

Anna Maria Świdwińska-Gajewska
Sławomir Czerczak

NANOSREBRO – SZKODLIWE SKUTKI DZIAŁANIA BIOLOGICZNEGO

NANOSILVER – HARMFUL EFFECTS OF BIOLOGICAL ACTIVITY

Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera / Nofer Institute of Occupational Medicine, Łódź, Poland
Zakład Bezpieczeństwa Chemicznego / Department of Chemical Safety

STRESZCZENIE

Nanosrebro, zwane także srebrem koloidalnym, od wieków było znane i stosowane do zwalczania chorób i przedłużania trwałości produktów spożywczych. Najczęściej występuje w postaci zawiesiny, składającej się z cząstek wielkości < 100 nm. Dzięki swoim specyficznym właściwościom nanocząstki srebra są wykorzystywane w wielu technologiach do tworzenia wyrobów medycznych, tekstyliów, materiałów przewodzących czy ogniw fotowoltaicznych. Wzrastająca popularność zastosowania nanosrebra przyczynia się do zwiększenia liczby osób pracujących w narażeniu na tę substancję. Potencjalnymi drogami narażenia jest droga inhalacyjna, pokarmowa i dermalna. Nanocząstki srebra mogą być wchłaniane przez płuca, jelita, a także przez skórę do krwiobiegu i w ten sposób docierać do narządów wewnętrznych (wątroby, nerek, śledziony, mózgu, serca i jąder). Nanosrebro może wywoływać lekkie podrażnienie oczu i skóry, może także działać jak łagodny alergen na skórę. W narażeniu inhalacyjnym nanocząstki srebra działają głównie na płuca i wątrobę. Wykazano, że nanocząstki srebra mogą działać genotoksycznie na komórki ssaków. Istnieją niepokojące doniesienia na temat szkodliwego działania nanocząstek srebra na rozrodczość zwierząt eksperymentalnych. Narażenie na nanocząstki srebra może działać neurotoksycznie i wpływać na funkcje poznawcze, wywołując zaburzenia pamięci krótkotrwałej i pamięci roboczej. Obowiązujący obecnie w Polsce normatyw higieniczny dla frakcji wdychalnej srebra (najwyższe dopuszczalne stężenie) wynosi $0,05 \text{ mg/m}^3$. W świetle wyników badań toksykologicznych nad działaniem biologicznym nanocząstek srebra uzasadniona wydaje się potrzeba zaktualizowania normatywów higienicznych dla srebra z wyodrębnieniem frakcji nanocząstek. Med. Pr. 2014;65(6):831–845

Słowa kluczowe: nanocząstki, srebro, nanoobiekty, działanie toksyczne, nanosrebro, srebro koloidalne

ABSTRACT

Nanosilver, also identified as colloidal silver, has been known and used for ages to combat diseases or prolong food freshness. It usually occurs in the form of a suspension consisting of particles of size < 100 nm. Due to its specific properties, silver nanoparticles are used in many technologies to produce medical devices, textiles, conductive materials or photovoltaic cells. The growing popularity of nanosilver applications increases the number of people occupationally exposed to this substance. Potential exposure routes for silver nanoparticles are through dermal, oral and inhalation pathways. Silver nanoparticles may be absorbed through the lungs, intestine, and through the skin into circulation and thus may reach such organs as the liver, kidney, spleen, brain, heart and testes. Nanosilver may cause mild eyes and skin irritations. It can also act as a mild skin allergen. Inhalation of silver nanoparticles mainly affects the lungs and liver. It has been demonstrated that silver nanoparticles may be genotoxic to mammalian cells. There are some alarming reports on the adverse effects of silver nanoparticles on reproduction of experimental animals. Exposure to silver nanoparticles may exert a neurotoxic effect and affect cognitive functions, causing the impairment of short-term and working memory. Maximum admissible concentration (MAC) for the inhalable fraction of silver of 0.05 mg/m^3 is currently binding in Poland. In light of toxicological studies of silver nanoparticles it seems reasonable to update the hygiene standards for silver with nanoparticles as a separate fraction. Med Pr 2014;65(6):831–845

Key words: silver, nanoparticles, toxicity, nanoobjects, nanosilver, colloidal silver

Autorka do korespondencji / Corresponding author: Anna Maria Świdwińska-Gajewska, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera, Zakład Bezpieczeństwa Chemicznego, ul. św. Teresy 8, 91-348 Łódź; e-mail: answid@imp.lodz.pl
Nadesłano: 6 października 2014, zatwierdzono: 5 grudnia 2014

WSTĘP

Nanosrebro, historycznie określane mianem srebra koloidalnego, najczęściej występuje w postaci zawiesiny, składającej się z cząstek wielkości poniżej 100 nm. Nanosrebro

ma żółtawobrazowe zabarwienie, wynikające z efektu powstania plazmonu powierzchniowego, charakterystycznego dla nanocząstek metali. Nanosrebro, jak inne substancje w postaci nanocząstek, jest coraz szerzej stosowane w wielu dziedzinach. Srebro koloidalne od lat uważane

jest jako „złoty środek”, zwalczający drobnoustroje, chroniący przed wieloma chorobami i schorzeniami, który nie pozostawia skutków ubocznych, co nie wydaje się oczywiste w świetle badań z ostatnich lat.

Dzięki specyficznym właściwościom nanocząstki srebra są wykorzystywane w różnych technologiach, co pozwala na tworzenie wielu produktów. Ze względu na działanie antybakteryjne nanocząstki srebra znajdują zastosowanie w wyrobach medycznych (środki opatrunkowe), materiałach przeznaczonych do kontaktu z żywnością, pastach do zębów, kosmetykach, tekstyliach (odzież dla sportowców, skarpety), obuwiu, tworzywach sztucznych, a także materiałach budowlanych (farby). W celu zwiększenia przewodności materiałów tworzy się atramenty przewodzące na bazie nanosrebra. Częstki te znajdują zastosowanie także w ogniwach fotowoltaicznych oraz układach fotosyntezyzujących, pełniąc rolę cząstek plazmonicznych i modyfikując właściwości optyczne (1,2).

Z powodu wielu technologii wykorzystujących nanosrebro pojawia się coraz więcej preparatów i produktów zawierających tę postać substancji. Wzrasta też liczba osób pracujących w narażeniu na nanosrebro. Narażenie zawodowe na srebro nanocząstkowe może występować w procesach jego wytwarzania, formulacji do różnych preparatów oraz wprowadzania tych preparatów do wyrobów. Głównymi drogami narażenia jest inhalacja i kontakt przez skórę, a także droga pokarmowa (dotycząca m.in. cząstek, które dostały się pierwotnie do organizmu inhalacyjnie i zostały połknięte na skutek oczyszczania dróg oddechowych).

Srebro nie znajduje się w wykazach substancji stwarzających zagrożenie, zamieszczonych w załączniku VI do Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 127/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (3). Dotyczy to jednak konwencjonalnej postaci tego metalu. W niniejszej pracy autorzy omówili szkodliwe skutki zdrowotne biologicznego działania nanosrebra w kontekście narażenia zawodowego.

METODY PRZEGLĄDU

Przełgądu piśmiennictwa dokonano w oparciu o bazy internetowe naukowych czasopism recenzowanych. W przygotowaniu niniejszego opracowania wykorzystano prace dotyczące charakterystyki nanocząstek srebra i ich działania toksycznego.

WYNIKI PRZEGLĄDU

Poniższy przegląd piśmiennictwa podzielono na części dotyczące toksykokinetyki, która zawiera informacje dotyczące wchłaniania, rozmieszczenia i wydalania nanosrebra, a także działania drażniącego i uczulającego oraz toksycznego, z uwzględnieniem czasu i drogi narażenia. Opisano również odległe efekty toksyczne, takie jak mutagenność i genotoksyczność, wpływ na rozrodczość oraz działanie neurotoksyczne.

Toksykokinetyka

Potencjalnymi drogami narażenia jest droga inhalacyjna, pokarmowa i dermalna. W wielu pracach wykazano możliwość wchłaniania nanocząstek srebra przez płuca, jelita, a także przez skórę po oparzeniu, a nawet przez nieuszkodzoną skórę. Drogą inhalacyjną nanocząstki srebra docierają do płuc, skąd są wchłaniane do krwiobiegu i w ten sposób mogą dostawać się do narządów wewnętrznych.

Bezpośrednio po 6-godzinym narażeniu inhalacyjnym na nanocząstki srebra (15 nm) w płucach szczurów wykryto 1,7 µg srebra z podanej skumulowanej dawki 7,2 µg. Następnie zawartość srebra w płucach malała i po 7 dniach wynosiła zaledwie 4% początkowej ilości zdeponowanej substancji. Zawartość srebra we krwi, podobnie jak w płucach, najwyższa była tuż po zakończeniu ekspozycji i gwałtownie spadała w przeciągu następnego dnia. Stosunkowo dużą zawartość metalu wykryto w tylnej części jamy nosowej i węzłach chłonnych płuc. Niewielkie ilości srebra wykryto także w wątrobie, nerkach, śledzionie, mózgu i sercu narażonych zwierząt (4).

Rozmieszczenie srebra w poszczególnych tkankach badano po narażeniu szczurów na nanocząstki srebra (15 nm) drogą inhalacyjną przez 28 dni. Zaobserwowano statystycznie znamienne różnice w porównaniu z grupą kontrolną w ilości srebra w płucach i mózgu ($p < 0,01$) (5).

