lekiem powodującym zahamowanie mitozy zmienionych komórek, dostarczany bezpośrednio w okolice zmian nowotworowych [22]. W diagnostyce nanozłoto stosowane jest jako kontrast przy badaniach spektrofotometrycznych [23], a dostarczone do guzów termowrażliwych po napromieniowaniu falami o długości 800-1200 nm powoduje ich lokalne przegrzanie i zniszczenie [24].

Współcześnie nanosrebro jest także powszechnie stosowane w szerokiej gamie produktów konsumenckich. Znajdziemy je nie tylko w kosmetykach, ale też w ubraniach, bieliźnie, skarpetach i wszędzie tam, gdzie istnieje niebezpieczeństwo pojawienia się nieprzyjemnego zapachu związanego z użytkowaniem. Jest on bowiem związany z rozkładem substancji organicznych wydzielanych przez skórę przez drobnoustroje bytujące na powierzchni naszego ciała. Problem przykrego zapachu może także dotyczyć jamy ustnej i być efektem nie tylko braku odpowiedniej higieny, lecz toczących się procesów chorobowych. Mikroflorę jamy ustnej tworzy bowiem ponad 700 gatunków bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, zarówno tlenowych, jak i beztlenowych. Bakterie te wykazują gatunkowo swoistą topografię, kolonizując zęby, język, błonę śluzową jamy ustnej, podniebienie twarde i kieszonki dziąsłowe. Niektóre z nich odgrywają ważną rolę w utrzymaniu zdrowego stanu jamy ustnej, inne są potencjalnymi czynnikami chorobotwórczymi. Jednak w przypadku ich nadmiaru lub zachwianej równowagi stają się czynnikiem etiologicznym stanów zapalnych tkanek miękkich, jamy ustnej, dziąsła, przyzębia oraz próchnicy [25].

Ciągłym źródłem infekcji jamy ustnej są także protezy zębowe, implanty i aparaty ortodontyczne, chętnie zasiedlane przez drobnoustroje,

tworzące na ich powierzchni zwartą warstwę biofilmu. Ich konstrukcja, blokująca prawidłowy przepływ śliny, znacznie utrudnia utrzymywanie prawidłowego stopnia higieny. Profilaktyka i zwalczanie biofilmu tworzącego się na protezach, aparatach ortodontycznych i przylegającej tkance opiera się głównie na mechanicznym usuwaniu drobnoustrojów. Wspiera je stosowanie past do zębów i płynów do płukania jamy ustnej zawierających substancje o właściwościach przeciwbakteryjnych. Ale pozbycie się ich tradycyjnymi metodami jest niemal niemożliwe i często zmusza pacjenta do przewlekłej antybiotykoterapii, wymiany protezy, a co za tym idzie do ponoszenia dodatkowych kosztów leczenia [26,27].

W przypadku zaburzenia mikrobiomu błon śluzowych pochwy dochodzi do zwiększonej kolonizacji bakteriami i grzybami powodującymi stany zapalne i infekcje. Do najczęściej obserwowanych przedstawicieli bakterii i grzybów patogennych odpowiedzialnych za infekcję można zaliczyć: *Gardnerella vaginalis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* oraz grzyby z gatunków *Candida albicans*.

Zdolność drobnoustrojów do tworzenia struktury biofilmu wpływa niekorzystnie na proces leczenia infekcji. Mikroorganizmy znajdujące się pod macierzą (ang. *matrix*) tolerują bowiem nawet 1000-krotnie wyższą dawkę toksycznych dla nich związków w porównaniu z bakteriami nieskolonizowanymi [28]. Oporność ta związana jest z kilkoma czynnikami. W pierwszej kolejności należy wymienić tu wydłużony czas wnikania substancji aktywnej, co w konsekwencji daje możliwość wytworzenia lub uruchomienia przez patogenne bakterie mechanizmów obronnych. Nie bez znaczenia jest również efekt tzw. pierwszej dawki substancji przeciwdrobnoustrojowej, bowiem *matrix* skutecznie uniemożliwia dostęp leku, co ma ogromny wpływ na efektywność niwelowania kolonii biofilmu [29]. Możliwość współdziałania różnych szczepów drobnoustrojów w procesie tworzenia biofilmu jest kolejnym mechanizmem stanowiącym spore utrudnienie

w zwalczaniu patogennych mikroorganizmów. Jest on najczęściej związany z wymianą substancji niezbędnych do życia, co zwiększa szansę przetrwania w niekorzystnych warunkach środowiskowych albo blokowania rozwoju mikroorganizmów poprzez wydzielanie substancji hamujących rozwój innych szczepów [30].

