



## รายงานการวิจัย

แผนงานวิจัยองค์ความรู้ด้านความปลอดภัยนาโนโลหะ  
โครงการวิเคราะห์ประเมินองค์ความรู้ด้านความปลอดภัยนาโนโลหะ  
กรณีความเป็นพิษของอนุภาคโลหะเงินนาโนในเซลล์มนุษย์

Zero Valent Metal Nanosafety Knowledge Analysis and Assessment:  
The case of nanosilver toxicity in human cells

โดย

นายเลอสรร ธนสุกาญจน์  
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

จัดพิมพ์เมื่อ พ.ศ. 2555

ISBN: 978-616-551-563-4





## รายงานการวิจัย

แผนงานวิจัยองค์ความรู้ด้านความปลอดภัยนาโนโลหะ  
โครงการวิเคราะห์ประเมินองค์ความรู้ด้านความปลอดภัยนาโนโลหะ  
กรณีความเป็นพิษของอนุภาคโลหะเงินนาโนในเซลล์มนุษย์

Zero Valent Metal Nanosafety Knowledge Analysis and Assessment:

The case of nanosilver toxicity in human cells

โดย

นายเลอสรร ธนสุกาญจน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

จัดพิมพ์เมื่อ พ.ศ. 2555

ISBN: 978-616-551-563-4

รายงานการวิจัย

แผนงานวิจัยองค์ความรู้ด้านความปลอดภัยนาโนโลหะ

โครงการวิเคราะห์ประเมินองค์ความรู้ด้านความปลอดภัยนาโนโลหะ

กรณีความเป็นพิษของอนุภาคโลหะเงินนาโนในเซลล์มนุษย์

Zero Valent Metal Nanosafety Knowledge Analysis and Assessment:

The case of nanosilver toxicity in human cells

หัวหน้าโครงการและนักวิจัย

ดร. เลอสรร ธนสุกาญจน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่ปรึกษาโครงการ

ศ. ดร. สุพจน์ หารหนองบัว

คณบดี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศ. ดร. สุวบุญ จิราญชัย

สถาบันโลหะและวัสดุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร. ศิริศักดิ์ เทพาคำ

รองผู้อำนวยการ ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ

ดร. ณัฐพันธุ์ ศุภกา

หัวหน้าหน่วยบริการวิเคราะห์ทดสอบ ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ

ดร. รวิวรรณ มณีรัตนโชติ

หัวหน้าห้องปฏิบัติการความปลอดภัยนาโนเทคโนโลยี ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ

ศ. กิตติคุณ ดร. นิกร ดุสิตสิน

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการวิเคราะห์ความเสี่ยงจากสารพิษสิ่งแวดล้อมระดับชุมชน

รศ. ดร. พาลาภ สิงหเสนี

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการวิเคราะห์ความเสี่ยงจากสารพิษสิ่งแวดล้อมระดับชุมชน

**ผู้ทรงลิขสิทธิ์**

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ISBN: 978-616-551-563-4

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ  
ประจำปีงบประมาณ 2553



# บทคัดย่อ

โครงการวิเคราะห์ประเมินองค์ความรู้ด้านความปลอดภัยนาโนโลหะ กรณีความเป็นพิษของอนุภาคโลหะเงินนาโนในเซลล์มนุษย์ (Zero Valent Metal Nanosafety Knowledge Analysis and Assessment: The case of nanosilver toxicity in human cells)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี พ.ศ. 2553 จำนวนเงิน 800,000.00 บาท (แปดแสนบาทถ้วน)  
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 29 ตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึง 28 ตุลาคม พ.ศ. 2554

ชื่อผู้วิจัย นายเลอสร ธรสุกาญจน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
โทรศัพท์ 0-2218-5424