W 90-dniowym eksperymencie inhalacyjnym, w którym szczury narażano na aerozol nanocząstek srebra (18–19 nm) o stężeniu 49–515 µg/m³ wykazano, zależne od stężenia, układowe rozmieszczenie srebra. Zaobserwowano znaczącą zawartość srebra we krwi, wątrobie, opuszcze wężowej, mózgu i nerkach. U narażonych samic zaobserwowano 2- lub 3-krotnie większą zawartość srebra w nerkach w porównaniu z samcami (6).

Z kolei po 10-dniowym narażeniu myszy inhalacyjnie na cząstki (5±2 nm) oszacowano, że ok. 4% dawki zostało zdeponowane w płucach. Inaczej niż u szczu-

rów, u myszy w tkankach, takich jak serce, wątroba i mózg, zawartość srebra była poniżej oznaczalności metody (7).

Po narażeniu drogą pokarmową nanocząstki srebra mogą wchłaniać się z jelit do krwi i dalej do innych narządów. U szczurów, którym przez 28 dni podawano nanocząstki srebra (60 nm) przez zgłębnik, srebro wykryto we krwi, żołądku, mózgu, wątrobie, nerkach, płucach i jądrach, co wskazuje na układowe rozmieszczenie srebra. Ilość odłożonego srebra w nerkach była, podobnie jak w przypadku eksperymentów inhalacyjnych, 2-krotnie większa u samic niż u samców (8).

Po 28-dniowym eksperymencie, w którym nanocząstki srebra (10 nm i 25 nm) podawano szczurom drogą pokarmową, badano rozmieszczenie cząstek w poszczególnych narządach oraz ich klirens w okresie 4 miesięcy od zakończenia narażenia. Wielkość cząstek nie wpływała na ich rozmieszczenie, wykryto je w wątrobie, śledzionie, nerkach, mózgu, jajnikach i jądrach. Zaobserwowano, że w czasie 4 miesięcy zawartość srebra w poszczególnych narządach zmniejszała się. Jedynie w mózgu i jądrach, niezależnie od wielkości cząstek, poziom srebra nie uległ zmianie. Wyniki wskazują, że biologiczne bariery krew–mózg i krew–jądra są przeszkodą w oczyszczaniu tych narządów z cząstek srebra (9).

U szczurów eksponowanych przez 90 dni drogą pokarmową na nanocząstki srebra (60 nm) zaobserwowano akumulację cząstek w nerkach (u samic 2-krotnie wyższy poziom), pęcherzu moczowym i nadnerczach (10).

Z badań porównawczych działania nanocząstek i jonów srebra wynika, że jony szybciej ulegają wchłonięciu i wywołują więcej zmian w organizmie niż nanocząstki tego metalu. Nanocząstki srebra (14 ± 4 nm) oraz octan srebra podawano szczurom przez zgłębnik przez 28 dni. Rozmieszczenie obu form srebra (nanocząstek i jonów) było podobne, choć większą zawartość srebra wykryto u zwierząt narażanych na jony tego metalu. Najwyższą zawartość srebra poza jelitami odnotowano w nerkach i w wątrobie, mniejszą w płucach i mózgu (11).

Badania dotyczące wchłaniania nanocząstek srebra przez skórę nie są jednoznaczne. Po 14-dniowej aplikacji zawiesiny nanocząstek srebra (20 nm i 50 nm) na skórę świń nanocząstki wykryto jedynie w warstwie rogowej naskórki (12). W eksperymentach prowadzonych na świnkach morskich zaobserwowano objawy świadczące o wchłanianiu się nanocząstek srebra przez skórę. Zwierzęta narażano, nakładając roztwór nanosrebra (100 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ i 10 000 $\mu\text{g/ml}$) 5 dni

w tygodniu przez 13 tygodni, i odnotowano zależność między wielkością narażenia a poziomem nanocząstek srebra w poszczególnych tkankach ($p < 0,05$). Zawartość w poszczególnych tkankach uszeregowano następująco: nerki > tkanka mięśniowa > tkanka kostna > skóra > wątroba > serce > śledziona (13).

Nanocząstki, które dotarły do krwiobiegu, mogą gromadzić się w różnych narządach. U szczurów, którym nanocząstki srebra (20 lub 80 nm) podawano dożylnie przez 5 kolejnych dni, cząstki wykryto w płucach, wątrobie i śledzionie. Większe cząstki były obecne głównie w śledzionie, podczas gdy mniejsze – w wątrobie (14). W podobnym eksperymencie przeprowadzonym na myszach, które otrzymywały nanocząstki (12 nm) w czasie 24 godz. od narażenia, również wykazano obecność srebra w śledzionie i wątrobie (15).

Rozmieszczenie nanocząstek w poszczególnych narządach może być zróżnicowane w zależności od czasu obserwacji po narażeniu. Po dożylnym wstrzyknięciu szczurom rasy Wistar jednorazowo nanocząstek srebra (20 nm) w dawce 5 mg/kg m.c. materiał biologiczny pobierano po upływie 24 godz., 7 lub 28 dni. Największe stężenie nanocząstek w próbkach pobranych 24 godz. od podania odnotowano w wątrobie, po 7 dniach wysoki poziom srebra zaobserwowano w płucach i śledzionie, natomiast w nerkach i mózgu stężenie srebra wzrastało w czasie obserwacji i maksymalną wartość osiągnęło 28 dni po wstrzyknięciu (16).

Po jednokrotnym, podskórnym podaniu nanocząstek srebra (50–90 nm) szczurom w ich narządach wykryto 15% podanej dawki (62,8 mg/kg m.c.). Zawartość srebra w różnych narządach zwiększała się do poziomu maksymalnego, który został osiągnięty po 12 tygodniach i utrzymywał się do 24 tygodni. Srebro kumulowało się w znacznym stopniu w nerkach, wątrobie, śledzionie, mózgu, płucach i krwi, obecne było również w sercu, macicy, jajnikach i nadnerczach (17).

Nie ma informacji na temat przemian metabolicznych srebra. Srebro wydalone jest głównie z kałem, ale także z moczem. Po 28-dniowym narażeniu szczurów przez zgłębnik dożołądkowo na nanocząstki srebra (14 ± 4 nm) większa część dawki ($63 \pm 23\%$) została wydalona z kałem, natomiast w moczu wykryto niewielkie ilości ($> 0,1\%$) (11). Zawartość srebra była również znacząco wyższa w kale niż w moczu po okresie 8 tygodni od jednokrotnego podskórnego podania nanocząstek srebra (50–90 nm) szczurom (17). Podobne ilości srebra w moczu i w kale narażanych zwierząt wykryto natomiast u szczurów, którym wstrzyknięto dożylnie jednorazowo nanocząstki srebra (20 nm) (16).

Działanie drażniące i uczulające

Nanocząstki srebra mogą wywoływać lekkie podrażnienie oczu i skóry, choć wyniki badań nie są jednoznaczne. Mogą także działać jak łagodny alergen na skórę. Nie ma danych na temat uczulającego działania nanocząstek srebra na drogi oddechowe.

W badaniach przeprowadzonych zgodnie z wytycznymi TG 404 i 405 (Test Guideline – TG) Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (Organization Economic Cooperation and Development – OECD) nanocząstki srebra nie działały drażniaco na skórę świnek morskich (18), jednak w przypadku królików wyniki nie były jednoznaczne. U królików, którym nakładano nanocząstki wielkości 10–20 nm, wystąpiły objawy podrażnienia skóry (rumień i obrzęk) (19). Z kolei w innym eksperymencie u królików nie zaobserwowano objawów drażniącego działania nanosrebra na skórę ani oczu (20). U świnek morskich zaobserwowano natomiast przekrwienie spojówek, które ustępowało po 72 godz. od podania srebra koloidalnego (10–20 nm) do worka spojówkowego, co mogło wskazywać na przejściowe działanie drażniące (18).

Nie zaobserwowano żadnych objawów podrażnienia na skórze świń, którym nanoszono zawiesinę nanocząstek srebra (20 i 50 nm) przez 14 dni, jednak badania mikroskopowe (mikroskop optyczny) i ultrastrukturalne (elektronowy mikroskop transmisyjny, transmission electron microscope – TEM) wykazały występowanie ognisk zapalnych (12).

W badaniu oceniającym działanie uczulające na skórę u jednej z 20 świnek morskich zaobserwowano niewielki, niejednorodny rumień w teście maksymalizacji (OECD TG 406), występujący w czasie 24 i 48 godz. od narażenia na nanocząstki srebra (10 nm). Nie można więc wykluczyć potencjalnego uczulającego działania nanocząstek srebra na skórę (20).

Narażenie drogą inhalacyjną

Nie zaobserwowano skutków działania nanocząstek srebra w narażeniu ostrym. W przewlekłych eksperymentach na zwierzętach zaobserwowano głównie wpływ na płuca i wątrobę.

Po 4-godzinnym inhalacyjnym narażeniu na nanocząstki srebra (18–20 nm) nie zaobserwowano zgonów szczurów ani zmian przyrostu masy ciała i funkcjonowania płuc po 2 tygodniach obserwacji. Zgodnie z wynikami badań mediana stężenia śmiertelnego (lethal concentration – LC_{50}) w narażeniu inhalacyjnym znajduje się powyżej najwyższego zastosowanego stężenia, tj. $LC_{50} > 750 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($3,08 \times 10^6$ cząstek/ cm^3) (21).