Wszystkie wyżej przedstawione kwestie utrudniające aktywne leczenie sprawiają, że skuteczne zwalczanie infekcji i stanów zapalnych w obrębie błon śluzowych stanowi duże wyzwanie. AgNPs i AuNPs uznawane za nową generację środków stosowanych w medycynie w celu zwalczania zakażeń bakteryjnych mogą znakomicie wpisać się w poszukiwanie nowatorskich rozwiązań i koncepcję tworzenia nowych produktów higienicznych [31]. Uwzględniając jednak fakt, że aktywność nanocząstek zależy w dużej mierze od kształtu i wielkości powierzchni aktywnej, wydaje się słusznym przeprowadzenie wstępnej oceny skuteczności Nanosilver aXonnite oraz Nanogold aXonnite o wielkości cząstek 2150 nm i kształcie sferycznym do owalnego wobec wybranych przedstawicieli patogennych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz grzybów, potencjalnie występujących we florze bakteryjnej jamy ustnej.

Prezentowane wyniki w artykule są pierwszą częścią pracy badawczej, gdzie w dalszej kolejności badaniu poddane są inne szczepy charakterystyczne dla nosogardzieli i błon śluzowych pochwy. W tej części pracy głównie badane były potencjały zastosowania srebra wsparte promotorami przenikania. Samo srebro jako cząstka stała, niezjonizowana nie ma mechanizmów wspierających przejście przez granicę błony śluzowej, dlatego też w tej części skupiliśmy się nad wskazaniem najlepszej opcji działania antybakteryjnej synergii srebro-promotor. Wybrane szczepy były sztandarowymi, łatwo dostępnymi przedstawicielami bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, co miało wskazać kierunek działania mieszaniny i w dalszej kolejności umożliwić pogłębienie badań.

■ Materiały i metody

Formulacje farmaceutyczne użyte do badań

W ocenie skuteczności antydrobnoustrojowej wykorzystano pięć formuacji farmaceutycznych o następującym składzie:

- Nanosilver aXonnite (15 ppm),
- Nanosilver aXonnite (15 ppm) + Nanogold aXonnite (5 ppm),
- Nanosilver aXonnite (15 ppm) + Glikol kaprylowy (1,5%) + Polisorbat 20 (3%),
- Nanosilver aXonnite (15 ppm) + Etyloheksylogliceryna (2%) + Polisorbat 20 (3%),
- Nanosilver aXonnite (15 ppm) + Glikol kaprylowy (1,5%) + Polisorbat 20 (6%) + Etyloheksylogliceryna (2%).

Zawierały one obok AgNPs i AuNPs także promotor przenikania, zapewniający właściwą penetrację oraz migrację cząstek w podłożach mikrobiologicznych, a także solubilizator – Polisorbat 20 gwarantujący pożądane rozproszenie w roztworach wodnych. Do ich przygotowania wykorzystano:

- Nanosilver aXonnite [INCI: aqua, silver (nano)], CAS: 7732-18-5, 7440-22-4, roztwór koloidalny srebra w wodzie o stężeniu 100 ppm, czyli 100 mg/l wody. Srebro metaliczne Ag4N uzyskane w formie prętów o czystości 99,99%, rozdrobnione metodą ablacji laserowej na cząstki wielkości 2–8 nm (90%), o kształcie sferycznym do owalnego, o pH 6,5+/-1, przewodności właściwej 5–50 µS. Producent: Nano-tech Polska Sp. z o.o. Sp. K.
- Nanogold aXonnite [INCI: aqua, gold (nano)], CAS: 7732-18-5, 7440-57-5, roztwór koloidalny złota w wodzie o stężeniu 100 ppm, czyli 100 mg/l wody. Złoto metaliczne Ag4N uzyskane w formie prętów o czystości 99,99%, rozdrobnione metodą ablacji laserowej na cząstki wielkości 2–8 nm (90%), o kształcie sferycznym do owalnego, o pH 6,5+/-1, przewodności właściwej 2–50 µS. Producent: Nano-tech Polska Sp. z o.o. Sp. K.
- Polisorbat 20 (INCI: Polysorbate 20), CAS:

9005-65-6, postać płynna, stężenie 100%. Producent: Donauchem.

