

Anna Maria Świdwińska-Gajewska

Sławomir Czerczak

## NANOSREBRO – DOPUSZCZALNE POZIOMY NARAŻENIA ZAWODOWEGO

NANOSILVER – OCCUPATIONAL EXPOSURE LIMITS

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

### STRESZCZENIE

Nanosrebro historycznie było określane mianem srebra koloidalnego i składa się z cząstek w rozmiarze poniżej 100 nm. Nanocząstki srebra są wykorzystywane w wielu technologiach do tworzenia szerokiego zakresu produktów. Dzięki właściwościom antybakteryjnym znajdują zastosowanie m.in. w wyrobach medycznych (środki opatrunkowe), tekstyliach (odzież dla sportowców, skarpety), tworzywach sztucznych czy materiałach budowlanych (farby). Srebro koloidalne przez wielu uważane jest za idealny środek w walce z drobnoustrojami chorobotwórczymi, który w przeciwieństwie do antybiotyków nie wywołuje skutków ubocznych. Wyniki badań toksykologicznych pokazują jednak, że nanosrebro nie jest obojętne dla organizmu. W narażeniu inhalacyjnym nanocząstki srebra działają szkodliwie głównie na wątrobę i płuca u szczurów. Za toksyczność nanocząstek w dużej mierze odpowiedzialny jest stres oksydacyjny wywołany przez reaktywne formy tlenu, co przyczynia się do cyto- i genotoksycznego działania nanosrebra. U podłoża molekularnego mechanizmu toksyczności nanosrebra leży aktywność powierzchni nanocząstek, która łatwo ulega utlenieniu. Prowadzi to do uwalniania jonów srebra o znanym działaniu toksycznym. Narażenie zawodowe na srebro nanocząstkowe może występować w procesach jego wytwarzania, formułacji, a także stosowania, szczególnie podczas rozpylania. W Polsce, podobnie jak na świecie, nie obowiązują osobne normatywy higieniczne dla nanomateriałów. W niniejszym opracowaniu podjęto próbę oszacowania wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla srebra – frakcji nanoobjektów, która wyniosła: 0,01 mg/m<sup>3</sup>. Autorzy stoją na stanowisku, że obecnie obowiązująca wartość NDS dla frakcji wdychalnej srebra metalicznego (0,05 mg/m<sup>3</sup>) nie zapewnia wystarczającej ochrony przed szkodliwym działaniem srebra w postaci nanoobjektów. Med. Pr. 2015;66(3):429–442

**Słowa kluczowe:** nanocząstki, narażenie zawodowe, srebro, nanoobjekty, NDS, nanosrebro

### ABSTRACT

Historically, nanosilver has been known as colloidal silver composed of particles with a size below 100 nm. Silver nanoparticles are used in many technologies, creating a wide range of products. Due to antibacterial properties nanosilver is used, among others, in medical devices (wound dressings), textiles (sport clothes, socks), plastics and building materials (paints). Colloidal silver is considered by many as an ideal agent in the fight against pathogenic microorganisms, unlike antibiotics, without side effects. However, in light of toxicological research, nanosilver is not inert to the body. The inhalation of silver nanoparticles have an adverse effect mainly on the liver and lung of rats. The oxidative stress caused by reactive oxygen species is responsible for the toxicity of nanoparticles, contributing to cytotoxic and genotoxic effects. The activity of the readily oxidized nanosilver surface underlies the molecular mechanism of toxicity. This leads to the release of silver ions, a known harmful agent. Occupational exposure to silver nanoparticles may occur in the process of its manufacture, formulation and also usage during spraying, in particular. In Poland, as well as in other countries of the world, there is no separate hygiene standards applicable to nanomaterials. The present study attempts to estimate the value of MAC-TWA (maximum admissible concentration – the time-weighted average) for silver – a nano-objects fraction, which amounted to 0.01 mg/m<sup>3</sup>. The authors are of the opinion that the current value of the MAC-TWA for silver metallic – inhalable fraction (0.05 mg/m<sup>3</sup>) does not provide sufficient protection against the harmful effects of silver in the form of nano-objects. Med Pr 2015;66(3):429–442

**Key words:** nanoparticles, occupational exposure, silver, nanoobjects, MAC-TWA, nanosilver

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](mailto:answid@imp.lodz.pl)  
Nadesłano: 11 grudnia 2014, zatwierdzono: 20 maja 2015

## WSTĘP

Srebro jako środek używany do zwalczania chorób czy przedłużania trwałości produktów spożywczych jest znane od wieków. Istnieją wzmianki o wykorzystywaniu tych właściwości przez starożytnych Greków, którzy srebrem pokrywali wnętrza naczyń [1]. Pierwsze preparaty na bazie nanocząstek srebra powstały już w XIX w. Nanosrebro – historycznie określane mianem srebra koloidalnego – składa się z cząstek w rozmiarze poniżej 100 nm. Koloid srebra, stabilizowany cytrynianem, został zsyntetyzowany już w 1889 r. i zawierał cząstki wielkości 7–9 nm. Metoda stabilizowania nanocząstek srebra białkami pochodzi z roku 1902. Od 1897 r. srebro koloidalne, zawierające cząstki o średnicy ok. 10 nm i znane pod nazwą „Colargol”, stosowane było w lecznictwie [1].

Także dzisiaj nanosrebro przez wielu jest uważane za idealny środek w walce z drobnoustrojami chorobotwórczymi, który w przeciwieństwie do antybiotyków nie powoduje skutków ubocznych. Wyniki badań toksykologicznych pokazują jednak, że nanosrebro nie jest obojętne dla organizmu i może prowadzić do skutków o wiele bardziej negatywnych niż srebrzyca. Jest ona obserwowana przy przewlekłym narażeniu na metal w konwencjonalnej formie i poza defektem zabarwienia skóry czy oczu nie stanowi większego niebezpieczeństwa dla zdrowia. Skutki uboczne narażenia na nanosrebro w dużej mierze zależą od drogi narażenia i czasu jego trwania.

## METODY PRZEGLĄDU

Przeglądu piśmiennictwa dokonano w bazach internetowych udostępniających naukowe czasopisma recenzowane. W przygotowaniu niniejszego opracowania wykorzystano prace dotyczące działania biologicznego nanocząstek srebra, mechanizmu ich toksyczności, ze szczególnym uwzględnieniem podłoża molekularnego, zastosowania, narażenia zawodowego, a także dopuszczalnych poziomów narażenia.

## WYNIKI PRZEGLĄDU

Przeгляд piśmiennictwa podzielono na podrozdziały: zastosowanie nanosrebra, narażenie zawodowe, działanie toksyczne nanosrebra, mechanizm działania toksycznego nanocząstek, normatywy higieniczne dla srebra obowiązujące w Polsce i na świecie, dopuszczalne poziomy narażenia dla nanosrebra, wartości refe-

rencyjne dla nanomateriałów (srebro) oraz propozycja oszacowania wartości NDS dla frakcji nanoobjektów.

## Zastosowanie nanosrebra

Nanocząstki srebra są wykorzystywane w wielu technologiach do tworzenia szerokiego zakresu produktów dzięki specyficznym właściwościom (antybakteryjnym, przewodzącym i optycznym). Ze względu na działanie antybakteryjne i antygrzybicze znajdują szerokie zastosowanie nie tylko w produkcji środków dezynfekcyjnych i wyrobów medycznych, takich jak środki opatrunkowe, ale także materiałów do kontaktu z żywnością, past do zębów, kosmetyków czy tekstyliów, takich jak odzież dla sportowców czy skarpety i obuwie. Nanosrebro wykorzystywane jest również w różnych tworzywach sztucznych i materiałach budowlanych, m.in. farbach.

Na bazie nanosrebra tworzy się przewodzące atramenty, które wbudowuje się w kompozyty w celu zwiększenia przewodności cieplnej i elektrycznej. Nanocząstki srebra są wykorzystywane także w diagnostyce – w metodach spektrofotometrycznych i fluorescencyjnych. Znajdują również zastosowanie w ogniwach fotowoltaicznych. Srebro w postaci różnych nanoobjektów (nanocząstki, nanoprety, nanotrójkaty) może pełnić rolę cząstek plazmonicznych w układach fotosyntetycznych, modyfikując wydajnie ich właściwości optyczne [2,3].

## Narażenie zawodowe

Narażenie zawodowe na srebro nanocząstkowe może występować w procesach jego wytwarzania, formułacji do różnych preparatów lub ich wprowadzania do wyrobów. W przypadku technologii, które w dużej mierze są wykorzystywane w układach zamkniętych, narażenie na nanosrebro może być niewielkie. Szczególną uwagę należy zwrócić jednak na użytkowanie mieszanin i wyrobów zawierających nanocząstki, które z uwagi na sposób stosowania (natryskiwanie, rozpylanie, obróbka mechaniczna) mogą być źródłem emisji nanoobjektów w powietrzu środowiska pracy.