Po narażeniu szczurów na nanocząstki srebra (15 nm) drogą inhalacyjną przez 4 tygodnie nie stwierdzono zmian w przyroście masy ciała, parametrach hematologicznych ani biochemicznych (5). W badaniu histopatologicznym zaobserwowano natomiast nieistotne statystycznie zmiany w wątrobie (wakuolizacja cytoplazmatyczna i martwica hepatocytów). W pozostałych badanych narządach nie odnotowano zmian. Autorzy cytowanego badania sugerują, że narażenie zawodowe na nanocząstki srebra poniżej $0,1 \text{ mg}/\text{m}^3$ nie powinno wywoływać żadnych znaczących skutków dla zdrowia (5).

Sung i wsp. (22) nie zaobserwowali zależnych od stężenia zmian w przyroście masy ciała, masy narządów wewnętrznych ani parametrów hematologicznych u szczurów, które narażano przez 90 dni inhalacyjnie na cząstki srebra (20 nm). Zanotowali natomiast, zależne od stężenia, obniżenie wartości parametrów oddechowych, takich jak objętość oddechowca czy wentylacja minutowa, wraz ze zmianami histopatologicznymi w płucach (mieszany naciek komórek zapalnych, przewlekłe zapalenie pęcherzyków płucnych wraz ze zgrubieniem ścian pęcherzyków płucnych i powstaniem niewielkich ziarnistości).

Ta sama grupa badaczy w innym opracowaniu (6) poza skutkami narażenia na płuca u szczurów opisuje działanie nanocząstek na wątrobę. Wyniki wykazały zwiększoną częstość przypadków rozrostu kanalików żółciowych w wątrobie. Nie odnotowano natomiast znaczących zmian czynności nerek. Badacze określili płuca i wątrobę jako narządy krytyczne. Oszacowali oni NOAEL nanosrebra (najwyższy poziom bez obserwowanego działania toksycznego – no observable adverse effect level) równy $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$, w oparciu o znaczący rozrost kanalików żółciowych, przewlekłe zapalenie pęcherzyków płucnych i nagromadzenie makrofagów w płucach u szczurów obu płci oraz agregację erytrocytów u samic.

W kolejnym badaniu inhalacyjnym szczury narażano na cząstki srebra (14–15 nm) przez 90 dni (23). Po 12-tygodniowej obserwacji od ustania narażenia ustalono wartość $117 \text{ mg}/\text{m}^3$ jako najwyższe stężenie, przy którym nie obserwowano działania toksycznego (no observable adverse effect concentration – NOAEC), biorąc pod uwagę zmiany funkcjonowania płuc (podobne jak we wcześniejszych badaniach (22,6)). Song i wsp. zastosowali wartość $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ jako NOAEC dla zwierząt do wyprowadzenia wartości NOAEC dla ludzi przy użyciu modelu MPPD (Multiple-Path Particle Dosimetry Model). W wyniku tego uzyskali $47 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dla osób wykonujących ciężką pracę fizyczną oraz $23 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dla osób pracujących lekko (23).

Tabela 1. Wybrane badania toksykologiczne na zwierzętach narażanych drogą inhalacyjną na nanosrebro
Table 1. Selected toxicological experiments on animals exposed to nanosilver via inhalation

Wielkość cząstek nanosrebra Particle size of nanosilver [nm]	Gatunek badanych zwierząt Species of tested animals	Czas narażenia Duration of exposure	Stężenie nanosrebra Nanosilver concentration	Wynik Effects	Piśmiennictwo Reference
18–20	szczury Sprague-Dawley / Sprague-Dawley rats	4 godz. / 4 h	$\mu\text{g}/\text{m}^3$ [cząstki/ cm^3] / [particles/ cm^3]: 76 [0,94×10 ⁶] 135 [1,64×10 ⁶] 750 [3,08×10 ⁶]	brak zgonów zwierząt, zmian przyrostu masy ciała i funkcjonowania płuc po 2 tygodniach obserwacji, $\text{LC}_{50} > 750 \mu\text{g}/\text{m}^3$ / no death of animals, no changes in body weight gain and lung function after 2 weeks of observation, $\text{LC}_{50} > 750 \mu\text{g}/\text{m}^3$	21
5	myszy C57Bl/6 / mice C57Bl/6	10 dni, 4 godz./dzień, 5 dni/tydzień / 10 days, 4 h/day, 5 days/week	3,3 mg/m ³	łagodny stan zapalny w płucach, istotny wzrost całkowitej liczby komórek w BALF i neutrofilii, brak zmian aktywności LDH i poziomu białka całkowitego / minimal pulmonary inflammation, significant increase in the total number of cells in BALF, and neutrophils, no change in LDH activity and total protein	7
15	szczury Sprague-Dawley / Sprague-Dawley rats	4 tygodnie, 6 godz./dzień, 5 dni/tydzień / 4 weeks, 6 h/day, 5 days/week	mg/m^3 [cząstki/ cm^3] / [particles/ cm^3]: 0,5–61 [1,73×10 ⁴ –1,32×10 ⁶]	brak zmian w przyroście masy ciała, parametrach hematologicznych i biochemicznych; histopatologiczne zmiany w wątrobie (wakuolizacja cytoplazmatyczna i martwica hepatocytów) nieistotnie statystycznie; brak zmian w płucach, mózgu i parametrach hematologicznych / no changes in body weight gain, hematological and biochemical parameters; histopathological changes in the liver (cytoplasmic vacuolization and hepatic necrosis) statistically insignificant; no changes in the lungs, brain, hematological values	5
20	szczury Sprague-Dawley / Sprague-Dawley rats	90 dni, 6 godz./dzień, 5 dni/tydzień / 90 days, 6 h/day, 5 days/week	mg/m^3 [cząstki/ cm^3] / [particles/ cm^3]: 49 [0,6×10 ⁶], 133 [1,4×10 ⁶], 515 [3,0×10 ⁶]	brak zmian w przyroście masy ciała, narządów wewnętrznych, parametrów hematologicznych; zależna od stężenia redukcja parametrów oddechowych (objętość oddechu, wentylacja minutowa); zmiany histopatologiczne w płucach (mieszany naciek komórek zapalnych, przewlekłe zapalenie pęcherzyków płucnych, w tym zgrubienie ścian pęcherzyków płucnych i obecne ziarnistości); w wątrobie rozrost kanalików żółciowych / no changes in body weight gain, organ weight, hematological values; dose-dependent reduction in respiratory parameters (tidal volume, minute ventilation); histopathological changes in the lungs (mixed inflammatory cell infiltrate and chronic alveolar inflammation, including thickened alveolar walls and small granulomatous lesions); in the liver, bile-duct hyperplasia	6,22

LC_{50} – mediana stężenia śmiertelnego / median lethal concentration, BALF – popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe / bronchoalveolar lavage fluid, LDH – dehydrogenaza mleczanowa / lactate dehydrogenase.

U myszy narażanych inhalacyjnie na nanocząstki srebra (5 nm) przez 10 dni wykazano jedynie łagodny stan zapalny w płucach (7). Odnotowano statystycznie istotny wzrost całkowitej liczby komórek w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (bronchoalveolar lavage fluid – BALF) oraz neutrofilii, natomiast nie zaobserwowano różnic w aktywności dehydrogenazy mleczanowej (lactate dehydrogenase – LDH) i poziomu białka całkowitego między grupami (7). Efekty toksyczne w następstwie narażenia drogą oddechową zestawiono w tabeli 1.

Narażenie drogą pokarmową

Nanocząstki srebra podawane drogą pokarmową wywołują odpowiedź zapalną w narażeniu przedłużonym. W następstwie narażenia podprzewlekłego i przewlekłego u zwierząt zaobserwowano zmiany w śluzówce jelit, a także szkodliwe działanie na wątrobę i nerki. W badaniach ostrej toksyczności, przeprowadzonych według wytycznych OECD TG 423 na szczurach narażanych na nanocząstki srebra (10 nm), nie zaobserwowano zgonów zwierząt ani żadnych objawów toksyczności przy dawce 2000 mg/kg m.c. (18). Oszacowano więc, że mediana dawki śmiertelnej (LD_{50}) dla szczura drogą pokarmową przekracza 2000 mg/kg m.c. (18). W innym badaniu (wg OECD TG 425), przeprowadzonym na myszach, nie zaobserwowano żadnych negatywnych skutków narażenia na nanocząstki srebra (10–20 nm) w dawce 5000 mg/kg m.c. ($LD_{50} > 5000$ mg/kg m.c.) (19). Z kolei po podaniu myszom dożołądkowo nanocząstek srebra (13 nm) w dawce 2,5 g/zwierzę zaobserwowano ogniska limfocytów w wątrobie i jelitach, wskazujące na indukcję stanu zapalnego, oraz niewielkie, niespecyficzne zmiany w sercu i śledzionie 3 dni po zakończeniu ekspozycji. Nie zanotowano zgonów zwierząt (24).

Cząstki srebra (22 nm, 42 nm, 71 nm lub 323 nm) podawano myszom przez zgłębnik w dawce 1 mg/kg m.c./dzień przez 14 dni (25). Nanocząstki (22–71 nm) docierały do krwi i innych organów (mózgu, płuc, wątroby, nerek i jąder), wywołując odpowiedź zapalną. U myszy, którym podawano większe cząstki (323 nm) nie wykryto srebra w tkankach. Przyrost masy ciała i względna masa poszczególnych narządów nie uległy zmianie w żadnej z narażanych grup zwierząt.