- Glikol kaprylowy (INCI: Caprylyl glycol) CAS: 1117-86-8, postać płynna, stężenie 100%. Producent: Inolex.
- Etyloheksylogliceryna (INCI: Ethylhexylglycerin) CAS: 70445-33-9, postać płynna, stężenie 100%. Producent: Brenntag.

Przygotowanie formuacji farmaceutycznej

Substancje służące do przygotowania badanych formuacji dodawano stopniowo, w ilościach zgodnych z przedstawionym powyżej opisem, do naczynia miarowego wypełnionego ok. 750 ml wody, mieszając mieszadłem mechanicznym z prędkością 50 200 obr./min w czasie ok. 8–10 minut. Następnie uzupełniano wodą do objętości 1000 ml roztworu. Tak przygotowane formuacje przeniesiono do oranżowych butelek aptecznych i oznakowano.

■ Badanie mikrobiologiczne przygotowanych formuacji

Określenie aktywności badanych formuacji wobec wzorcowych szczepów drobnoustrojów przeprowadzono zgodnie z zaleceniami EUCAST (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), wyznaczając wartość minimalnego stężenia hamującego (ang. *Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym Mullera-Hintona i RPMI-1640 [32].

W badaniach wykorzystano:

- bakterie Gram-ujemne: *Escherichia coli* ATCC 8739 oraz *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027;
- bakterie Gram-dodatnie: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538;
- grzyby: *Candida albicans* ATCC 10231 oraz *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Badane szczepy przechowywano w temperaturze -70°C, zawieszono w bulionie odżywczym z dodatkiem 50% glicerolu. W trakcie wykony-

wania doświadczeń szczepy bakterii przesiewano metodą redukcyjną na agarowe podłoże Mueller-Hinton (Becton Dickinson), a szczepy grzybów na agarowe podłoże Sabouraud (Becton Dickinson). Płytki z bakteriami inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny, a z grzybami w temperaturze 30°C przez 48 godzin. Tak otrzymane hodowle wykorzystywano w dalszych etapach badań.

Wykonanie oznaczenia aktywności badanych formulacji metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym

Do jałowej probówki zawierającej 5 ml jałowej wody przenoszono za pomocą ezy kilka kolonii szczepu wzorcowego tak, aby gęstość optyczna powstałej zawiesiny wynosiła 0,5 wg skali McFarlanda. Ocenę gęstości optycznej dokonywano za pomocą nefelometru. Przygotowane w ten sposób zawiesiny drobnoustrojów zawierały w 1 ml $1,5 \times 10^8$ komórek i stanowiły *inokulum*, które wykorzystano w wyznaczaniu wartości najniższego stężenia substancji mikrobiologicznie aktywnej, tworzącej badaną formulację hamującą wzrost drobnoustrojów (MIC). W tym celu wgłębienia sterylnych płytek mikrotitracyjnych o 8 rzędach po 12 studzienek o zaokrąglonym dnie napełniano 100 µl jałowego bulionu Mullera-Hinton (Becton Dickinson) dla bakterii lub płynnego podłoża RPMI-1640 (Biomed) dla grzybów. Następnie do każdej pierwszej studzienki z danego rzędu przenoszono 100 µl badanej formulacji i po dokładnym wymieszaniu zawartości pobierano z niej 100 µl mieszaniny i przenoszono do kolejnej studzienki w rzędzie. Czynność tę powtarzano 9 razy dla kolejnych studzienek. Ze studzienki 10. po wymieszaniu wylewano 100 µl mieszaniny. Na tej drodze otrzymano serię podwójnych rozcieńczeń badanych związków: 1:2 do 1:1024, przy czym studzienka 11. stanowiła kontrolę wzrostu, a studzienka 12. jałowości podłoża.