Główną drogą narażenia na nanoobjekty 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). Mechanizm przemieszczania cząstek w rejonie tchawiczo-oskrzelowym przez ruchy rzęsek nabłonka migawkowego, jako sposób translokacji nanocząstek srebra do układu pokarmowego u szczurów narażanych inhalacyjnie, sugerują Ji i wsp. [4].

Danych dotyczących wielkości narażenia zawodowego na nanocząstki srebra jest niewiele. Tsai i wsp. [5] oszacowali narażenie na nanocząstki srebra w powietrzu środowiska pracy związanej z obróbką ręczną nanomateriałów – tlenku glinu i srebra – w wyciągach laboratoryjnych. Próbkę substancji zbierano na filtry poliwęglanowe, a cząstki analizowano w skaningowym mikroskopie elektronowym. Badania przeprowadzono podczas przenoszenia substancji z jednego naczynia do drugiego za pomocą szpatułki lub poprzez przesypanie. Pomiarów były wykonywane również w powietrzu laboratorium przed procesem, co stanowiło poziom odniesienia (tło). Stężenie nanocząstek zawieszonych w powietrzu było mierzone z wykorzystaniem systemu analizy wymiarowej cząstek FMPS (fast mobility particle sizer).

Wielkość zmierzonych pojedynczych cząstek srebra nie przekraczała 100 nm, ale powstawały również kilkumikrometrowe agregaty, które mierzono już jako frakcję większych cząstek. Liczbowe stężenie cząstek z zakresu pików 100–200 nm w powietrzu nad kolbą, która zawierała 15 g srebra, wyniosło 7000 cząstek/cm<sup>3</sup>. Wartości tła nie przekraczały 1000 cząstek/cm<sup>3</sup>. W opisanych warunkach narażenia stężenie uwolnionych nanocząstek srebra wyraźnie więc wzrosło [5].

Demou i wsp. [6] opisali pilotażowe badanie dotyczące narażenia na nanocząstki w zakładach produkujących nanomateriały. Produkcja dotyczyła nanocząstek metali osadzonych w matrycy, wytwarzanych w procesach wysokotemperaturowych, które prowadzono w fazie gazowej. Pomiarów były przeprowadzane przez 25 dni podczas wytwarzania nanomateriałów i konserwacji reaktora, wykonywane w czasie rzeczywistym, z wykorzystaniem systemu analizy wymiarowej cząstek SMPS (scanning mobility particle sizer), kondensacyjnego licznika cząstek CPC (condensation particle counter) i monitora aerozolu DustTrak (prod. TSI, USA).

Uśrednione wartości tła (pomiarów prowadzonych codziennie przed rozpoczęciem procesu produkcyjnego) wyniosły (odpowiednio: stężenie liczbowe i masowe): 8512(±20%) cząstek/cm<sup>3</sup> i 0,052(±1%) mg/m<sup>3</sup>. Średnie stężenie cząstek w powietrzu środowiska pracy podczas produkcji nanomateriałów wyniosło 59 100 cząstek/cm<sup>3</sup> (0,188 mg/m<sup>3</sup>). Podwyższony poziom cząstek zaobserwowano również podczas czyszczenia reaktora, choć różnica nie była tak wyraźna. Wyniki powyższych badań [6] wskazują, że liczbowe stężenie cząstek srebra podczas produkcji nanomateriału może być o rząd wielkości wyższe od wartości tła. Autorzy badania sugerują, że szacowanie ilościowe

cząstek jest lepszym sposobem wyrażania wielkości narażenia na nanocząstki niż stężenie masowe.

Lee i wsp. [7] opisali narażenie na nanocząstki srebra w 2 koreańskich zakładach produkcyjnych – podczas wytwarzania nanosrebra w procesie ze wzbudzeniem plazmowym (zakład A) oraz podczas reakcji azotanu srebra z cytrynianem sodu i mechanicznej obróbki (zakład B) [7]. Środowisko pracy było monitorowane w czasie rzeczywistym za pomocą kondensacyjnego licznika cząstek CPC i systemu analizy wymiarowej cząstek SMPS w zakresie 15–710,5 nm. Próbkę były również analizowane metodami spektrometrii z indukcją plazmową oraz z zastosowaniem skaningowego transmisyjnego mikroskopu elektronowego.

W zakładzie A nanosrebro wytwarzano w ilości 5 kg/dzień. Stanowiska pracy były wyposażone jedynie w wentylację naturalną. Prekursory nanosrebra (w postaci pyłu lub zawiesiny) wprowadzono do reaktora, gdzie pod wpływem obróbki plazmowej argonem przechodziły w stan gazowy. Następnie atomy srebra ulegały kondensacji w nanocząstki w gradiencie temperatury. Powstałe nanoobjekty srebra były zbierane do kolektora. Narażenie badano przed wstrzykiwaniem prekursorów srebra (tło) i w czasie procesu produkcyjnego. Pomiarów były wykonywane w strefie oddychania operatorów plazmotronu (dozymetria indywidualna) i kilku miejscach oddalonych od źródła emisji o 1–4 m (dozymetria stacjonarna).

Wyniki pomiarów dozymetrii indywidualnej wyniosły: 0,12 µg/m<sup>3</sup> i 1,02 µg/m<sup>3</sup>. Wartości te były wyższe od wyników pomiarów dozymetrii stacjonarnej w strefie oddalonej od źródła emisji (tło dalekie). Wyniki dozymetrii stacjonarnej wskazują, że w strefie znajdującej się najbliżej kolektora występowało najwyższe stężenie (0,34 µg/m<sup>3</sup>), 3-krotnie przewyższające wyniki pomiarów zebranych z innych, bardziej oddalonych miejsc. Stężenie liczbowe cząstek i ich rozmiary były badane z zastosowaniem SMPS (cząstki z zakresu 15–710,5 nm) wewnątrz kolektora i w powietrzu środowiska pracy. Stężenie cząstek przed rozpoczęciem pracy reaktora mieściło się w zakresie 534,6–6657 cząstek/cm<sup>3</sup> (tło) (średnia wielkość cząstek: ok. 100 nm), a we wnętrzu kolektora – 25 022–2 237 309 cząstek/cm<sup>3</sup> (średnia wielkość cząstek: ok. 30 nm i mniejszy pik przy 150 nm). W powietrzu środowiska pracy, na zewnątrz kolektora, zakres zmierzonych stężeń wyniósł 535–25 000 cząstek/cm<sup>3</sup> (z szerokim zakresem rozmiarów cząstek – średnia ok. 400 nm). Obserwacje prowadzone transmisyjnym mikroskopem elektronowym potwierdziły obecność agregatów i aglomeratów srebra w powietrzu [7].

W zakładzie B prowadzono produkcję nanocząstek srebra metodą „mokrą” z zastosowaniem cytrynianu sodu i azotanu srebra przy udziale rozdrabniania mechanicznego. Dzienna produkcja nanosrebra wynosiła w tym zakładzie 1 kg, a na stanowiskach pracy oprócz wentylacji naturalnej była jeszcze miejscowa wentylacja wywiewna. Stężenie grawimetryczne srebra na stanowiskach pracy mieściło się w przedziale 0,03–1,18  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Liczba cząstek z zakresu wielkości 15–710,5 nm wyniosła 394–3526 cząstek/ $\text{cm}^3$ . Przed rozpoczęciem procesu obserwowany poziom cząstek utrzymywał się poniżej 1000 cząstek/ $\text{cm}^3$  (tło). Następnie odnotowano wzrost zarówno nanocząstek, jak i większych cząstek, szczególnie podczas procesu mieszania (ok. 2500 cząstek/ $\text{cm}^3$ ) oraz czyszczenia reaktora (ok. 3500 cząstek/ $\text{cm}^3$ ). Wzrost stężenia cząstek w środowisku pracy na stanowiskach przy wytwarzaniu nanosrebra metodą „mokrą” uznano za niewielki [7].