Kontynuując badania, podano myszom nanocząstki (42 nm) w dawkach: 0,25; 0,5 lub 1 mg/kg m.c. przez 28 dni (25). U zwierząt otrzymujących najwyższą dawkę odnotowano wzrost aktywności enzymów – fosfatazy alkalicznej (alkaline phosphatase – ALP), aminotransferazy alaninowej (alanine transferase – ALAT)

i asparaginianowej (asparagine transferase – AspAT), co wskazuje na hepatotoksyczne działanie nanosrebra. U wszystkich narażanych zwierząt zaobserwowano zwiększenie poziomu cytokin prozapalnych zależnie od zastosowanej dawki. U myszy eksponowanych na najwyższą dawkę wystąpiły ponadto zmiany histopatologiczne w nerkach (nie zaobserwowano ich w wątrobie ani jelitach). Biorąc pod uwagę działanie hepatotoksyczne i zmiany histopatologiczne w nerkach, które obserwowano w grupie zwierząt otrzymujących nanocząstki srebra w dawce 1 mg/kg m.c., NOAEL dla tych efektów oszacowano na poziomie 0,5 mg/kg m.c./dzień (25).

W kolejnym badaniu szczury eksponowano drogą pokarmową na nanocząstki srebra (60 nm) przez 28 dni (OECD TG 407) (26). Obecność nanocząstek srebra wykryto w jelitach narażanych zwierząt, zaobserwowano także zmiany w strukturze histologicznej i właściwościach śluzówki jelit. Nanocząstki srebra odkładały się w jelicie cienkim i grubym w zależności od zastosowanej dawki. Nie zaobserwowano natomiast negatywnych skutków zdrowotnych u zwierząt (26).

W badaniu innych autorów nanocząstki srebra (14 ± 4 nm) i octan srebra podawano szczurom przez zgłębnik w dziennej dawce 9 mg/kg m.c. przez 28 dni (27). Szczury badano pod względem klinicznym, parametrów hematologicznych i biochemicznych, masy narządów oraz zmian mikro- i makroskopowych. Nie zaobserwowano żadnych zmian patologicznych wśród zwierząt, którym podawano srebro w postaci nanocząstek. Z kolei u szczurów, które otrzymywały jony srebra, zaobserwowano zmniejszony przyrost masy ciała, zmniejszenie względnej i bezwzględnej masy grasicy, a także zmiany w parametrach biochemicznych – zwiększenie aktywności fosfatazy alkalicznej i zmniejszenie stężenia mocznika w surowicy. Dawka 9 mg/kg m.c./dzień nanocząstek srebra nie wpływała więc negatywnie, podczas gdy ta sama dawka jonów srebra wywoływała patologiczne zmiany u szczurów (27).

W badaniu, w którym szczury eksponowano drogą pokarmową (przez zgłębnik) na nanocząstki srebra (60 nm) przez 28 dni (OECD TG 407), nie zaobserwowano zmian w przyroście masy ciała zwierząt (8). W grupach otrzymujących średnią i najwyższą dawkę (300, 1000 mg/kg m.c.) odnotowano zwiększenie aktywności fosfatazy alkalicznej i poziomu cholesterolu we krwi, które mogą być oznaką zmian w wątrobie. W grupie otrzymującej najniższą dawkę (30 mg/kg m.c.) nie zaobserwowano żadnych negatywnych efektów, dlatego tę dawkę uznano za NOAEL (8).

Tabela 2. Wybrane badania toksykologiczne na zwierzętach narażanych na nanosrebro drogą pokarmową (przez zgłębnik)
Table 2. Selected toxicological experiments on animals exposed to nanosilver via oral route

Wielkość cząstek nanosrebra Particle size of nanosilver [nm]	Gatunek badanych zwierząt Species of tested animals	Czas narażenia Duration of exposure	Stężenie nanosrebra Nanosilver concentration	Wynik Effects	Piśmiennictwo Reference
10	szczury / rats	1 dawka / dose	2 000 mg/kg m.c. / mg/kg b.w.	bez zgonów zwierząt i objawów toksyczności, LD ₅₀ > 2 000 mg/kg m.c. / no death, no toxicity of animals, LD ₅₀ > 2 000 mg/kg b.w.	18
10–20	mysz / mice	1 dawka / dose	5 000 mg/kg m.c. / mg/kg b.w.	bez negatywnych skutków narażenia po zastosowanej dawce 5 000 mg/kg m.c., LD ₅₀ > 5 000 mg/kg m.c. / no adverse effects of exposure after a dose of 5 000 mg/kg b.w., LD ₅₀ > 5 000 mg/kg b.w.	19
13	mysz / mice	1 dawka, 3 dni obserwacji / / 1 dose, 3 day-observation	2,5 g/mysz / 2.5 g/mouse	ogniska limfocytów w wątrobie i jelitach (stan zapalny); niewielkie, niespecyficzne zmiany w sercu i śledzionie; bez zgonów zwierząt / focal lymphocyte infiltration in the liver and intestine (inflammation); small, non-specific changes in the heart and spleen; no deaths of animals	24
22	mysz ICR / mice ICR	14 dni / days	1 mg/kg m.c./dzień / / 1 mg/kg b.w./day	odpowiedź zapalna w płucach, wątrobie, nerkach, jądrach i mózgu; bez zmian przyrostu masy ciała i masy względnej narządów / inflammatory response in the lung, liver, kidney, testes and brain; no changes in body weight gain and organ relative weights	25
42	mysz ICR / mice ICR	28 dni / days	0,25; 0,5 lub 1 mg/kg m.c. / / 0,25; 0,5 or 1 mg/kg b.w.	najwyższa dawka – wzrost aktywności enzymów: ALP, ALAT i AspAT (działanie hepatotoksyczne); zmiany histopatologiczne w nerkach, brak zmian w wątrobie i jelitach; u wszystkich narażonych zwierząt (proporcjonalnie do dawki) zwiększenie poziomu cytokin prozapalnych / the highest dose – increase in the activity of enzymes ALP, ALAT and AspAT (hepatotoxic effect); histopathological changes in the kidney, no changes in the liver and intestine; in all exposed animals (proportional to the dose) there was increase in the level of proinflammatory cytokines	26
14±4	szczur Sprague-Dawley / / Sprague-Dawley rats	28 dni / days	30, 300 lub 1 000 mg/kg m.c. / / 30, 300 or 1 000 mg/kg b.w.	zmiany w strukturze histologicznej i właściwościach śluzówki jelit; nanocząstki srebra wykryto w jelicie cienkim i grubym w zależności od zastosowanej dawki / histological changes in the structure and properties of the intestinal mucous; silver nanoparticles were detected in small and large intestines, depending on the dose	27
60	szczur Wistar / Wistar rats	28 dni / days	9 mg/kg m.c. / / 9 mg/kg b.w.	bez zmian parametrów hematologicznych i biochemicznych, zmian masy narządów oraz zmian mikro- i makroskopowych / no changes in hematological and biochemical parameters, organ weight, and no micro- and macroscopic pathological changes	8
	szczur Sprague-Dawley / / Sprague-Dawley rats	28 dni / days	30, 300 lub 1 000 mg/kg m.c. / / 30, 300 or 1 000 mg/kg b.w.	zwiększenie aktywności ALP i poziomu cholesterolu we krwi; NOAEL – 30 mg/kg m.c. / the increase in ALP activity and cholesterol levels in the blood; NOAEL – 30 mg/kg b.w.	

Tabela 2. Wybrane badania toksykologiczne na zwierzętach narażanych na nanosrebro drogą pokarmową (przez zgłębnik) – cd.
Table 2. Selected toxicological experiments on animals exposed to nanosilver via oral route – cont.

Wielkość cząstek nanosrebra Particle size of nanosilver [nm]	Gatunek badanych zwierząt Species of tested animals	Czas narażenia Duration of exposure	Stężenie nanosrebra Nanosilver concentration	Wymik Effects	Piśmiennictwo Reference
60	szczury F344 / rats F344	90 dni / days	30, 125 lub 500 mg/kg m.c. / / 30, 125 or 500 mg/kg b.w	znaczące statystycznie zmniejszenie przyrostu masy ciała u samców, zwiększenie aktywności ALP i poziomu cholesterolu we krwi (125, 500 mg/kg m.c.), zwiększenie częstości hiperplazji przewodów żółciowych, zmiany martwicze, zwłóknieniowe i/lub pigmentacyjne (stwierdzone histopatologicznie); NOAEL – 30 mg/kg m.c.; LOAEL – 125 mg/kg m.c. (narząd krytyczny: wątroba) / statistically significant decrease in body weight gain in males, increased ALP activity and blood cholesterol levels (125, 500 mg/kg), higher incidence of bile-duct hyperplasia, necrosis, fibrosis and/or pigmentation (histopathologically confirmed); NOAEL – 30 mg/kg m.c.; LOAEL – 125 mg/kg b.w. (target organ: liver)	28

LD₅₀ – mediana dawki śmiertelnej / median lethal dose, ALP – fosfataza alkaliczna / alkaline phosphatase, ALAT – aminotransferaza alaninowa / alanine aminotransferase, AsPAT – aminotransferaza asparaginianowa / aspartate aminotransferase, NOAEL – najwyższy poziom bez obserwowanego działania toksycznego / no observable adverse effect level, LOAEL – najniższy poziom działania toksycznego / lowest-observed-adverse-effect level.