Następnie przy użyciu pipety automatycznej do studzienek 1–11 dodawano po 10 µl wcześniej wystandaryzowanej zawiesiny drobn-

ustrojów wzorcowych. Płytki ze szczepami bakterii inkubowano w cieplarni w temperaturze 37°C przez 24 godziny, a płytki ze szczepami grzybów w temperaturze 30°C przez 48 godzin. Wartość MIC określano przez makroskopową ocenę wzrostu w postaci zmętnienia podłoża lub osadu na dnie studzienki. Dodatkowo stopień zmętnienia hodowli oceniano za pomocą pomiaru absorbancji przy długości fali 595 nm w aparacie Microplate Reader 680 (Biorad).

Aktywność bójczą badanych formulacji oceniano, wyznaczając wartość minimalnego stężenia bakteriobójczego (ang. *Minimum Bactericidal Concentration*, MBC). Jest to najmniejsze stężenie substancji mikrobiologicznie aktywnej tworzącej daną formulację, pod wpływem której ginie 99,9% komórek drobnoustrojów. W tym celu z każdej studzienki, w której nie zaobserwowano wzrostu, pobierano eż mieszalinę i posiewano na powierzchnię agarowego podłoża Mueller-Hinton (Becton Dickinson), a szczepy grzybów na agarowe podłoże Sabouraud (Becton Dickinson). Posiewy z bakteriami inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny, a posiewy z grzybami w temperaturze 30°C przez 48 godzin. Brak wzrostu szczepów świadczył o działaniu przeciwdrobnoustrojowym badanej formulacji. Wyniki badań zestawiono w tabelach 1–10.

Omówienie wyników

Celem prowadzonych badań było opracowanie i weryfikacja doświadczalna w skali laboratoryjnej serii formulacji zawierających nanocząstki srebra i złota oraz ich potencjalnego wykorzystania w przemyśle farmaceutycznym do tworzenia produktów stosowanych na śluzówkę. Stanowią one wstępny etap prac rozwojowych nad produktem skierowanym do higieny błon śluzowych oraz wspomagającym proces leczenia stanów zapalnych śluzówki jamy ustnej, okolicy pochwy. W pracy wykorzystano Nanosilver aXonnite i Nanogold aXonnite o wielkości cząstek 2–8 nm (90%) o kształcie sferycznym do owalnego. W celu poprawy penetracji podłoża

Tabela 1. Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu *Escherichia coli* ATCC 8739

BADANA FORMULACJA	ROZCIEŃCZENIA BADANEJ FORMULACJI									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Nanosilver (15 ppm)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Nanogold (5 ppm)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (3%)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat 20 (3%)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

- brak wzrostu

+ wzrost

Tabela 2. Wyznaczone wartości MIC i MBC badanych formułacji w stosunku do *Escherichia coli* ATCC 8739
W tabeli podano stężenia składników poszczególnych formułacji wyrażone w ppm albo w stężeniach procentowych.

BADANA FORMULACJA	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	
	MIC	MBC
Nanosilver (15 ppm)	7,5 ppm	7,5 ppm
Nanosilver (15 ppm) Nanogold (5 ppm)	7,5 ppm 2,5 ppm	7,5 ppm 2,5 ppm
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (3%)	1,875 ppm 0,187% 0,375%	1,875 ppm 0,187% 0,375%
Nanosilver (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat 20 (3%)	0,937 ppm 0,125% 0,187%	0,937 ppm 0,125% 0,187%
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	0,468 ppm 0,046% 0,187% 0,062%	0,468 ppm 0,046% 0,187% 0,062%

Tabela 3. Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

BADANA FORMULACJA	ROZCIĘCZENIA BADANEJ FORMULACJI									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Nanosilver (15 ppm)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Nanogold (5 ppm)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (3%)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat 20 (3%)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

- brak wzrostu

+ wzrost

Tabela 4. Wyznaczone wartości MIC i MBC badanych formułacji w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

W tabeli podano stężenia składników poszczególnych formułacji wyrażone w ppm albo w stężeniach procentowych.