W kolejnej pracy badaczy pod kierunkiem Lee [8] opisano wyniki pomiarów przeprowadzonych w zakładzie opisanym powyżej jako „zakład A”, produkującym nanocząstki srebra w procesie ze wzbudzeniem plazmowym. W celu oszacowania potencjalnego narażenia prowadzono 3-dniowy monitoring w czasie rzeczywistym (pomiarzy stacjonarne i indywidualne). Najwyższe stężenia odnotowano w pomieszczeniu sąsiadującym z reaktorem – wtryskowni, które sięgały nawet 288,7  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . W pozostałych badanych lokalizacjach stężenie nanocząstek srebra nie przekroczyło 1,3  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Stężenie grawimetryczne w pomiarach indywidualnych mieściło się w granicach 0,04–2,43  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Stężenie liczbowe cząstek i ich rozmiary były badane w czasie rzeczywistym z zastosowaniem SMPS. Mierzono cząstki z zakresu 15–710,5 nm, a ich stężenie mieściło się w przedziale 224 622–2 328 608 cząstek/ $\text{cm}^3$ , z czego większość stanowiły nanocząstki (< 100 nm). Pomiarzy prowadzono przez 3 kolejne dni przed rozpoczęciem pracy reaktora (tło) i w czasie procesu wytwarzania nanocząstek. Średnie stężenie liczbowe cząstek w poszczególnych dniach pracy reaktora wyniosło: pierwszego dnia – 911 170 cząstek/ $\text{cm}^3$ , drugiego dnia – 1 631 230 cząstek/ $\text{cm}^3$  i trzeciego dnia – 1 265 024 cząstek/ $\text{cm}^3$ . Wartości tła w kolejnych dniach wyniosły odpowiednio: 877 365 cząstek/ $\text{cm}^3$ , 492 732 cząstek/ $\text{cm}^3$  i 344 343 cząstek/ $\text{cm}^3$ . Autorzy badania [8] – podsumowując zaobserwowane wysokie stężenia liczbowe cząstek w porównaniu z wynikami z poprzedniego badania [7] oraz brak tak wyraźnej różnicy w stężeniu masowym srebra – uznali, że w powie-

trzu środowiska pracy badanego zakładu mogło istnieć więcej źródeł emisji heterogennych nanocząstek.

W następnej pracy Lee i wsp. [9] opisano narażenie na nanocząstki i jego wpływ na zdrowie pracowników w zakładzie produkującym nanosrebro w procesie ze wzbudzeniem plazmowym. Badaniu poddano 2 mężczyzn pracujących od 7 lat przy produkcji nanocząstek srebra (20–30 nm). Proces był zamknięty, średnie stężenie grawimetryczne cząstek srebra w strefie oddychania wyniosło 0,35  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  u pierwszego badanego i 1,35  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  u drugiego. Następnie określano zawartość srebra we krwi i moczu u narażanych pracowników. Stężenie srebra we krwi wyniosło 0,034  $\mu\text{g}/\text{dl}$  u pierwszego badanego i 0,13  $\mu\text{g}/\text{dl}$  u drugiego, natomiast w moczu obecność srebra (0,043  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) stwierdzono tylko u jednego mężczyzny. Nie odnotowano żadnych nieprawidłowości w parametrach biochemicznych ani hematologicznych krwi u badanych osób [9].

Potencjalne narażenie na nanocząstki badano w procesie rozpylania preparatu zawierającego nanosrebro „Nano Silver”, przeznaczonego do czyszczenia klimatyzacji [10]. W badaniu określano stężenie i rozkład wymiarowy cząstek z zakresu 10 nm–10  $\mu\text{m}$  z zastosowaniem kondensacyjnego licznika cząstek drobnych (20 1000 nm) (P-Trak, prod. TSI, USA), analizatora nanocząstek mierzącego stężenie powierzchniowe (10–1000 nm) (AeroTrak, prod. TSI, USA), licznika optycznego do określania stężeń liczbowych cząstek w poszczególnych przedziałach rozmiarów (0,4–0,5; 0,5–1; 1–3; 3–10  $\mu\text{m}$ ) (Grimm 1.108, prod. Grimm Aerosol Technik, Niemcy) oraz systemu analizy wymiarowej cząstek określającego ich rozkład wymiarowy (20–154 nm) (SMPS, prod. TSI, USA). Preparat rozpylano 3-krotnie w odstępach czasowych co ok. 30 min przez 10 s. Pomiarzy były wykonywane w odległości 52 cm od źródła emisji przed rozpoczęciem procesu (tło) i w jego trakcie.

Wyniki pomiarów stężeń liczbowych i powierzchniowych, wykonanych przy użyciu aparatów P-Trak, Grimm i AeroTrak i uzyskanych w tym badaniu, przedstawiono w tabeli 1. Wskazują one, że podczas 10-sekundowego rozpylania preparatu „Nano Silver” w powietrzu zwiększa się liczba cząstek z zakresu 10 nm–10  $\mu\text{m}$  w odległości 52 cm od źródła emisji. Pomiar rozkładu wymiarowego cząstek przeprowadzony przy użyciu SMPS potwierdził wzrost stężenia liczbowego nanocząstek po rozpyleniu badanego preparatu. Wzrost większych cząstek może wynikać z powstawania większych kropeł preparatu, z których mogą następnie uwalniać się nanocząstki srebra, a także nanocząstki o innym składzie chemicznym [10].

**Tabela 1.** Porównanie stężeń liczbowych cząstek oraz stężeń powierzchniowych zmierzonych przed procesem (tło) i podczas procesu rozpylania preparatu zawierającego nanosrebro\*  
**Table 1.** Comparison of number concentrations and surface concentrations of particles measured before the process (background) of nanosilver-containing preparation spraying\*

Wielkość badanych cząstek Particle size	Tło Background	Rozpylanie Spraying		
		I	II	III
Stężenie liczbowe cząstek / Number concentrations of particles [n/cm <sup>3</sup> ] <sup>a</sup>				
20–1 000 nm	2 000	6 000	24 000	11 000
0,4–0,5 µm	7 000	27 000	48 000	41 000
0,5–1 µm	3 000	31 000	50 000	37 000
1–3 µm	11	9 300	12 800	8 500
3–10 µm	8	360	580	250
Stężenie powierzchniowe cząstek / Surface concentrations of particles [µm <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup> ] <sup>b</sup>				
10–1 000 nm	7,0	16,2	28,9	27,0

\* Na podstawie / Based on: Jankowska E., Łukaszewska J.: Potencjalne narażenie na nanocząstki srebra podczas rozpylania preparatu do czyszczenia klimatyzacji [10].

<sup>a</sup> Pomiary z wykorzystaniem aparatów P-Trak i Grimm / Measurements with P-Trak and Grimm.

<sup>b</sup> Pomiary z wykorzystaniem aparatu AeroTrak / Measurements with AeroTrak.

Narażenie na nanoobjekty wyrażane jest nie tylko w stężeniach masowych, ale coraz częściej stosowaną miarą jest liczbowe stężenie cząstek lub ich wymiarowy rozkład. Brane są pod uwagę cząstki z zakresu poniżej 100 nm i większe frakcje. Powstające agregaty, szczególnie aglomeraty nanocząstek, które wykraczają rozmiarem poza nanoskalę (< 100 nm), mają równie rozbudowaną powierzchnię właściwą, która w dużym stopniu decyduje o działaniu toksycznym nanomateriału.

W ocenie narażenia na nanoobjekty jest przydatny również pomiar powierzchni właściwej materiału, który został uwzględniony w zaleceniu Komisji Unii Europejskiej dotyczącym definicji nanomateriału [11]. Brakuje jednak jednolitych kryteriów dotyczących pomiarów nanoobjektów, w związku z czym większość prac dotyczących badań toksyczności nanomateriałów i proponowanych poziomów dopuszczalnych wciąż opiera się na pomiarach stężeń masowych.

### Działanie toksyczne nanosrebra

Negatywne skutki działania nanocząstek srebra zostały dokładniej omówione w pracy przeglądowej dotyczącej toksyczności nanosrebra [12]. Potencjalnymi drogami narażenia na nanosrebro jest droga inhalacyjna, pokarmowa i dermalna. Na podstawie badań eksperymentalnych na zwierzętach wykazano, że nanocząstki srebra mogą być wchłaniane przez płuca i jelita [4,13]. Istnieją także doniesienia o możliwości ich wchłaniania przez nieuszkodzoną skórę [14].

Drogą inhalacyjną nanocząstki srebra docierają do płuc, skąd mogą zostać wchłonięte do krwiobiegu i w ten sposób docierać do narządów wewnętrznych – wątroby, nerek, śledziony, mózgu i serca [15]. Zaobserwowano, że drogą pokarmową nanocząstki srebra mogą docierać do krwi i dalej, do takich narządów jak mózg, wątroba, nerki, płuca czy jądra [16].

Badania dotyczące wchłaniania nanocząstek srebra przez skórę nie są jednoznaczne. U narażanych dermalnie świń nanocząstki wykryto jedynie w rogowej warstwie naskórka [17], natomiast w eksperymentach prowadzonych na świnkach morskich zaobserwowano efekty świadczące o wchłanianiu nanocząstek srebra przez skórę [14]. U narażanych świnek zaobserwowano zmiany poza skórą, tj. w wątrobie, śledzionie i innych tkankach [14]. Ponieważ nie wszystkie wyniki badań potwierdzają wchłanianie nanocząstek przez skórę, kwestia szkodliwości nanocząstek srebra podawanych tą drogą narażenia wymaga dalszych badań. W kontakcie ze skórą i oczami nanocząstki srebra mogą natomiast wywoływać lekkie podrażnienie, nie można też wykluczyć potencjalnego działania uczulającego na skórę [18–20].