Również dożołądkowo przez zgłębnik nanocząstki srebra (60 nm, w dawkach 30, 125 lub 500 mg/kg m.c.) w CMC (carboxymethyl cellulose – karboksymetyloceluloza) podawano w 90-dniowym eksperymencie na szczurach F344 (OECD TG 408) (28). U narażanych samców odnotowano znaczące statystycznie zmniejszenie przyrostu masy ciała, mimo braku różnic w ilości przyjmowanego pokarmu i wody. Zaobserwowano zwiększenie aktywności fosfatazy alkalicznej i poziomu cholesterolu we krwi. Zmiany te wzrastały wraz z zastosowaną dawką, co wskazuje, że narażenie na dawki powyżej 125 mg/kg m.c. może wywołać niewielkie uszkodzenie wątroby. Badania histopatologiczne ujawniły hiperplazję przewodów żółciowych, a u niektórych zwierząt zmiany martwicze, zwłóknieniowe i/lub pigmentacyjne. Uznając wątrobę za narząd krytyczny, NOAEL oszacowano na poziomie 30 mg/kg m.c., a – LOAEL – 125 mg/kg m.c. (28). W tabeli 2. zestawiono efekty toksyczne u zwierząt narażanych drogą pokarmową.

Narażenie drogą dermalną

Badania przeprowadzone na zwierzętach eksperymentalnych narażanych na nanocząstki srebra, aplikowane na nieuszkodzoną skórę, nie są jednoznaczne. Nanocząstki srebra mogą działać drażniąco na skórę oraz prowadzić do zmian nie tylko w obrębie skóry, ale także w wątrobie, śledzionie, tkance mięśniowej i kostnej, a także w sercu oraz mózgu. Nie wszystkie jednak wyniki wskazują na szkodliwe działanie tych nanocząstek.

W badaniu Maneewattanapinyo i wsp. (2011) drogą dermalną szczury narażano na nanocząstki srebra (10 nm) według wytycznych OECD TG 402 (18). Nie zaobserwowano zgonów szczurów ani symptomów toksyczności przy dawce 2000 mg/kg m.c. (LD₅₀ > 2000 mg/kg m.c.). Również sekcja nie wykazała żadnych poważnych zmian patologicznych (18). W innym badaniu (OECD TG 434) nanocząstki srebra (10–20 nm) w zawiesinie w ilości 2 ml naniesiono na powierzchnię 7×10 cm² ogolonej skóry świnek morskich i pozostawiono pod przykryciem na 24 godziny. Nie zaobserwowano żadnych zmian toksycznych ani zgonów w czasie 14 dni obserwacji po narażeniu na srebro w stężeniach 3 ppm, 50 ppm i 100 000 ppm (19).

Korani i wsp. (2011) przeprowadzili badania toksyczności ostrej i podprzewlekłej nanocząstek srebra podawanych na skórę świnkom morskim (29). W pierwszym badaniu zwierzęta narażano, nakładając jednorazowo roztwór 1000 µg/ml i 10 000 µg/ml.

Działanie toksyczne oceniano w oparciu o parametry kliniczne i histopatologiczne. U zwierząt nie zaobserwowano różnic w masie poszczególnych narządów ani zmian makroskopowych. Wystąpiły natomiast, zależne od stężenia, zmiany histopatologiczne w obrębie skóry. Zmniejszoną grubość naskórka i warstwy brodawkowej skóry właściwej (w stopniu zależnym od stężenia) zaobserwowano w obu grupach. W grupie eksponowanej na niższe stężenie włókna kolagenowe były regularne, w narażanej na wyższe stężenie – nieregularne.

W następnym eksperymencie Korani i wsp. (2011) narażali świnki morskie na nanocząstki srebra 5 dni w tygodniu przez 13 tygodni, nakładając roztwór 100 µg/ml, 1000 µg/ml i 10 000 µg/ml (29). Działanie toksyczne oceniano w oparciu o parametry kliniczne i histopatologiczne. We wszystkich badanych grupach narażanych zwierząt wystąpiły objawy stanu zapalnego skóry. Zmiany histopatologiczne w obrębie skóry nasilały się wraz z zastosowaną dawką (zmniejszona grubość naskórka i warstwy brodawkowej skóry właściwej, zwiększenie liczby komórek Langerhansa). Zmiany w wątrobie obejmowały zwyrodnienie hepatocytów, nadczynność komórek Kupfera i martwicę, występującą jedynie przy najwyższej dawce. W śledzionie zaobserwowano zmiany zapalne oraz, zależnie od dawki, cieńszą warstwę miazgi czerwonej i zanik miazgi białej (29).

W kolejnych pracach dotyczących efektów podprzewlekłego narażenia dermalnego świnek morskich na nanocząstki srebra (warunki narażenia, jak opisano powyżej) Korani i wsp. (2012) zaobserwowali zmiany histopatologiczne w innych narządach. Autorzy zaobserwowali, zależnie od stężenia, zmiany w tkance mięśniowej (miopatie, miofagocytoza) (30), a także tkance kostnej (nieprawidłowości w szpiku), sercu (deformacja kardiocytów, zapalenie) i nerkach (zwyrodnienie kanałków nerkowych) (13).

Kim i wsp. (2013) narażali króliki drogą dermalną na nanocząstki srebra (10, 20 lub 30 nm) w dawce 4 mg/zwierzę (zgodnie z wytycznymi OECD TG 404) przez 1 min, 1 godzinę lub 4 godziny. Następnie zwierzęta obserwowano przez 14 dni. Jedynie po narażeniu 4-godzinnym zaobserwowano nieprawidłowości u królików. Badania histopatologiczne tych zwierząt wykazały zmiany w obrębie skóry, wątroby, śledziony, układu sercowo-naczyniowego i mózgu. U narażanych zwierząt zaobserwowano nadmierne rogowacenie, akantozę, brodawkowatość naskórka, zwłóknienie, przekrwienie, obrzęk wewnątrzkomórkowy i hialinizację kolagenu w skórze właściwej. W wątrobie wystąpiły:

martwica okołozrazikowa i strefy środkowej zrazików, nacieki zapalne z komórek jednojądrzastych w przestrzeniach wrotnych, stłuszczenie i przekrwienie żyły głównej. Zmiany w śledzionie obejmowały przekrwienie miazgi czerwonej, nadreaktywność miazgi białej i zwyrodnienie szkliste. Ponadto zaobserwowano zwyrodnienie tłuszczowe w niektórych komórkach układu sercowo-naczyniowego, a także pyknozę neuronów piramidalnych w korze mózgowej, glejozę i przekrwienie opon mózgowych (20).

Działanie mutagenne i genotoksyczne

W badaniu Li i wsp. (2012) nie zaobserwowano mutagennego działania nanocząstek srebra (5 nm) wobec 5 szczepów bakterii *Salmonella enterica* ssp. I ser. Typhimurium w teście Ames (31). Nie odnotowano również istotnej statystycznie różnicy w częstości występowania mutacji w komórkach embrjonalnych, fibroblastach i makrofagach, w badaniach *in vitro* prowadzonych na komórkach myszy traktowanych nanocząstkami srebra (20 nm i 80 nm) (32).

Z kolei pozytywne wyniki badań genotoksycznych uzyskano w badaniach *in vitro* w teście mikrojądrowym i kometowym (32). Uszkodzenia DNA komórek indukowane przez nanocząstki srebra powstają prawdopodobnie wskutek generowania reaktywnych form tlenu. Wyniki tego typu testów w badaniach prowadzonych *in vivo* nie są jednoznaczne. Odmiennie rezultaty eksperymentów *in vitro* i *in vivo* wskazują na działanie mechanizmów antyoksydacyjnych, niwelujących genotoksyczne działanie reaktywnych form tlenu (32).

W badaniach na komórkach limfoblastoidalnych TK6, przeprowadzonych przez Tavares i wsp. (2012), uzyskano wyniki pozytywne w teście mikrojądrowym (OECD TG 487) (33). Częstość powstawania mikrojąder była statystycznie większa w komórkach traktowanych nanocząstkami srebra (5 nm) w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Zmiany te były zależne od zastosowanej dawki (10–30 µg/ml) (31). Genotoksyczność nanocząstek srebra (5–45 nm) badano także testem kometowym na ludzkich i mysich komórkach krwi obwodowej. Uszkodzenia DNA zaobserwowano we wszystkich stosowanych dawkach, jednak częstość tych uszkodzeń zmniejszała się wraz z czasem, co świadczy o działaniu procesów naprawczych (33).

Badania *in vivo*, przeprowadzone na myszach otrzymujących nanocząstki srebra dootrzewnowo, nie wykazały różnic statystycznie istotnych w wynikach testu kometowego między narażanymi a nienarażanymi zwierzętami (33). Nie zaobserwowano też

znaczących efektów w teście mikrojądrowym, który przeprowadzono na komórkach szpiku kostnego i erytrocytach polichromatycznych (OECD TG 474) szczurów narażanych na nanocząstki srebra (60 nm) inhalacyjnie oraz przez zgłębnik przez 28 dni w dawkach: 30–1000 mg/kg m.c. Nie ma informacji na temat obecności nanocząstek srebra w komórkach szpiku (8).