BADANA FORMULACJA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	
	MIC	MBC
Nanosilver (15 ppm)	7,5 ppm	7,5 ppm
Nanosilver (15 ppm) Nanogold (5 ppm)	7,5 ppm 2,5 ppm	7,5 ppm 2,5 ppm
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (3%)	3,75 ppm 0,375% 0,75%	3,75 ppm 0,375% 0,75%
Nanosilver (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat 20 (3%)	3,75 ppm 0,5% 0,75%	3,75 ppm 0,5% 0,75%
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	1,875 ppm 0,1875% 0,75% 0,25%	1,875 ppm 0,1875% 0,75% 0,25%

Tabela 5. Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

BADANA FORMULACJA	ROZCIĘCZENIA BADANEJ FORMULACJI									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Nanosilver (15 ppm)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Nanogold (5 ppm)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (3%)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat 20 (3%)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

- brak wzrostu

+ wzrost

Tabela 6. Wyznaczone wartości MIC i MBC badanych formułacji w stosunku do *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

W tabeli podano stężenia składników poszczególnych formułacji wyrażone w ppm albo w stężeniach procentowych.

BADANA FORMULACJA	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	
	MIC	MBC
Nanosilver (15 ppm)	7,5 ppm	7,5 ppm
Nanosilver (15 ppm) Nanogold (5 ppm)	7,5 ppm 2,5 ppm	7,5 ppm 2,5 ppm
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (3%)	3,75 ppm 0,375% 0,75%	3,75 ppm 0,375% 0,75%
Nanosilver (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat 20 (3%)	1,875 ppm 0,25% 0,375%	1,875 ppm 0,25% 0,375%
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	0,937 ppm 0,0937% 0,375% 0,125%	0,937 ppm 0,0937% 0,375% 0,125%

Tabela 7. Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu *Candida albicans* ATCC 10231

BADANA FORMULACJA	ROZCIEŃCZENIA BADANEJ FORMULACJI									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Nanosilver (15 ppm)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Nanogold (5 ppm)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (3%)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat 20 (3%)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

- brak wzrostu

+ wzrost

Tabela 8. Wyznaczone wartości MIC i MBC badanych formułacji w stosunku do *Candida albicans* ATCC 10231

W tabeli podano stężenia składników poszczególnych formułacji wyrażone w ppm albo w stężeniach procentowych.

BADANA FORMULACJA	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	
	MIC	MBC
Nanosilver (15 ppm)	>7,5 ppm	>7,5 ppm
Nanosilver (15 ppm) Nanogold (5 ppm)	>7,5 ppm >2,5 ppm	>7,5 ppm >2,5 ppm
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (3%)	1,875 ppm 0,1875% 0,375%	1,875 ppm 0,1875% 0,375%
Nanosilver (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat 20 (3%)	0,468 ppm 0,0625% 0,0937%	0,468 ppm 0,0625% 0,0937%
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	0,468 ppm 0,0468% 0,1875% 0,0625%	0,468 ppm 0,0468% 0,1875% 0,0625%

Tabela 9. Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

BADANA FORMULACJA	ROZCIEŃCZENIA BADANEJ FORMULACJI									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Nanosilver (15 ppm)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Nanogold (5 ppm)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (3%)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat 20 (3%)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

- brak wzrostu

+ wzrost

Tabela 10. Wyznaczone wartości MIC i MFC badanych formułacji w stosunku do *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

W tabeli podano stężenia składników poszczególnych formułacji wyrażone w ppm albo w stężeniach procentowych.

BADANA FORMULACJA	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	
	MIC	MBC
Nanosilver (15 ppm)	7,5 ppm	>7,5 ppm
Nanosilver (15 ppm) Nanogold (5 ppm)	7,5 ppm 2,5 ppm	>7,5 ppm >2,5 ppm
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (3%)	0,9375 ppm 0,0937% 0,1875%	7,5 ppm 0,75% 1,5 %
Nanosilver (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat 20 (3%)	0,9375 ppm 0,125% 0,1875%	3,75 ppm 0,5% 0,75%
Nanosilver (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5%) Polisorbat 20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	0,468 ppm 0,0468% 0,1875% 0,0625%	0,9375 ppm 0,0937% 0,375% 0,125%

mikrobiologicznego przez NPs zastosowano dwa różne promotory sorpcji w postaci 1,5% dodatku glikolu kaprylowego oraz etyloheksylogliceryny w ilości 2%. Pożądane rozproszenie w roztworze uzyskano przez 6% dodatek Polisorbatu 20.