W narażeniu inhalacyjnym nanocząstki srebra działają szkodliwie głównie na płuca i wątrobę. Przewlekłe narażenie u szczurów wywoływało obniżenie parametrów oddechowych, takich jak objętość oddechu czy wentylacja minutowa [21]. Zmiany w płucach obejmowały m.in. przewlekłe zapalenie pęcherzyków

płucnych, naciek komórek zapalnych czy zgrubienie ścian pęcherzyków. Z kolei w wątrobie zaobserwowano rozrost kanalików żółciowych i okołonaczyniowe nacieki zapalne [21].

U zwierząt eksperymentalnych przewlekle narażanych drogą pokarmową zaobserwowano wpływ nanocząstek srebra przede wszystkim na wątrobę [22]. U szczurów odnotowano zwiększenie aktywności fosfatazy alkalicznej i poziomu cholesterolu we krwi. Na podstawie badań histopatologicznych stwierdzono także rozrost przewodów żółciowych, a u niektórych zwierząt – zmiany martwicze, zwłóknieniowe lub pigmentacyjne. U narażanych samców odnotowano ponadto znaczące statystycznie zmniejszenie przyrostu masy ciała [22].

W badaniach nad odległymi efektami toksycznymi nanocząstki srebra nie działały mutagenie ani w systemach bakteryjnych, ani na komórki ssaków w testach *in vitro* [23,24], ale wykazano, że mogą działać genotoksycznie. Pozytywne wyniki uzyskano w teście mikrojądrowym i kometowym w badaniach *in vitro* [23], co jednak nie znajduje odzwierciedlenia w większości badań prowadzonych *in vivo* [25]. Uszkodzenia DNA komórek indukowane przez nanocząstki srebra powstają prawdopodobnie na skutek generowania reaktywnych form tlenu. Różne wyniki eksperymentów *in vitro* i *in vivo* wskazują na działanie mechanizmów antyoksydacyjnych, niwelujących genotoksyczne działanie reaktywnych form tlenu.

Istnieją niepokojące doniesienia na temat szkodliwego działania nanocząstek srebra na rozrodczość zwierząt eksperymentalnych. Zaobserwowano, że nanocząstki srebra mogą pokonywać barierę krew-łożysko i przedostawać się do płodów narażanych samic, a także do mleka karmiącej samicy [26]. U płodów narażanych samic zaobserwowano znaczące obniżenie masy i długości ciała oraz zmniejszenie masy, objętości i szerokości łożyska w porównaniu z grupą kontrolną [27]. U samców zwierząt nanocząstki srebra wpływały na gospodarkę hormonalną i zaburzały proces spermatogenezy, co w efekcie obniżało jakość spermy [28–30].

Narażenie na nanocząstki srebra może działać neurotoksycznie. Zaobserwowano obniżenie wyników testów oceniających funkcje poznawcze, a także zaburzenia pamięci krótkotrwałej manifestujące się obniżeniem funkcji spontanicznej zmienności w teście labiryntu Y oraz pamięci roboczej w teście labiryntu promienistego [31]. U podstaw tych zmian może leżeć podwyższony poziom reaktywnych form tlenu

(reactive oxygen species – ROS) zaobserwowany w komórkach hipokampa [32]. Odnotowano również zmiany morfologiczne neuronów piramidalnych. Nanocząstki mogą wpływać na ekspresję genów związanych z zaburzeniami neuronów ruchowych, chorobami neurodegeneracyjnymi, co wskazuje na potencjalne działanie neurotoksyczne [33].

### Mechanizm działania toksycznego nanocząstek

Za toksyczność nanosrebra w dużej mierze, podobnie jak innych nanomateriałów, odpowiedzialny jest stres oksydacyjny wywołany przez ROS. Nanocząstki, przyczyniając się do stresu oksydacyjnego, mogą działać cytotoksycznie, wywołując następujące zmiany [34]:

- uszkodzenia błon komórkowych poprzez peroksydację lipidów,
- działając na mitochondria – uszkodzenia DNA mitochondrialnego i zaburzenia w łańcuchu oddechowym,
- oddziałując z białkami – tworzenie adduktów, zmiany właściwości białek, np. enzymów,
- działanie na materiał genetyczny jądra, tworzenie adduktów z DNA i mutacje genowe.

U podłoża molekularnego mechanizmu toksyczności nanocząstek metali, w szczególności srebra, leży aktywność ich powierzchni, która łatwo ulega utlenieniu przez tlen lub inne substancje obecne w środowisku i układzie biologicznym, prowadząc do uwalniania jonów srebra o znanym działaniu toksycznym. Toksyczność nanosrebra w dużej mierze jest więc warunkowana przez stopień uwalniania jonów. Nanocząstki srebra mogą wnikać do komórek i tam być źródłem jonów. Nie wiadomo jednak, jak duży jest udział jonowej formy srebra w toksyczności wywoływanej przez nanocząstki oraz jakie enzymy i szlaki sygnałowe odgrywają rolę w toksyczności nanosrebra [35].

Atomy srebra ( $Ag^0$ ) na powierzchni nanocząstek, wchodząc w interakcję z cząsteczką tlenu, mogą ulec utlenieniu do tlenku srebra, który utleniając się dalej, uwalnia jony srebra ( $Ag^+$ ). W zależności od warunków biologicznych (rozpuszczony tlen, pH, światło) w obecności jonów siarki bądź grup sulfhydrylowych ( $S^{2-}$  i  $SH^-$ ) mogą tworzyć się siarczki srebra ( $Ag_2S_y$ ). Z uwagi na duże powinowactwo srebra z siarką nanocząstki srebra mogą wchodzić w interakcje z grupami sulfhydrylowymi białek, zmieniając ich funkcje. Toksyczność nanocząstek srebra wiąże się z ich transformacją w układach biologicznych, utlenieniem powierzchniowym, uwalnianiem jonów srebra oraz interakcją z makrocząsteczkami biologicznymi.

AshaRani i wsp. na podstawie badań nad ludzkimi fibroblastami i komórkami glioblastomy zaproponowali mechanizm działania toksycznego nanocząstek srebra [36]. Cząstki docierały do wnętrza komórek na drodze endocytozy klatrynozależnej i makropinocytozy. Zaobserwowano równomierne rozmieszczenie nanocząstek w cytoplazmie i jądrze komórkowym. Komórki ekspozycje na nanocząstki srebra wykazywały niestabilność chromosomową i zatrzymanie podziałów komórkowych, które ustąpiło w przypadku normalnych komórek (fibroblasty), a utrzymywało się u nowotworowych (glioblastomy).

Zdaniem ww. autorów toksyczne działanie nanocząstek srebra następuje za pośrednictwem wewnątrzkomórkowego przepływu jonów wapnia, deformacji cytoszkieletu i aberracji chromosomowych, prowadząc do zmian morfologicznych komórki i zahamowania proliferacji komórek [36]. Na skutek ekspozycji na nanocząstki srebra zwiększała się ilość ROS i zmniejszała zawartość adenosyno-5'-trifosforanu (adenosine triphosphate – ATP) w komórkach, prowadząc do uszkodzeń mitochondriów. Sugerowany przez badaczy mechanizm działania nanocząstek zakłada, że poprzez produkcję ROS i przerwanie syntezy ATP nanocząstki zakłócają prawidłowe działanie łańcucha oddechowego w mitochondriach.

Reaktywne formy tlenu wywołują także uszkodzenia DNA i aberracje chromosomowe, które są głównym czynnikiem powodującym zatrzymanie komórek w fazie G2/M cyklu komórkowego. Część komórek wkracza w kolejne etapy cyklu, a część ulega apoptozie – w zależności od wielkości uszkodzeń DNA i wydajności procesów naprawczych [37].

Hsin i wsp. zaproponowali mechanizm działania, w którym nanocząstki srebra, poprzez generowanie ROS i aktywację kinazy fosforylującej N-terminalny koniec białka Jun (c-Jun amino-terminal kinase – JNK), indukują apoptozę poprzez szlak mitochondrialny. Badacze wykazali, że nanocząstki srebra indukują uwolnienie cytochromu c (składnik kompleksu aktywującego kaspazę 9) do cytozolu oraz translokację proapoptotycznego białka Bax do mitochondriów, wywołując apoptozę mitochondrialną w fibroblastach NIH3T3 [38]. W wyniku interakcji nanocząstek srebra z DNA może dojść do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1, całkowitego zablokowania fazy S, co może również indukować apoptozę [39].

Cheng i wsp. prowadzili badania z użyciem nanosrebra i linii komórkowej fibroblastów NIH3T3 [40]. Pod wpływem nanosrebra błona komórkowa fibrobla-

stów uległa uszkodzeniu. Zaobserwowano uwolnienie dialdehydu malonowego jako produktu peroksydacji lipidów, która nastąpiła prawdopodobnie na skutek działania jonów srebra powstałych na powierzchni nanoobjektów. Efektem była depolimeryzacja filamentów aktywnych cytoszkieletu, związanych z błoną. Uszkodzenie błony pozwoliło na wpływ jonów wapniowych, prowadząc do ich nadmiaru wewnątrz komórki oraz przyczyniając się do nadmiernej produkcji ROS i zmiany potencjału błonowego. Wszystkie wyżej opisane czynniki przyczyniają się do apoptozy [40].