Nie wykazano działania genotoksycznego również u szczurów inhalowanych nanocząstkami srebra (18 nm) 6 godz./dzień przez 90 dni (34). Nanocząstki nie indukowały powstawania mikrojąder w polichromatycznych erytrocytach ani nie wywoływały zwiększenia liczby polichromatycznych erytrocytów w stosunku do erytrocytów normochromatycznych w szpiku kostnym (34). Odmienne wyniki uzyskano w badaniu inhalacyjnym na szczurach, którym podawano nanocząstki srebra (14–15 nm) przez 90 dni i u których następnie badano poziom uszkodzeń DNA w komórkach płuc testem kometowym (35). Wykazano znaczący statystycznie ($p < 0,01$) wzrost częstości pęknięć nici DNA w komórkach płuc szczurów narażanych na najwyższe stężenie ($381 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) (35).

Wpływ na rozrodczość

Melnick i wsp. (2013) zaobserwowali, że nanocząstki srebra mogą pokonywać barierę krew–łożysko oraz przedostawać się do płodów narażanych matek i mleka karmiącej matki (36). W eksperymencie z zastosowaniem oznakowanych radioaktywnie nanocząstek srebra (ok. 35 nm), podawanych przez zgłębnik ciężarnym lub karmiącym samicom szczura w dawce 1,69–2,21 mg/kg m.c., średni poziom kumulacji srebra w organizmach płodów wynosił 0,085–0,147% podanej dawki. Ilość ta była porównywalna z zawartością w tkankach matki. Średni poziom zawartości srebra w mleku narażanych samic wyniósł $1,94 \pm 0,29\%$, z czego nie mniej niż 25% zostało wchłonięte przez układ pokarmowy młodych, karmionych przez narażane matki (36).

Mahabady (37) badał teratogenność nanocząstek srebra (nie podano średnicy) u płodów po podaniu ciężarnym matkom szczura dootrzewnowo nanosrebra w dawce 0,4 mg/kg m.c. lub 0,8 mg/kg m.c. w 8. lub 9. dniu ciąży. U płodów zaobserwowano znaczące obniżenie masy i długości ciała. U wszystkich narażanych samic w porównaniu z kontrolą zaobserwowano zmniejszenie masy, objętości i szerokości łożysk. Nie odnotowano natomiast żadnych makroskopowych nieprawidłowości ani wad szkieletowych u płodów. Nie opisano też objawów toksyczności matczynej (37).

W badaniu przeprowadzonym przez Austin i wsp. (2012) na ciężarnych myszach, którym podano dożylnie nanocząstki srebra (50 nm) w 7., 8. lub 9. dniu ciąży w dawce: 35 lub 66 $\mu\text{g}/\text{mysz}$ obserwowano rozmieszczenie srebra w organizmach matek i płodów (38). Stężenie srebra (nanocząstek i agregatów) we wszystkich badanych narządach i tkankach u matek było wyższe niż u zwierząt nienarażanych. Zaobserwowano, że nanocząstki pokonywały barierę krew–łożysko, jednak zawartość srebra w płodach nie była znacząca. Nie zaobserwowano również nieprawidłowości rozwojowych (38).

Gromadzka-Ostrowska i wsp. (2012) wykazali, że nanocząstki srebra mogą wpływać na spermatogenezę u szczurów (39). Po dożylnym wstrzyknięciu nanocząstek srebra (20 nm) samcom szczura zaobserwowano – zależnie od dawki (5 lub 10 mg/kg m.c.) i długości trwania narażenia (24 godz., 7 lub 28 dni) – statystycznie istotne różnice indeksu gonadosomatycznego, zmniejszenie ilości nasienia w najądrzach, a także zwiększenie poziomu uszkodzeń DNA w komórkach rozrodczych (39).

Miresmaeili i wsp. (2013) także opisali wpływ nanocząstek srebra (70 nm) na spermatogenezę szczurów (40). Zwierzętom podawano nanocząstki srebra przez zgłębnik przez 48 dni (1 cykl spermatogenezy) w dawkach: 25, 50, 100 i 200 mg/kg m.c. W grupie poddanej najniższemu narażeniu zaobserwowano nieprawidłowości w reakcji akrosomalnej. W pozostałych grupach istotnie statystycznie zmniejszyła się ilość spermatogonii, spermatocytów I oraz spermatyd i plemników. Nie odnotowano różnic w budowie kanalików nasiennych (średnicy kanalików, liczbie komórek Sertoliego) (40).

W kolejnym etapie Baki i wsp. (2014) przeprowadzili ocenę wpływu nanocząstek srebra na stężenie hormonów płciowych we krwi oraz jakość nasienia i liczebności komórek Leydiga, odpowiedzialnych za produkcję hormonów płciowych w jądrach (41). Wykazano istotne statystycznie zmniejszenie liczby komórek Leydiga i obniżenie poziomu testosteronu we krwi narażanych szczurów w porównaniu z grupą kontrolną. Zaobserwowano także istotny wzrost stężenia hormonu luteinizującego (luteinizing hormone – LH) i nieistotne statystycznie obniżenie poziomu hormonu folikulotropowego (follicle-stimulating hormone – FSH). Odnotowano również obniżenie jakości nasienia (zmniejszenie ruchliwości plemników i ilości plemników o prawidłowej budowie) (41).

Mathias i wsp. (2014) zaobserwowali wpływ narażenia szczurów niedojrzałych (w okresie przedpokwi-

taniowym) na rozrodczość w wieku dorosłym (42). Samcom szczurów Wistar podawano dożyłkowo nanocząstki srebra (15 lub 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c.) między 23. a 58. dniem życia i obserwowano do 102. dnia życia. Wyniki porównywano z grupą zwierząt kontrolnych (nienarażanych) i odnotowano różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) w integralności błony komórkowej i akrosomalnej, aktywności mitochondriów oraz w częstości występowania nieprawidłowości plemników. U narażanych szczurów zaobserwowano również opóźnienie pokwitania. Nie opisano zaburzeń w zachowaniach prokreacyjnych ani różnic stężeń hormonów płciowych (42).

Negatywny wpływ na rozrodczość u samców opisano również w badaniach na nowozelandzkich białych królikach, którym wstrzyknięto dożylnie nanosrebro w dawce 0,6 mg/kg m.c. (43). Wyniki badań wskazują, że nanocząstki docierały do jąder i wywoływały pogorszenie jakości nasienia (zmniejszenie ruchliwości plemników). U narażanych samców odnotowano wyższy poziom reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species – ROS) w nasieniu oraz zmiany w budowie i funkcjach akrosomów oraz mitochondriów w plemnikach (43).

Działanie na układ nerwowy

Wyniki badań dotyczących działania nanocząstek srebra na układ nerwowy (44–47) przedstawiono w tabeli 3. Funkcje poznawcze w testach behawioralnych labiryntu Y i labiryntu promienistego badano u szczurów po 7 dniach dootrzewnowej ekspozycji na nanocząstki srebra (44). Narażenie na nanocząstki wyraźnie pogorszyło funkcje spontanicznej zmienności w teście labiryntu Y oraz pamięci roboczej w teście labiryntu promienistego, wskazując na zaburzenia pamięci krótkotrwałej u szczurów. Nie stwierdzono natomiast wpływu na pamięć długotrwałą, mierzoną próbą pamięci referencyjnej w teście labiryntu promienistego. Eksperymentatorzy sugerują, że indukowane narażeniem na nanocząstki srebra zaburzenia pamięci zachodzą pod wpływem stresu oksydacyjnego w komórkach mózgu (44).

W badaniu Liu i wsp. (2012) szczurom podawano donosowo nanocząstki srebra przez 14 dni w celu określenia wpływu narażenia na funkcje poznawcze (uczenie się i pamięć przestrzenną) oraz plastyczność synaptyczną hipokampu (45). Zwierzęta poddano testowi labiryntu wodnego Morrisa i badano długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (long-term potentiation – LTP). Zmierzono również poziom ROS w ko-

Tabela 3. Działanie neurotoksyczne nanocząstek srebra w eksperymentach na zwierzętach
Table 3. Neurotoxicity of silver nanoparticles in experimental animals

Wielkość cząstek nanosrebra Particle size of nanosilver [nm]	Gatunek badanych zwierząt Species of tested animals	Czas narażenia Duration of exposure	Stężenie nanosrebra Nanosilver concentration	Wynik Effects	Piśmiennictwo Reference
Inhalacja (przez nos) / Inhalation (nose only)					
50–100	szczurowy Wistar / Wistar rats	14 dni / days	3 i 30 mg/kg m.c. / 3 and 30 mg/kg b.w.	obniżenie wyników testów oceniających funkcje poznawcze (labirynt wodny Morrisa), zwiększenie poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach hipokampalnych w porównaniu z grupą kontrolną; zmiany morfologiczne neuronów piramidalnych / abnormal results of spatial cognitive tests (Morris water maze), increased level of reactive oxygen species in hippocampal cells compared with the control group; the morphological changes of pyramidal neurons	45
22,18±1,72 GMD	myszki C57BL/6 / mice C57BL/6	14 dni, 6 godz./dzień, 5 dni/tydzień / 14 days, 6 h/day, 5 days/week	$1,91 \times 10^7$ cząstek/cm ³ / $1,91 \times 10^7$ particles/cm ³	zmiany w ekspresji genów związanych z zaburzeniami neuronów ruchowych, chorobami neurodegeneracyjnymi (RNA z mózgu i mózdzku) / changes in expression of genes involved in motor neuron disorders, neurodegenerative diseases (RNA from the brain and cerebellum)	47

Tabela 3. Działanie neurotoksyczne nanocząstek srebra w eksperymentach na zwierzętach – cd.
Table 3. Neurotoxicity of silver nanoparticles in experimental animals – cont.