Uzyskane rezultaty wskazują na dużą aktywność mikrobiologiczną analizowanych formułacji, wyznaczoną metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym, zarówno w stosunku do wzorcowych szczepów patogennych bakterii Gram-ujemnych (*Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa*), jak i Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*), a także grzybów (*Candida albicans* i *Aspergillus brasiliensis*). Najniższe stężenie substancji, hamujące wzrost drobnoustrojów (MIC), określone w stosunku do wszystkich szczepów bakteryjnych i *Aspergillus brasiliensis* wynosiło dla Nanosilver aXonnite 7,5 ppm oraz 2,5 ppm dla Nanogold aXonnite i było jedynie wyższe w przypadku *Candida albicans* (>7,5 ppm). Wartość ta była także wartością minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) dla szczepów bakteryjnych, co wskazuje na bakteriobójczy mechanizm działania formułacji.

Nanocząstki aXonnite są substancjami obojętnymi chemicznie, niezjonizowanymi, posiadającymi właściwości hydrofilowe. Cząstki srebra w takiej formie nie mają potencjału penetrującego i dodatek do roztworów glikoli w pierwszej kolejności zmniejsza napięcie powierzchniowe roztworów wodnych, co umożliwia lepsze przyleganie preparatu do śluzówki, a dodatkowo za pomocą wiązań wodorowych wspiera działanie penetrujące przez błony biologiczne.

Glikol kaprylowy jest wykorzystywany jako promotor przenikania w zastosowaniach naskórkowych, ale również przez śluzówkę, najpowszechniej używany jest w zastosowaniach proktologicznych (np. Procto-zac). W zastosowaniach do nosogardzieli nie był dotychczas używany, co wydało się ciekawe dla autorów, aby zastosować surowiec również w aplikacji laryngologicznej.

Wyniki badań potwierdzają, iż promotory przenikania poprawiały aktywność mikrobiologiczną formułacji we wszystkich przypadkach. Dodatek

glikolu kaprylowego obniżał wartość MIC do 1,875 ppm dla *Escherichia coli* i *Candida albicans*, a nawet do wielkości 0,9375 ppm dla *Aspergillus brasiliensis*. Były to także poziomy MBC, z wyjątkiem *Aspergillus brasiliensis*, dla którego MBC wynosiło 7,5 ppm. Glikol kaprylowy wykazał najniższą skuteczność w przypadku *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*, przyjmując wartości dla MIC i MBC wynoszące 3,75 ppm.

W przypadku etyloheksylogliceryny największe obniżenie MIC do wartości 0,9375 ppm uzyskano dla *Escherichia coli* i *Aspergillus brasiliensis*, choć w tym drugim przypadku MBC wynosiło już 3,75 ppm. Wyższe wartości MIC obserwowano dla *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*, odpowiednio 3,75 i 1,875 ppm. Były to zarazem wartości MBC. Najlepszy rezultat uzyskano w przypadku *Candida albicans*, dla której zarówno wartość MIC, jak i MBC wynosiła 0,468 ppm.

Zastosowanie obydwu promotorów jednocześnie skutkowało znacznym obniżeniem MIC do wartości 0,468 dla *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*. Było to zarazem wartością MBC, z wyjątkiem *Aspergillus brasiliensis*, dla którego MFC było dwukrotnie wyższe i wynosiło 0,9375 ppm. Jedynie *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* okazały się mniej wrażliwe na badaną formułację, a uzyskane rezultaty wynosiły odpowiednio 1,87 i 0,9376 ppm. Były to zarazem wartości MBC.

Wyniki wskazały działanie bakteriobójcze i grzybobójcze. Indeks MBC/MIC i MFC/MIC mieścił się w granicach $MBC/MIC \leq 4$ lub $MFC/MIC \leq 4$, gdzie przy działaniu bakteriostatycznym lub grzybostatycznym indeks ten przyjmuje wartość $MBC/MIC > 4$ lub $MFC/MIC > 4$ [33].