Nanocząstki srebra mogą zmieniać przepuszczalność błon komórek tworzących bariery biologiczne (jelita–krew, krew–mózg), jak wykazano w badaniach *in vitro* przeprowadzonych na liniach komórek ludzkiego gruczolaka jelita grubego (Caco-2) i śródbłonna naczyń mózgu szczura (RBEC4) [41]. Autorzy badania sugerują, że poprzez zmiany w przepuszczalności błon komórkowych nanocząstki mogą docierać do mózgu i wywołując w nim stres oksydacyjny, działać neurotoksycznie [41]. Haase i wsp., prowadząc badania na pierwotnej hodowli komórek nerwowych mózgu szczura, wykazali, że nanocząstki srebra wnikały głównie do astrocytów, gdzie obserwowano stres oksydacyjny i zaburzenia gospodarki wapniowej. Neurony były odporne na działanie nanocząstek [42].

Nanocząstki wchodząc w interakcje z makrocząsteczkami komórkowymi, zmieniają ich właściwości. Mogą tworzyć korony białkowe, zmieniać strukturę i funkcje białek. Zaobserwowano tworzenie na powierzchni nanocząstek korony białkowej z udziałem albuminy, apolipoprotein, keratyn i innych białek surowicy [43]. Powstające korony białkowe wpływają na zdolność wnikania nanocząstek do wnętrza komórek.

Białka pod wpływem nanocząstek zmieniają konformację – w strukturze ludzkiej albuminy surowicy zmniejsza się udział  $\alpha$ -helisy, a zwiększa  $\beta$ -kartki na skutek przerwania wiązań wodorowych pomiędzy sąsiadującymi  $\alpha$ -helisami [44]. Opisano oddziaływanie nanocząstek srebra z ludzką hemoglobina. Nanocząstki mogą wiązać się i oddziaływać z hemem, tryptofanem i resztami amin aromatycznych białek, przyczyniając się do zwiększenia udziału struktury  $\beta$ -kartki, i poprzez mechanizm transferu elektronów tworzyć stabilny kompleks [45].

Nanocząstki poprzez interakcje z grupami tiolowymi mogą hamować aktywność enzymów. Zaobserwowano inhibicję kinazy kreatynowej z mózgu i komórek mięśniowych szczura *in vitro* pod wpływem nanocząstek srebra [46].

Nanocząstki srebra mogą wchodzić w interakcje z DNA i powodować jego uszkodzenia. Badania wykazały, że nanosrebro tworzy kompleks z DNA izolowanym z grasicy cielęcej. Kompleks ten zmieniał konformację DNA i zwiększał jego stabilność, podwyższając temperaturę topnienia [47]. Genotoksyczne działanie srebra jest wywoływane także przez bezpośrednie oddziaływanie nanocząstek z DNA. Głównym uszkodzeniem DNA jest zwiększenie poziomu 8-oksoguaniny [48].

McShan i wsp. w wyniku analizy molekularnego mechanizmu toksycznego działania nanosrebra sugerują, że całkowita naprawa uszkodzonego przez nanocząstki srebra DNA nie jest możliwa ze względu na proces ciągłego, powolnego uwalniania się jonów srebra z nanocząstek, które indukują kolejne bezpośrednie uszkodzenia DNA [49].

Jednym z narządów krytycznych działania nanocząstek srebra jest wątroba. Badania *in vivo* wykazały, że u podstawy mechanizmu działania hepatotoksycznego mogą leżeć zaburzenia procesów energetycznych prowadzące do zmniejszania się puli ATP, autofagia jako odpowiedź na stres oksydacyjny oraz apopto-

za [50]. Szczurom podano dootrzewnowo nanocząstki srebra (13–30 nm) w dawce 500 mg/kg mc. Zawartość srebra w wątrobie była wyraźnie większa u narażanych zwierząt (głównie w endosomach, lizosomach hepatocytów i komórkach Browicza-Kupffera). Ponadto po ekspozycji na nanocząstki srebra wzrosła aktywność enzymów wątrobowych. Badania histopatologiczne nie wykazały większych zmian, poza drobnymi ogniskami zapalnymi. Zaobserwowano jednak wyraźne obniżenie się ilości ATP w hepatocytach oraz indukcję autofagii, jako odpowiedzi obronnej na narażenie, w okresie 1–4 dni od ekspozycji. Następnie proces autofagii ulegał wyciszeniu, nadal utrzymywał się niski poziom ATP i nasiliły się procesy apoptozy w hepatocytach.

### Normatywy higieniczne dla srebra obowiązujące w Polsce i na świecie

Obecnie w Polsce obowiązują następujące wartości najwyższych dopuszczalnych stężeń (NDS) srebra [51]:

- srebro – frakcja wdychalna [7440-22-4] – 0,05 mg/m<sup>3</sup>,
- związki nierozpuszczalne srebra – w przeliczeniu na Ag – 0,05 mg/m<sup>3</sup>,

**Tabela 2.** Normatywy higieniczne dla srebra metalicznego w Polsce i innych krajach [51,52]

**Table 2.** Hygiene standards for metallic silver binding in Poland and in other countries [51,52]

Państwo Country	NDS TWA [mg/m <sup>3</sup> ]	NDSch STEL [mg/m <sup>3</sup> ]	Frakcja aerozolu Aerosol fraction
Austria / Austria	0,01		frakcja wdychalna aerozolu / inhalable aerosol
Dania / Denmark	0,01	0,02	
Francja / France	0,1		
Hiszpania / Spain	0,1		
Holandia / The Netherlands	0,1		
Irlandia / Ireland	0,1		
Niemcy / Germany	0,1	0,08	frakcja wdychalna aerozolu / inhalable aerosol
Polska / Poland	0,05		
Szwajcaria / Switzerland	0,1	0,08	frakcja wdychalna aerozolu / inhalable aerosol
Szwecja / Sweden	0,1		
Wielka Brytania / United Kingdom	0,1		
Włochy / Italy	0,1		
UE-IOELV	0,1		
ACGIH	0,1		
OSHA	0,01		
NIOSH	0,01		

NDS – najwyższe dopuszczalne stężenie / TWA – time-weighted average, NDSch – najwyższe dopuszczalne stężenie chwilowe / STEL – short-term exposure level, UE-IOELV – indykatoryjne dopuszczalne wartości narażenia zawodowego w Unii Europejskiej / indicative exposure limit value in European Union, ACGIH – Amerykańskie Stowarzyszenie Higienistów Przemysłowych / American Conference of Governmental Industrial Hygienists, OSHA – Administracja Bezpieczeństwa i Higieny Pracy / Occupational Safety and Health Administration, NIOSH – Narodowy Instytut Bezpieczeństwa i Higieny Pracy / National Institute for Occupational Safety and Health.



■ związki rozpuszczalne srebra – w przeliczeniu na Ag – 0,01 mg/m<sup>3</sup>.

Normatywy zostały ustalone w 1983 r. i opierają się na obserwacjach przeprowadzonych u 27 pracowników, u których po 5-letnim narażeniu na srebro metaliczne i jego związki nierozpuszczalne w stężeniu 0,11 mg/m<sup>3</sup> wystąpiły objawy srebrycy w postaci niewielkich przebarwień przegrody nosowej i oczu. Powyższe stężenie uznano za stężenie progowe. Wartość dla związków rozpuszczalnych przyjęto na podstawie uzasadnienia wartości ustalonej przez ekspertów Amerykańskiego Stowarzyszenia Higienistów Przemysłowych (American Conference of Governmental Industrial Hygienists – ACGIH) i Administracji Bezpieczeństwa i Higieny Pracy (Occupational Safety and Health Administration – OSHA).

Najwyższe dopuszczalne stężenie srebra metalicznego w powietrzu środowiska pracy większości krajów wynosi 0,1 mg/m<sup>3</sup>. Taką wartość wskazują także eksperci Unii Europejskiej jako wartość indykacyjną. Nieliczne państwa przyjęły niższe stężenie, tj. 0,01 mg/m<sup>3</sup> (w tym Polska z wartością 0,05 mg/m<sup>3</sup>). Najwyższe dopuszczalne stężenie chwilowe (NDSch) zostało ustalone jedynie w kilku krajach. Wartości obowiązujących normatywów higienicznych przedstawiono w tabeli 2. [52].

### Dopuszczalne poziomy narażenia dla nanosrebra

Nie ma ustalonych wartości normatywów higienicznych dla nanosrebra. Oszacowano natomiast pochodne poziomy niepowodujące zmian (derived no-effect levels – DNEL). Wartości DNEL wraz z podstawami do ich oszacowania dla nanosrebra zaproponował zespół ekspertów pod kierunkiem prof. Vicki Stone w ramach projektu ENRHES (Engineered Nanoparticles: Review Health and Environmental Safety – Nanocząstki projektowane: przegląd dotyczący bezpieczeństwa i zdrowia środowiskowego) [53].