Wielkość cząstek nanosrebra Particle size of nanosilver [nm]	Gatunek badanych zwierząt Species of tested animals	Czas narażenia Duration of exposure	Stężenie nanosrebra Nanosilver concentration	Wynik Effects	Piśmiennictwo Reference
Podanie dootrzewnowe / Intraperitoneal					
23–29	szczury Wistar / Wistar rats	7 dni / days	5 i 10 µg/kg m.c. / 5 and 10 µg/kg b.w.	zaburzenia pamięci krótkotrwałej – obniżenie funkcji spontanicznej zmienności w teście labiryntu Y oraz pamięci roboczej w teście labiryntu promienistego; brak wpływu na pamięć długotrwałą (bez zmian w próbie pamięci referencyjnej w teście labiryntu promienistego) / short-term memory disorder – decreased spontaneous alternation in the Y-maze task and working memory functions in the radial arm-maze task; no effect on long-term memory (no change in reference memory in the radial arm-maze task)	44
25	myszki ICR / mice ICR	7 dni / days	10; 25 i 50 mg/kg m.c. / 10; 25 and 50 mg/kg b.w.	brak różnic w wynikach testu labiryntu wodnego Morrisa między narażanymi myszami a grupą kontrolną; bez zmian w proliferacji, żywotności i różnicowaniu komórek hipokampalnych / no differences in the Morris water maze test results between the exposed mice and the control group; unchanged proliferation, survival and differentiation of hippocampal cells	46

GMD – średnia geometryczna średnicy / geometric mean diameter.

mórkach hipokampalnych. U narażanych szczurów zaobserwowano pogorszenie wyników w przeprowadzonych testach i zwiększenie stężenia ROS w homogenacie komórek w porównaniu z grupą kontrolną.

Badania histopatologiczne wykazały zmiany morfologiczne neuronów piramidalnych, wskazujące na uszkodzenia DNA i apoptozę. Liu i wsp. sugerują, że mechanizm neurotoksycznego działania nanocząstek srebra może polegać na zaburzeniu plastyczności synaptycznej w rejonie drogi przesywającej (perforant pathway – PP) i zakrętu zębatego (dentate gyrus – DG) hipokampu, co wpływa na obniżenie funkcji poznawczych. Nanosrebro indukując nadmierną ilość ROS, może wywołać stres oksydacyjny, uszkodzenie DNA i apoptozę neuronów (45).

Nanosrebro nie wpłynęło natomiast na funkcje poznawcze (pamięć roboczą i referencyjną) ani neurogenezę w hipokampie narażanych myszy, którym przez 7 dni wstrzykiwano dootrzewnowo nanocząstki srebra (46). Nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych między grupą kontrolną a grupami narażanymi w teście labiryntu wodnego Morrisa, który pozwala na ocenę pamięci przestrzennej. W normie były także proliferacja, żywotność i różnicowanie komórek hipokampalnych narażanych myszy (46).

Badanie wpływu narażenia na nanocząstki srebra na mózg przeprowadzono także na myszach, które inhalowano (przez nos) przez 14 dni (47). Na podstawie analizy RNA, wyizolowanego z mózgu i mózdzku, wykazano zmiany w ekspresji genów związanych z zaburzeniami neuronów ruchowych, chorobami neurodegeneracyjnymi, które wskazują na potencjalne neurotoksyczne działanie nanosrebra (47).

WNIOSKI

Nanosrebro, tak jak inne nanomateriały, wykazuje wysoką aktywność. Jego działanie biologiczne wykorzystywane było od wieków, a w dobie nowoczesnych nanotechnologii znajduje coraz więcej zastosowań. Z badań eksperymentalnych na zwierzętach wynika, że nanocząstki srebra mogą być wchłaniane przez płuca i jelita. Istnieją także doniesienia na temat możliwości ich absorpcji przez skórę. Nanocząstki mogą docierać do poszczególnych narządów (nawet mózgu) i wywoływać efekty neurotoksyczne. W badaniach inhalacyjnych nanocząstki srebra działały głównie na płuca i wątrobę, a u zwierząt eksperymentalnych przewlekle narażanych drogą pokarmową zaobserwowano wpływ nanosrebra przede wszystkim na wątrobę. Wykazano,

że nanosrebro może działać genotoksycznie. Istnieją także niepokojące wyniki badań potwierdzające szkodliwy wpływ nanocząstek srebra na rozrodczość zwierząt eksperymentalnych.

Analiza wyników badań opisujących działanie biologiczne srebra, szczególnie w postaci nanocząstek, na zwierzęta eksperymentalne skłania do podjęcia dyskusji na temat bezpieczeństwa srebra w takiej postaci. Z uwagi na rosnące zainteresowanie nanocząstkami srebra i pojawiające się lawinowo nowe produkty tworzone na ich bazie należy zastanowić się nad bezpieczeństwem pracowników narażonych na działanie srebra w formie nanocząstek. Obecnie obowiązujące w Polsce najwyższe dopuszczalne stężenie (NDS) srebra dotyczy frakcji wdychalnej i wynosi $0,05 \text{ mg/m}^3$ w powietrzu środowiska pracy (48). Nie ustalono natomiast wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSch) ani najwyższego dopuszczalnego stężenia pułapowego (NDSP).

Normatyw dla srebra został ustalony w 1983 r. i opiera się na obserwacji 27 pracowników, u których po 5-letnim narażeniu na srebro metaliczne i jego związki nierozpuszczalne w stężeniu $0,11 \text{ mg/m}^3$ wystąpiły objawy srebrycy – niewielkie przebarwienie przegrody nosowej i oczu (49). Powyższe stężenie przyjęto za stężenie progowe.

Frakcja wdychalna, dla której obowiązuje NDS srebra, to frakcja aerozolu wnikać przez nos i usta, która po zdeponowaniu w drogach oddechowych stwarza zagrożenie dla zdrowia. Zawiera ona także nanocząstki. W świetle alarmujących wyników badań przeprowadzonych w ostatnich latach, wskazujących na szkodliwe działanie nanosrebra w narażeniu przewlekłym, uzasadniona wydaje się potrzeba zaktualizowania dokumentacji NDS dla tego metalu z wyodrębnieniem wartości dla frakcji nanocząstek.

PIŚMIENNICTWO

1. Oldenburg S.J.: Silver Nanoparticles: Properties and Applications [cytowany 10 kwietnia 2014]. Adres: <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html>
2. Bujak Ł.: Wzmocnienie fluorescencji układu fotosyntezy LH2 poprzez kontrolę sprzężenia plazmonowego z nanocząstkami plazmonicznymi [rozprawa doktorska]. Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń 2013 [cytowany 16 kwietnia 2014]. Adres: <https://www.fizyka.umk.pl/wfaiis/files/Lukasz%20Bujak-%20rozprawa%20doktorska.pdf>
3. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 127/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/WE i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006. DzUrz UE L 353 z 31 grudnia 2008 r., s. 1
4. Takenaka S., Karg E., Roth C., Schulz H., Ziesenis A., Heinzmann U. i wsp.: Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ. Health Perspect.* 2001;109 Supl. 4:547–551
5. Ji J.H., Jung J.H., Kim S.S., Yoon J.U., Park J.D., Choi B.S. i wsp.: Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal. Toxicol.* 2007;19(10):857–871, <http://dx.doi.org/10.1080/08958370701432108>
6. Sung J.H., Ji J.H., Park J.D., Yoon J.U., Kim D.S., Jeon K.S. i wsp.: Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 2009;108(2):452–461, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfn246>
7. Stebounova L.V., Adamcakova-Dodd A., Kim J.S., Park H., O’Shaughnessy P.T., Grassian V.H., i wsp.: Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model. *Part. Fibre. Toxicol.* 2011;8:5, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-8-5>
8. Kim Y.S., Kim J.S., Cho H.S., Rha D.S., Kim J.M., Park J.D. i wsp.: Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal. Toxicol.* 2008;20(6):575–583, <http://dx.doi.org/10.1080/08958370701874663>
9. Lee J.H., Kim Y.S., Song K.S., Ryu H.R., Sung J.H., Park J.D. i wsp.: Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. *Part. Fibre. Toxicol.* 2013;10:36, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-10-36>
10. Kim W.Y., Kim J., Park J.D., Ryu H.Y., Yu I.J.: Histological study of gender differences in accumulation of silver nanoparticles in kidneys of Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2009;72(21–22):1279–1284, <http://dx.doi.org/10.1080/15287390903212287>
11. Loeschner K., Hadrup N., Qvortrup K., Larsen A., Gao X., Vogel U. i wsp.: Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part. Fibre. Toxicol.* 2011;8:18, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-8-18>
12. Samberg M.E., Oldenburg S.J., Monteiro-Riviere N.A.: Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin *in vivo* and keratinocytes *in vitro*. *Environ. Health Perspect.* 2010;118(3):407–413, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.0901398>