Ponadto w trakcie przeprowadzonego badania ustalono, że dodatek nanocząstek złota nie wpływa na zwiększenie działania przeciwdrobnoustrojowego formułacji wobec badanych szczepów, a dodatek solubilizatora w postaci Polisorbatu 20 nie wywiera negatywnego wpływu na aktywność NPs.

Wnioski

Przeprowadzone prace potwierdziły, że serbro AgNPs stanowi dobrą podstawę produktu przeznaczanego do higieny jamy ustnej oraz wspomagającego proces leczenia stanów zapalnych śluzówki. Wykazuje on bowiem wysoką aktywność wobec badanych wzorcowych szczepów patogenów, działając wobec większości z nich bakteriobójczo. Nie wykazano także negatywnego wpływu substancji pomocniczych, biorących udział w tworzeniu badanych formułacji, wspierających wręcz aktywność Nanosilver aXonnite poprzez promowanie stopnia przenikania i wzajemny synergizm, co znajdowało swoje odbicie w obniżeniu wartości najniższego stężenia substancji hamującej wzrost drobnoustrojów (MIC) oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) i grzybobójczego (MFC). Uzyskane wyniki zachęcają więc do dalszych prac rozwojowych, kwalifikując potencjalny produkt jako alternatywę dla stosowanych miejscowo antybiotyków.

Piśmiennictwo:

- Pitak-Arnop P, Hemprich A, Dhanuthai K, Pausch NCh. Gold for Facial Skin Care: Fact or Fiction? *Aesthetic Plastic Surgery*. 2011; 35: 1184-1188. Dostępny w Internecie: https://www.researchgate.net/publication/51046554_Gold_for_Facial_Skin_Care_Fact_or_Fiction. Dostęp 10.07.2023.
- Benedek TG. The history of gold therapy for tuberculosis. *J Hist Med Allied Sci*. 2004; 59(1):50-89.
- Burrell RE. A Scientific Perspective on the Use of Topical Silver Preparation. *Ostomy/Wound Management*. 2003; 5A: 19-24.
- Głowiński S, Kowalewski R. Ocena srebra w leczeniu przewlekłych ran. *Leczenie ran*. 2006; 3 (supl. 2): 21-28.
- Sintubin L, Verstraete W, Boon N. Biologically produced nanosilver: current state and future perspectives. *Biotech. Bioeng.* 2012; 109(10): 2422-2436.
- Talarska P, Borczkowski M, Żurawski J. Current Knowledge of Silver and Gold Nanoparticles in Laboratory Research—Application, Toxicity, Cellular Uptake. *Nanomaterials (Basel)*. 2021; 11(9): 2454. Dostępny w Internecie: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8466515/pdf/nanomaterials-11-02454.pdf>. Dostęp 10.07.2023.
- Driver VR. Silver Dressings in Clinical Practice. *Ostomy/Wound Management*. 2004; 50(9A Suppl), 11-15.
- Sim W, Barnard RT, Blaskovich MAT, Ziora ZM. Antimicrobial Silver in Medicinal and Consumer Applications: A Patent Review of the Past Decade (2007–2017). *Antibiotics (Basel)*. 2018; 7(4): 93. Dostępny w Internecie: <https://www.mdpi.com/2079-6382/7/4/93>. Dostęp 10.07.2023.
- Silver S, Phung le T, Silver G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006; 7: 627-634.
- Feng QL, Wu J, Chen GQ, et al. A mechanism study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 52(4): 662-668.
- Gogoi SK, Gopinath P, Paul A, et al. Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir*. 2006; 22: 9322-9328.
- Mohamed DS, Abd El-Baky RB, Sandle T, et al. Antimicrobial Activity of Silver-Treated Bacteria against Other Multi-Drug Resistant Pathogens in Their Environment. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9(4): 181-194. Dostępny w Internecie: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>