Podstawą szacowania poziomu DNEL zaproponowanego przez ekspertów ENRHES [53] jest 90-dniowe badanie przeprowadzone na szczurach narażanych inhalacyjnie (całe ciało) na cząstki srebra o średnicy 18–19 nm i stężeniu 0,6–3×10<sup>6</sup> cząstek/cm<sup>3</sup> (49–515 µg/m<sup>3</sup>) przez 6 godz. dziennie, 5 dni w tygodniu [54]. Działanie nanocząstek srebra obejmowało przede wszystkim płuca i wątrobę, dlatego ww. eksperci przyjęli 2 scenariusze, odpowiednio dla różnych efektów krytycznych.

Odpowiedź zapalna i zmiany w funkcjonowaniu płuc obserwowano już przy najniższym zastosowanym stężeniu – 49 µg/m<sup>3</sup> (0,6×10<sup>6</sup> cząstek/cm<sup>3</sup>

i 1,08×10<sup>9</sup> nm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>), dlatego stężenie to przyjęto za najniższy poziom działania toksycznego (lowest observed adverse effect level – LOAEL). Dla innych efektów, głównie ze strony wątroby, zaproponowano najwyższy poziom bez obserwowanego działania toksycznego (no observed adverse effect level – NOAEL) – 133 µg/m<sup>3</sup> (1,4×10<sup>6</sup> cząstek/cm<sup>3</sup> i 2,39×10<sup>9</sup> nm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>). Wartość ta była sugerowana także przez autorów badania stanowiącego podstawę wyznaczania DNEL [54].

### Efekt: zmiany w płucach

■ LOAEL: 49 µg/m<sup>3</sup> (0,6×10<sup>6</sup> cząstek/cm<sup>3</sup> i 1,08×10<sup>9</sup> nm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>).

Po uwzględnieniu korekty związanej z różnicami między warunkami eksperymentalnymi a środowiskiem pracy otrzymano:

■ LOAEL dla pracownika (8 godz.): 25 µg/m<sup>3</sup> (3×10<sup>5</sup> cząstek/cm<sup>3</sup> i 0,54×10<sup>9</sup> nm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>).

Ze względu na trudności w ekstrapolacji LOAEL do NOAEL zaproponowano 2 scenariusze, które uwzględniają różne współczynniki ekstrapolacji LOAEL na NOAEL, otrzymując:

■ NOAEL<sub>1</sub>: 8,2 µg/m<sup>3</sup> (1×10<sup>5</sup> cząstek/cm<sup>3</sup> i 0,18×10<sup>9</sup> nm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>),

■ NOAEL<sub>2</sub>: 2,5 µg/m<sup>3</sup> (3×10<sup>4</sup> cząstek/cm<sup>3</sup> i 0,054×10<sup>9</sup> nm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>).

Współczynnik ogólny (overall assessment factor – OAF), w którym uwzględniono różnice między i wewnątrzgatunkowe, a także ekstrapolację z narażenia podprzewlekłego do przewlekłego, wynosi:

■ OAF: 2,5×5×2 = 25,

■ DNEL<sub>1</sub>: NOAEL<sub>1</sub>/OAF – 0,33 µg/m<sup>3</sup>, (4000 cząstek/cm<sup>3</sup>; 7,2×10<sup>6</sup> nm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>),

■ DNEL<sub>2</sub>: NOAEL<sub>2</sub>/OAF – 0,098 µg/m<sup>3</sup>, (1200 cząstek/cm<sup>3</sup>; 2,2×10<sup>6</sup> nm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>).

### Efekt: zmiany w wątrobie

■ NOAEL: 133 µg/m<sup>3</sup> (1,4×10<sup>6</sup> cząstek/cm<sup>3</sup> i 2,39×10<sup>9</sup> nm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>).

Po uwzględnieniu korekty związanej z różnicami między warunkami eksperymentalnymi a środowiskiem pracy otrzymano:

■ NOAEL dla pracownika (8 godz.): 67 µg/m<sup>3</sup> (7×10<sup>5</sup> cząstek/cm<sup>3</sup> i 1,2×10<sup>9</sup> nm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>).

Współczynnik ogólny, w którym uwzględniono różnice między- i wewnątrzgatunkowe, a także ekstrapolację z narażenia podprzewlekłego do przewlekłego, wynosi:

■ OAF: 10×5×2 = 100,

■ DNEL: 0,67 µg/m<sup>3</sup> (7000 cząstek/cm<sup>3</sup> i 1,2×10<sup>7</sup> nm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>).

## Wartości referencyjne dla nanomateriałów – srebro

Eksperti Krajowego Instytutu Zdrowia Publicznego i Środowiska w Holandii (The Netherlands National Institute for Public Health and the Environment – Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu – RIVM) opracowali wartości referencyjne dla nanomateriałów (nano reference values – NRV). Nie są to obowiązujące prawnie normatywy, a jedynie wartości wskaźnikowe odpowiadające średniej ważonej stężenia dla 8-godzinnego czasu pracy oraz wartości chwilowe odpowiadające średniej ważonej stężenia dla 15-minutowego czasu pracy, i pełnią rolę tymczasowych wartości granicznych.

Wartości referencyjne dla nanomateriałów określają poziom ostrzegawczy – kiedy zostają przekroczone, należy zastosować wszystkie technicznie możliwe środki kontroli ryzyka w celu zmniejszenia narażenia [55]. Poszczególne klasy zagrożenia zostały scharakteryzowane w następujący sposób [56]:

1. Sztywne nanowłókna, trwałe w środowisku, dla których nie można wykluczyć wystąpienia efektów podobnych do działania azbestu, np. SWCNT (single-walled carbon nanotubes – jednościenne nanorurki węglowe), MWCNT (multi-walled carbon nanotubes – wielościenne nanorurki węglowe) lub włókna tlenków metali o możliwym działaniu podobnym do działania azbestu.
- 2a. Ziarnisty nanomateriał (niewłóknisty), trwałe w środowisku, o gęstości  $> 6000 \text{ kg/m}^3$ , np. cząstki Ag, Au,  $\text{CeO}_2$ ,  $\text{CoO}$ , Fe,  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ , La, Pb,  $\text{Sb}_2\text{O}_5$  lub  $\text{SnO}_2$ .
- 2b. Ziarniste nanomateriały i nanowłókna, trwałe w środowisku, o gęstości  $< 6000 \text{ kg/m}^3$ , dla których efekty działania podobne do azbestu mogą być wykluczone, np. cząstki  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ , ZnO,  $\text{CaCO}_3$ , sadza,  $\text{C}_{60}$ , dendrymery, polistyren lub nanowłókna.
3. Ziarnisty nanomateriał, nietrwały w środowisku lub rozpuszczalny w wodzie (rozpuszczalność  $> 100 \text{ mg/l}$ ), np. NaCl, cząstki lipidów, mąki lub sacharozy.

Proponowane są następujące wartości referencyjne NRV dla poszczególnych klas zagrożenia:

- klasa 1 –  $0,01 \text{ włókien/cm}^3$ ,
- klasa 2a –  $20\,000 \text{ cząstek/cm}^3$ ,
- klasa 2b –  $40\,000 \text{ cząstek/cm}^3$ ,
- klasa 3 – obowiązujące wartości OEL dla innych frakcji substancji (nie nanocząstek).

Nanocząstki srebra – jako nanomateriał ziarnisty, trwałe w środowisku, o gęstości przekraczającej  $6000 \text{ kg/m}^3$  – spełniają kryteria klasy 2a zagrożenia, dla którego zaproponowano wartość referencyjną

wynoszącą  $20\,000 \text{ cząstek/cm}^3$ . Wartość ta wymaga jednak pomiaru ilościowego stężenia cząstek.

## Propozycja oszacowania wartości NDS dla frakcji nanoobjektów srebra

W Polsce w celu określenia NDS dla substancji chemicznych ustala się graniczne poziomy narażenia – NOAEL lub LOAEL – na podstawie badań na zwierzętach doświadczalnych, jeśli wyniki badań epidemiologicznych bądź obserwacji lekarskich grup osób narażonych na czynniki chemiczne nie są dostępne. Wartości NOAEL i LOAEL oszacowane na podstawie eksperymentów [22,54,57,58] zestawiono w tabeli 3.

W celu określenia frakcji nanoobjektów autorzy niniejszego opracowania przyjęli definicje zawarte w zaleceniu Komisji Europejskiej [11] oraz specyfikacji technicznej (ISO/TS 27687:2008) [59]. Frakcja nanoobjektów to frakcja substancji zawierająca cząstki w stanie swobodnym lub w formie agregatu bądź aglomeratu, w którym co najmniej 50% lub więcej cząstek w liczbowym rozkładzie wielkości cząstek ma 1 lub więcej wymiarów w zakresie 1–100 nm, bądź frakcja, której powierzchnia właściwa przypadająca na objętość jest większa niż  $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ .

Jako podstawę wyliczeń autorzy niniejszego artykułu przyjęli 13-tygodniowy inhalacyjny eksperyment na szczurach [54]. Efekt krytyczny określono jako zmiany w wątrobie u szczurów. Jako NOAEL przyjęto stężenie wynoszące  $0,1 \text{ mg/m}^3$ . Po uwzględnieniu poszczególnych współczynników niepewności otrzymano wartość:

$$\text{NDS} = \frac{\text{NOAEL}}{A \times B \times C \times D \times E} =$$

$$= \frac{0,1 \text{ mg/m}^3}{2 \times 2 \times 2 \times 1 \times 1} = 0,0125 \approx 0,01 \text{ mg/m}^3 \quad (1)$$

gdzie:

A – współczynnik niepewności związany z wrażliwością osobniczą człowieka = 2,

B – współczynnik niepewności związany z różnicami międzygatunkowymi = 2,

C – przejście z badań podprzewlekłych do przewlekłych = 2,

D – współczynnik niepewności w przypadku stosowania NOAEL = 1,

E – współczynnik modyfikacyjny = 1.

## WNIOSKI

W Polsce, podobnie jak na świecie, nie ma obowiązujących oddzielnych normatywów higienicznych dla nanomateriałów ani nanoobjektów. Istnieją różne stano-

**Tabela 3.** Wartości NOAEL/LOAEL nanosrebra w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach  
**Table 3.** NOAEL/LOAEL values of nanosilver in experimental research on animals

Wielkość cząstek Particle size	Gatunek Species	Czas narażenia Duration of exposure	Stężenie nanosrebra Nanosilver concentration	NOAEL/LOAEL	Piśmiennictwo Reference
Droga pokarmowa / / Oral route					
42 nm	mysz ICR / ICR mice	28 dni / days	0,25; 0,5 lub 1 mg/kg mc. / / mg/kg b.w.	NOAEL – 0,5 mg/kg mc. (narząd krytyczny: nerki, działanie hepatotoksyczne) / 0,5 mg/kg b.w. (target organ: kidneys, hepatotoxicity)	57
60 nm	szczury F344/ F344 rats	90 dni / days	30, 125 lub 500 mg/kg mc. / / mg/kg b.w.	NOAEL – 30 mg/kg mc. (narząd krytyczny: wątroba) / 30 mg/kg b.w. (target organ: liver)	22
Droga inhalacyjna / / Inhalation					
20 nm	szczury Sprague-Dawley / / Sprague-Dawley rats	90 dni, 6 godz./dzień, 5 dni/tydzień / / 90 days, 6 h/day, 5 days/week	49 (0,6×10 <sup>6</sup> ), 133 (1,4×10 <sup>6</sup> ), 515 (3,0×10 <sup>6</sup> ) µg/m <sup>3</sup> (cząstek/cm <sup>3</sup> ) / / µg/m <sup>3</sup> (particles/cm <sup>3</sup> )	NOAEL – 133 µg/m <sup>3</sup> ≈ 0,1 mg/m <sup>3</sup> (narząd krytyczny: wątroba i płuca) / (target organs: liver and lungs)	54
14–15 nm	szczury Sprague-Dawley / / Sprague-Dawley rats	12 tygodni, 6 godz./dzień, 5 dni/tydzień / / 12 weeks, 6 h/day, 5 days/week	49 (0,66×10 <sup>6</sup> ), 117 (1,41×10 <sup>6</sup> ), 381 (3,24×10 <sup>6</sup> ) µg/m <sup>3</sup> (cząstek/cm <sup>3</sup> ) / / µg/m <sup>3</sup> (particles/cm <sup>3</sup> )	NOAEL – 117 µg/m <sup>3</sup> ≈ 0,1 mg/m <sup>3</sup> (narząd krytyczny: płuca) / (target organ: lungs)	58

NOAEL – najwyższy poziom bez obserwowanego działania toksycznego / no observed adverse effect level, LOAEL – najniższy poziom działania toksycznego / lowest observed adverse effect level.

wiska dotyczące szacowania dopuszczalnych poziomów narażenia. Eksperci RIVM podzielili nanomateriały na klasy, dla których opracowali wartości referencyjne NRV. Mimo wielu podobieństw w działaniu nanooobiektów różnią się jednak specyfiką działania. W przypadku nanosrebra dużą rolę w toksyczności odgrywa uwalnianie jonów srebra. Ta obserwacja skłania do traktowania nanosrebra z dużą ostrożnością i podejmowania środków kontroli ryzyka podobnie jak w przypadku rozpuszczalnych związków srebra, w których kluczową rolę odgrywa działanie formy jonowej srebra.

Grupa naukowców pod kierunkiem Stone [53] opracowała poziomy DNEL dla poszczególnych nanooobiektów, w tym również nanosrebra. Z uwagi na wysokie współczynniki modyfikacyjne stosowane przy szacowaniu wartości DNEL wyniki uzyskane dla poszczególnych substancji chemicznych są często dużo niższe w porównaniu z obowiązującymi wartościami NDS. Także w przypadku nanosrebra zaproponowana przez autorów niniejszego artykułu wartość NDS jest wyższa niż oszacowany DNEL dla narażenia zawodowego – mimo że jako podstawę do wyliczeń wykorzystano ten sam eksperyment na zwierzętach, podobny efekt krytyczny i zbliżony poziom wyjściowy (NOAEL).

W niniejszym opracowaniu podjęto próbę oszacowania wartości NDS dla srebra – frakcji nanooobiektów. Nie jest to jednak oficjalna propozycja, a jedynie zmierzenie się z problematyką ustalania wartości NDS dla substancji chemicznych występujących w skali nano. Obecnie obowiązujące w Polsce sposoby szacowania normatywów higienicznych dla chemikaliów prawdopodobnie nie wystarczają do zapewnienia właściwej ochrony przed zagrożeniami, jakie mogą stwarzać nanooobiektów w środowisku pracy. Istnieje więc potrzeba nie tylko zdefiniowania oddzielnej frakcji nanooobiektów, ale również określenia sposobów pomiaru narażenia na nanocząstki i ustalenia odpowiedniej miary (stężenie liczbowe cząstek, stężenie powierzchniowe, liczbowy rozkład wielkości cząstek).

Zaproponowane w niniejszej pracy najwyższe dopuszczalne stężenie dla nanosrebra zostało opracowane na podstawie obecnie obowiązujących zasad ustalania normatywów higienicznych. Oszacowana wartość NDS, wynosząca 0,01 mg/m<sup>3</sup>, jest równoważna z obowiązującą wartością NDS rozpuszczalnych związków srebra (jonów srebra Ag<sup>+</sup>). Ta zbieżność może wydawać się uzasadniona z uwagi na mechanizm działania nanosrebra (uwalnianie jonów), jednak proces ten nie został do końca zbadany i nie wiadomo, w jakim stopniu zachodzi.

Z innej strony nanocząstki z uwagi na swój rozmiar i właściwości mogą docierać do poszczególnych narządów, pokonując bariery biologiczne. Mogą również penetrować do wnętrza komórek i oddziaływać z makrocząsteczkami biologicznymi, co warunkuje specyficzne działanie toksyczne nanoobjektów. Trudno jest więc jednoznacznie stwierdzić, czy zaproponowana wartość mogłaby zapewnić bezpieczeństwo w pracy z nanosrebrem. Autorzy niniejszej publikacji stoją jednak na stanowisku, że obecnie obowiązująca wartość NDS dla srebra metalicznego nie zapewnia wystarczającej ochrony przed szkodliwym działaniem srebra w postaci nanoobjektów. Wartość NDS nanosrebra nie powinna przekraczać  $0,01 \text{ mg/m}^3$ .