13. Korani M., Rezayat S.M., Arbabi Bidgoli S.: Sub-chronic dermal toxicity of silver nanoparticles in guinea pig: Special emphasis to heart, bone and kidney toxicities. *Iran J. Pharm. Res.* 2013;12(3):511–519
14. Lankveld D.P.K., Oomen A.G., Krystek P., Neigh A., Troost-de Jong A., Noorlander C.W. i wsp.: The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials* 2010;31(32):8350–8361, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.045>
15. Chrastina A., Schnitzer J.E.: Iodine-125 radiolabeling of silver nanoparticles for *in vivo* SPECT imaging. *Int. J. Nanomedicine* 2010;5:653–659, <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S11677>
16. Dziendzikowska K., Gromadzka-Ostrowska J., Lan-koff A., Oczkowski M., Krawczyńska A., Chwastowska J. i wsp.: Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats. *J. Appl. Toxicol.* 2012;32(11):920–928, <http://dx.doi.org/10.1002/jat.2758>
17. Tang J., Xiong L., Wang S., Wang J., Liu L., Li J. i wsp.: Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2009;9(8):4924–4932, <http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2009.1269>
18. Maneewattanapinyo P., Banlunara W., Thammacharoen C., Ekgasit S., Kaewamatawong T. An evaluation of acute toxicity of colloidal silver nanoparticles. *J. Vet. Med. Sci.* 2011;73(11):1417–1423, <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.11-0038>
19. Koohi M.K., Hejazy M., Asadi F., Asadian P.: Assessment of dermal exposure and histopathologic changes of different sized nano-silver in healthy adult rabbits. *J. Phys. Conf. Ser.* 2011;304, <http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/304/1/012028>
20. Kim J.S., Song K.S., Sung J.H., Ryu H.R., Choi B.G., Cho H.S. i wsp.: Genotoxicity, acute oral and dermal toxicity, eye and dermal irritation and corrosion and skin sensitisation evaluation of silver nanoparticles. *Nanotoxicology* 2013;7(5):953–960, <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2012.676099>
21. Sung J.H., Ji J.H., Song K.S., Lee J.H., Choi K.H., Lee S.H. i wsp.: Acute inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol. Ind. Health.* 2011;27(2):149–154, <http://dx.doi.org/10.1177/0748233710382540>
22. Sung J.H., Ji J.H., Yoon J.U., Kim D.S., Song M.Y., Jeong J. i wsp.: Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhal. Toxicol.* 2008;20(6):567–574, <http://dx.doi.org/10.1080/08958370701874671>
23. Song K.S., Sung J.H., Ji J.H., Lee J.H., Lee J.S., Ryu H.R. i wsp.: Recovery from silver-nanoparticle-exposure-in-duced lung inflammation and lung function changes in Sprague Dawley rats. *Nanotoxicology* 2013;7(2):169–180, <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2011.648223>
24. Cha K., Hong H.W., Choi Y.G., Lee M.J., Park J.H., Chae H.K. i wsp.: Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol. Lett.* 2008;30(11):1893–1899, <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-008-9786-2>
25. Park E.J., Bae E., Yi J., Kim Y., Choi K., Lee S.H. i wsp.: Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2010;30(2):162–168, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2010.05.004>
26. Jeong G.N., Jo U.B., Ryu H.Y., Kim Y.S., Song K.S., Yu I.J.: Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Arch. Toxicol.* 2010;84(1):63–69, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-009-0469-0>
27. Hadrup N., Loeschner K., Bergström A., Wilcks A., Gao X., Vogel U. i wsp.: Subacute oral toxicity investigation of nanoparticulate and ionic silver in rats. *Arch. Toxicol.* 2012;86(4):543–551, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-011-0759-1>
28. Kim Y.S., Song M.Y., Park J.D., Song K.S., Ryu H.R., Chung Y.H. i wsp.: Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part. Fibre. Toxicol.* 2010;7:20, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-7-20>
29. Korani M., Rezayat S.M., Gilani K., Arbabi Bidgoli S., Adeli S.: Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. *Int. J. Nanomedicine* 2011;6:855–862, <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S17065>
30. Korani M., Rezayat S.M., Ghamami S.G.: Silver nanoparticle induced muscle abnormalities: A sub-chronic dermal assessment in guinea pig. *J. Pharm. Health Sci.* 2012;1(3):21–29
31. Li Y., Chen D.H., Yan J., Chen Y., Mittelstaedt R.A., Zhang Y. i wsp.: Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and *in vitro* micronucleus assay. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2012;745(1–2):4–10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.010>
32. Park M.V.D.Z., Neigh A.M., Vermeulen J.P., de la Fonteyne L.J.J., Verharen H.W., Briedé J.J. i wsp.: The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 2011;32(36):9810–9817, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.085>
33. Tavares P., Balbinot F., de Oliveira H.M., Fagundes G.E., Venâncio M., Ronconi J.V.V. i wsp.: Evaluation of genotoxic effect of silver nanoparticles (Ag-Nps) *in vitro* and

- in vivo*. J. Nanopart. Res. 2012;14(4):791, <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-012-0791-y>
34. Kim J.S., Sung J.H., Ji J.H., Song K.S., Lee J.H., Kang C.S. i wsp.: *In vivo* genotoxicity of silver nanoparticles after 90-day silver nanoparticle inhalation exposure. Saf. Health Work 2011;2(1):34–38, <http://dx.doi.org/10.5491/SHAW.2011.2.1.34>
35. Cho H.S., Sung J.H., Song K.S., Kim J.S., Ji J.H., Lee J.H. i wsp.: Genotoxicity of silver nanoparticles in lung cells of Sprague Dawley rats after 12 weeks of inhalation exposure. Toxics 2013;1(1):36–45; <http://dx.doi.org/10.3390/toxics1010036>
36. Melnik E.A., Buzulukov Y.P., Demin V.F., Demin V.A., Gmshinski I.V., Tyshko N.V. i wsp.: Transfer of silver nanoparticles through the placenta and breast milk during *in vivo* experiments on rats. Acta Naturae 2013;5(3):107–115
37. Mahabady M.K.: The evaluation of teratogenicity of nanosilver on skeletal system and placenta of rat fetuses in prenatal period. Afr. J. Pharm. Pharmacol. 2012;6(6):419–424, <http://dx.doi.org/10.5897/AJPP11.838>
38. Austin C.A., Umbreit T.H., Brown K.M., Barber D.S., Dair B.J., Francke-Carroll S. i wsp.: Distribution of silver nanoparticles in pregnant mice and developing embryos. Nanotoxicology 2012;6(8):912–922, <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2011.626539>
39. Gromadzka-Ostrowska J., Dziendzikowska K., Lanckoff A., Dobrzyńska M., Instanes C., Brunborg G., i wsp.: Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. Toxicol. Lett. 2012;214(3):251–258, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.08.028>
40. Miresmaeili S.M., Halvaei I., Fesahat F., Fallah A., Nikonahad N., Taherinejad M.: Evaluating the role of silver nanoparticles on acrosomal reaction and spermatogenic cells in rat. Iran. J. Reprod. Med. 2013;11(5):423–430
41. Baki M.E., Miresmaili S.M., Pouretezari M., Amraii E., Yousefi V., Spenani H.R. i wsp.: Effects of silver nano-particles on sperm parameters, number of Leydig cells and sex hormones in rats. Iran. J. Reprod. Med. 2014;12(2):139–144
42. Mathias F.T., Romano R.M., Kizys M.M., Kasamatsu T., Giannocco G., Chiamolera M.I. i wsp.: Daily exposure to silver nanoparticles during prepubertal development decreases adult sperm and reproductive parameters. Nanotoxicology 2014, <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2014.889237>
43. Castellini C., Ruggeri S., Mattioli S., Bernardini G., Macchioni L., Moretti E. i wsp.: Long-term effects of silver nanoparticles on reproductive activity of rabbit buck. Syst. Biol. Reprod. Med. 2014;60(3):143–150, <http://dx.doi.org/10.3109/19396368.2014.891163>
44. Hritcu L., Stefan M., Ursu L., Neagu A., Mihasan M., Tartau L. i wsp.: Exposure to silver nanoparticles induces oxidative stress and memory deficits in laboratory rats. Cent. Eur. J. Biol. 2011;6(4):497–509, <http://dx.doi.org/10.2478/s11535-011-0022-z>
45. Liu Y., Guan W., Ren G., Yang Z.: The possible mechanism of silver nanoparticle impact on hippocampal synaptic plasticity and spatial cognition in rats. Toxicol. Lett. 2012;209(3):227–231, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.01.001>
46. Liu P., Huang Z., Gu N.: Exposure to silver nanoparticles does not affect cognitive outcome or hippocampal neurogenesis in adult mice. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2013;87:124–130, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.014>
47. Lee H.Y., Choi Y.J., Jung E.J., Yin H.Q., Kwon J.T., Kim J.E. i wsp.: Genomics-based screening of differentially expressed genes in the brains of mice exposed to silver nanoparticles via inhalation. J. Nanopart. Res. 2010;12(5):1567–1578, <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-009-9666-2>
48. Rozporządzenie Ministra Pracy i Polityki Społecznej z dnia 6 czerwca 2014 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy. DzU z 2014 r., poz. 817
49. Srebro i jego związki – dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego [dane niepublikowane]