- PMC7235873/pdf/antibiotics-09-00181.pdf. Dostęp 12.07.2023.
- Quinteros MA, Aristizábal VC, Dalmasso PR, et al. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicol In Vitro*. 2016; 36:216-223.
- Wzorek Z, Konopka M. Nanosrebro — nowy środek bakteriobójczy. *Chemia-Czaso pismo Techniczne*. 2007; 104: 175-181.
- Jaya J, Sumit A. Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use. *Mol. Pharm.* 2009; 6: 1388-1401.
- Langauer-Lewowicka H, Pawlas K. Silver nanoparticles – applications and the impact on health and the environment. *Med Srod*. 2015; 3: 3-11.
- Alt V, Bechert Th, Steinrücke P, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*. 2004; 25: 4383-4391.
- Fernandez CC, Sokolonski AR, Fonseca MS, et al. Applications of Silver Nanoparticles in Dentistry: Advances and Technological Innovation. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(5): 2485. Dostępny w Internecie: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7957900/pdf/ijms-22-02485.pdf>. Dostęp 12.07.2023.
- Krishnan PD, Banas D, Durai RD, et al. Silver Nanomaterials for Wound Dressing Applications. *Pharmaceutics*. 2020; 12(9): 821. Dostępny w Internecie: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC757923/pdf/pharmaceutics-12-00821.pdf>. Dostęp 12.07.2023.
- Ji-hoon K, Chung-Oui H, Yun-chang K, et al. Anti-glycation effect of gold nanoparticles on collagen. *Biol Pharm Bull*. 2012; 35(2):260-4. Dostęp w Internecie: https://www.jstage.jp/article/bpb/35/2/35_2_260/_pdf/-char/en. Dostęp 9.07.2023.
- Sibuyi NRS, Koena Leah Moabelo KL, Fadaka AO, et al. Multifunctional Gold Nanoparticles for Improved Diagnostic and Therapeutic Applications: A Review. *Nanoscale Research Letters* 2021; 16: 174, 1-27. Dostęp w Internecie: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8645298/pdf/11671_2021_Article_3632.pdf. Dostęp 13.07.2023.
- Gibson JD, Khanal BP, Zubarev ER. Paclitaxel-Functionalized Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2007; 129: 11653-11661.
- Hainfeld JF, Slatkin DN, Focella TM, Smilowitz HM. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *British Journal of Radiology*. 2006; 79: 248-253.
- Alanazi FK, Radwan AA, Alsarra IA. Biopharmaceutical applications of nanogold. *Saudi Pharmaceutical J*. 2010; 18: 179-193. Dostęp w Internecie: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052511/pdf/main.pdf>. Dostęp 11.07.2023.
- Paśnik U, Brukwicka I, Błaszczak B, et al. Mikroflora jamy ustnej. *JCHC*. 2017; 1: 5-9. Dostęp w Internecie: http://www.jhc.eu/numery/2017_1/201712.pdf. Dostęp 10.07.2023.
- Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000. 2006; 42: 80-87.
- Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol* 2000, 2011; 55: 16-35.
- Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001; 9: 34-39.
- Balcazar JL, Subirats J, Borrego CM. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front. Microbiol*. 2015; 6: 1-9. Dostęp w Internecie: <file:///C:/Users/wlweg/Downloads/fmicb-06-01216.pdf>. Dostęp 11.07.2023.
- Rendueles O, Ghigo JM. Multispecies biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS. Microbiol. Rev*. 2012; 36: 972-989.
- Chen X, Schluessener HJ. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Lett*. 2008; 176: 1-12.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. Dostęp w Internecie: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria. Dostęp 10.07.2023.
- O'Donell F, Smyth TJ, Ramachandran VT, Smyth WF (2010) A study of the antimicrobial activity of selected synthetic and naturally occurring quinolones. *Int J Antimicrob Agents* 35:30-38. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.06.031).
- Gromulska M., Zieliński A., Gładysz K., „Structured sanitary preparation to mass gath-erings” *Epidemiological Review* 2010, 64, 1-145.

Źródła finansowania:

Praca sfinansowana ze środków własnych.

Konflikt interesów:

Nie istnieje konflikt interesów.

Nadesłano: 17-11-2023

Adres do korespondencji: redakcja@gabinetprywatny.pl