## PIŚMIENNICTWO

1. Nowack B., Krug H.F., Height M.: 120 years of nanosilver history: Implications for policy makers. *Environ. Sci. Technol.* 2011;45(4):1177–1183, <http://dx.doi.org/10.1021/es103316q>
2. Oldenburg S.J.: Silver nanoparticles: Properties and applications [cytowany 10 kwietnia 2014]. Adres: <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html>
3. Bujak Ł.: Wzmocnienie fluorescencji układu fotosyntezy LH2 poprzez kontrolę sprzężenia plazmonowego z nanocząstkami plazmonicznymi [praca doktorska]. Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń 2013 [cytowany 16 kwietnia 2014]. Adres: <https://www.fizyka.umk.pl/wfaiis/files/Lukas%20Bujak-%20rozprawa%20doktorska.pdf>
4. 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>
5. Tsai S.-J., Ada E., Isaacs J.A., Ellenbecker M.J.: Airborne nanoparticle exposures associated with the manual handling of nanoalumina and nanosilver in fume hoods. *J. Nanopart. Res.* 2009;11:147–161, <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-008-9459-z>
6. Demou E., Peter P., Hellweg S.: Exposure to manufactured nanostructured particles in an industrial pilot plant. *Ann. Occup. Hyg.* 2008;52(8):695–706, <http://dx.doi.org/10.1093/annhyg/men058>
7. Lee J.H., Kwon M., Ji J.H., Kang C.S., Ahn K.H., Han J.H. i wsp.: Exposure assessment of workplaces manufacturing nanosized  $\text{TiO}_2$  and silver. *Inhal. Toxicol.* 2011;23(4): 226–236, <http://dx.doi.org/10.3109/08958378.2011.562567>
8. Lee J.H., Ahn K., Kim S.M., Jeon K.S., Lee J.S., Yu I.J.: Continuous 3-day exposure assessment of workplace manufacturing silver nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* 2012;14:1134–1144, <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-012-1134-8>
9. Lee J.H., Mun J., Park J.D., Yu I.J.: A health surveillance case study on workers who manufacture silver nanomaterials. *Nanotoxicology* 2012;6(6):667–669, <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2011.600840>
10. Jankowska E., Łukaszewska J.: Potencjalne narażenie na nanocząstki srebra podczas rozpylania preparatu do czyszczenia klimatyzacji. *Med. Pr.* 2013;64(1):57–67, <http://dx.doi.org/10.13075/mp.5893/2013/0007>
11. Zalecenie Komisji z dnia 18 października 2011 r. dotyczące definicji nanomateriału. *DzUrz UE* z 2011 r. L 275/38–40
12. Świdwińska-Gajewska A., Czerczak S.: Nanosrebro – szkodliwe skutki działania biologicznego. *Med. Pr.* 2014; 65(6):831–845, <http://dx.doi.org/10.13075/mp.5893.00114>
13. 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>
14. 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
15. 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, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.01109s4547>
16. 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>
17. 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>
18. 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>
19. 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>

20. Koochi M., Hejazy M.F., Asadian P.: Assessment of dermal exposure and histopathologic changes of different sized nano-silver in healthy adult rabbits. *J. Phys. Conf. Ser.* 2011;304:012028, <http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/304/1/012028>
21. 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>
22. 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>
23. 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.* 2012;745(1–2):4–10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.010>
24. Park M.V., Neigh A.M., Vermeulen J.P., de la Fonteyne L.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>
25. Tavares P., Balbinot F., de Oliveira H.M., Fagundes G.E., Venancio 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>
26. 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
27. 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>
28. Gromadzka-Ostrowska J., Dziendzikowska K., Lankoff 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.toxiclet.2012.08.028>
29. 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
30. 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>
31. 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>
32. 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.toxiclet.2012.01.001>
33. Lee H.Y., Choi Y.J., Jung E.J., Yin H.Q., Kwon J.T., Kim J.E. i wsp.: Genomics-based creening of differentially expressed genes in the brains of mice exposed to silver nanoparticles via inhalation. *J. Nanopart. Res.* 2010;12:1567–1578, <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-009-9666-2>
34. Fu P.P., Xia Q., Hwang H.-M., Ray P.C., Yu H.: Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *J. Food Drug Anal.* 2014;22(1):64–75, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.005>
35. McShan D., Ray P.C., Yu H.: Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J. Food Drug Anal.* 2014;22(1):116–127, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010>
36. AshaRani P.V., Hande M.P., Valiyaveetil S.: Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol.* 2009;10:65, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2121-10-65>
37. AshaRani P.V., Low Kah Mun G., Hande M.P., Valiyaveetil S.: Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 2009;3(2):279–290, <http://dx.doi.org/10.1021/nn800596w>
38. Hsin Y.H., Chen C.F., Huang S., Shih T.S., Lai P.S., Chueh P.J.: The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett.* 2008;179(3):130–139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxiclet.2008.04.015>
39. Park E.J., Yi J., Kim Y., Choi K., Park K.: Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a trojan-horse type mechanism. *Toxicol. In Vitro* 2010;24(3):872–878, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.12.00>
40. Cheng X., Zhang W., Ji Y., Meng J., Guo H., Liu J. i wsp.: Revealing silver cytotoxicity using Au nanorods/Ag shell nanostructures: Disrupting cell membrane and causing apoptosis through oxidative damage. *RSC Adv.* 2013;3:2296–2305, <http://dx.doi.org/10.1039/c2ra23131j>
41. Baruwati B., Simmons S.O., Varma R.S., Veronesi B.: “Green” synthesized and coated nanosilver alters the membrane permeability of barrier (intestinal, brain endothelial) cells and stimulates oxidative stress path-

- ways in neurons. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2013;1(7):753–759, <http://dx.doi.org/10.1021/sc400024a>
42. Haase A., Rott S., Manton A., Graf P., Plendl J., Thüne-mann A.F. i wsp.: Effects of silver nanoparticles on primary mixed neural cell cultures: Uptake, oxidative stress and acute calcium responses. *Toxicol. Sci.* 2012;126(2): 457–468, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfs003>
43. Shannahan J.H., Lai X., Ke P.C., Podila R., Brown J.M., Witzmann F.A.: Silver nanoparticle protein corona composition in cell culture media. *PLoS One* 2013;8(9):e74001, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0074001>
44. Gnanadhas D.P., Ben Thomas M., Thomas R., Raichur A.M., Chakravorty D.: Interaction of silver nanoparticles with serum proteins affects their antimicrobial activity *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(10):4945–4955, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00152-13>
45. Mahato M., Pal P., Tah B., Ghosh M., Talapatra G.B.: Study of silver nanoparticle-hemoglobin interaction and composite formation. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011;88(1):141–149, <http://dx.doi.org/10.1016/j.col-surf.2011.06.024>
46. Da Silva Paula M.M., da Costa C.S., Baldin M.C., Scaini G., Rezin G.T., Segala K. i wsp.: *In vitro* effect of silver nanoparticles on creatine kinase activity. *J. Braz. Chem. Soc.* 2009;20(8):1556–1560, <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532009000800024>
47. Rahban M., Divsalar A., Saboury A.A., Golestani A.: Nanotoxicity and spectroscopy studies of silver nanoparticle: Calf thymus DNA and K562 as targets. *J. Phys. Chem. C* 2010;114(13):5798–5803, <http://dx.doi.org/10.1021/jp910656g>
48. Piao M.J., Kim K.C., Choi J.Y., Choi J., Hyun J.W.: Silver nanoparticles down-regulate Nrf2-mediated 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 through inactivation of extracellular regulated kinase and protein kinase B in human Chang liver cells. *Toxicol. Lett.* 2011;207(2):143–148, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.09.002>
49. McShan D., Ray P.C., Yu H.: Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J. Food Drug Anal.* 2014;22(1):116–127, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010>
50. Lee T.Y., Liu M.S., Huang L.J., Lue S.I., Lin L.C., Kwan A.L. i wsp.: Bioenergetic failure correlates with autophagy and apoptosis in rat liver following silver nanoparticle intraperitoneal administration. *Part. Fibre Toxicol.* 2013;10:40, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-10-40>
51. 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
52. GESTIS-database on hazardous substances – DGUV – International limit values for chemical agents [Internet]: Occupational Exposure Limits (OELs) [cytowany 27 listopada 2014]. Adres: [http://limitvalue.ifa.dguv.de/Webform\\_gw.aspx](http://limitvalue.ifa.dguv.de/Webform_gw.aspx)
53. Stone V. [red.]: Engineered nanoparticles: Review health and environmental safety. ENRHES 2009 [cytowany 10 kwietnia 2014]. Adres: [http://www.temas.ch/IMPART/IMPARTProj.nsf/7903C02E1083D0C3C12576C-C003DD7DE/\\$FILE/ENRHES+Review.pdf?OpenElement&enetarea=03](http://www.temas.ch/IMPART/IMPARTProj.nsf/7903C02E1083D0C3C12576C-C003DD7DE/$FILE/ENRHES+Review.pdf?OpenElement&enetarea=03)
54. 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>
55. Cornelissen R., Jongeneelen F., van Broekhuizen P., van Broekhuizen F.: Working safely with engineered nanomaterials and nanoproducts. A guide for employers and employees. Version 4.2 – August 2012 [cytowany 12 czerwca 2014]. Adres: [http://www.tappinano.org/pdf/J771\\_NanoWorkSafetyGuidance.pdf](http://www.tappinano.org/pdf/J771_NanoWorkSafetyGuidance.pdf)
56. Van Broekhuizen P., van Broekhuizen F., Cornelissen R., Reijnder L.: Workplace exposure to nanoparticles and the application of provisional nanoreference values in times of uncertain risks. *J. Nanopart. Res.* 2012;14:770, <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-012-0770-3>
57. 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>
58. 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-induced 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>
59. ISO/TS 27687. Nanotechnologies – Terminology and definitions for nano-objects – Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. International Organization for Standardization, Geneva 2008