**ปัญหา วัตถุประสงค์ และวิธีดำเนินการ** เป็นเวลาเกือบหนึ่งทศวรรษ ที่ประเทศไทยมีการใช้วัสดุนาโนในทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุภาคโลหะนาโน (zero valent metal nanoparticles) ได้ถูกใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาเคลือบผิวของเส้นใย และของผงซักฟอกเป็นต้น ซึ่งนับวันแต่จะมีการใช้งานเป็นจำนวนมากขึ้น รวมทั้งการใช้งานในทางแพทย์ของอนุภาคโลหะทองคำนาโน และการใช้อนุภาคโลหะเหล็กนาโนในการบำบัดน้ำเสียด้วย ในขณะที่ไทยยังขาดแคลนองค์ความรู้ที่เกี่ยวกับความปลอดภัยของอนุภาคโลหะนาโน โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการสืบค้น ประมวล และวิเคราะห์องค์ความรู้เกี่ยวกับความปลอดภัยของอนุภาคโลหะนาโน ซึ่งเริ่มต้นด้วยกรณีศึกษาเกี่ยวกับอนุภาคโลหะเงินนาโน (nanosilver หรือ silver nanoparticles) และจำกัดไว้เฉพาะองค์ความรู้ที่ได้มาจากการทดลองในเซลล์ของมนุษย์ โดยได้ดำเนินการสืบค้นเอกสาร หาเอกสารฉบับเต็มมาเพื่ออ่านวิเคราะห์ จำกัดวงของเอกสารให้อยู่ในจำนวนที่สามารถวิเคราะห์ได้ ดำเนินการวิเคราะห์เนื้อหาไปพร้อมกับการกำหนดระดับของความน่าเชื่อถือของเอกสารที่นำมาวิเคราะห์ แล้วสรุปออกมาเป็นส่วนหนึ่งของระเบียบวิธีทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการศึกษาความปลอดภัยของอนุภาคเงินนาโน กับผลของการทดลองหาความเป็นพิษในเซลล์ของมนุษย์

**ผลการศึกษา** การทำลายและความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุภาคโลหะเงินนาโนขึ้นกับระดับความเข้มข้นของอนุภาค อนุภาคโลหะเงินนาโนก่อให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและการตายอย่างเป็นระบบของเซลล์ ทั้งยังมีอิทธิพลต่อการปลดปล่อยสัญญาณเคมีจากเซลล์ ต่อการส่งสัญญาณเคมีเข้าเซลล์ ต่อการเคลื่อนที่ตอบสนองต่อสัญญาณเคมีจากเซลล์อื่น และต่อความเสียหายของโครโมโซม ชีวโมเลกุล และวัฏจักรของเซลล์ โดยที่ในภาพรวม อนุภาคโลหะเงินนาโนออกฤทธิ์ต่อไขมันในเยื่อเซลล์และต่อความเครียดออกซิเดชัน ที่ส่งผลไปถึงการรื้อของเยื่อหุ้มเซลล์ การชำรุดของโครโมโซม และความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย ซึ่งในที่สุดนำไปสู่กลไกการกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติของร่างกายตามลำดับ อนึ่ง นอก

เหนือจากผลการสรุปเอกสารดังกล่าวแล้ว โครงการวิจัยนี้ ยังเป็นตัวอย่างทางระเบียบวิธีของการสืบค้น และอ่านวิเคราะห์เอกสารอีกด้วย

**ข้อเสนอแนะ** ควรให้มีการศึกษาต่อเนื่อง ขยายขอบเขตการศึกษาให้ครอบคลุมถึงข้อมูลจากการทดลองในสิ่งมีชีวิตอื่น และขยายออกไปยังอนุภาคนาโนชนิดอื่นๆ ด้วย นอกจากนั้นควรทดลองคำนวณมาตรฐานจากข้อมูลที่สืบค้นและสกัดได้ เพื่อสร้างองค์ความรู้และประเมินผลกระทบ และควรมีมาตรการส่งเสริมการสร้างองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์และพิษวิทยาของอนุภาคนาโนที่เกี่ยวข้องกับประเทศไทย ทั้งในแง่ของสุขภาพและในแง่สิ่งแวดล้อม

**Background, Objectives and Methodology** This project aims to gather and analyze research publications on the toxicology of silver nanoparticles in cells of human origin. The methodology involves bibliographic search and prioritization, critical reading of full-text articles, and determination of reliability both subjectively by expert opinion and objectively by using a modified Klimish Code. The methodology used in these toxicological studies are reviewed, followed by a description of the impacts found in different systems or cell organelles, including the overall mechanism of silver nanoparticles toxicity in human cells.

**Results** Silver nanoparticles affect the viability of human cells in a dose-response manner through oxidative stress and apoptosis. These nanoparticles exert inhibitory effects on the release of certain cytokines as well as disruptive action on intracellular calcium homeostasis. Chemotaxis is also inhibited at approximately the cytotoxic nanoparticle concentration. Moreover, silver nanoparticles have been shown to damage biomolecules including lipids, proteins, and DNA, leading to cell cycle arrests. Lipid oxidation and oxidative stress lead to cell membrane leakage, chromosomal damage, and mitochondrial injury, which in turn trigger apoptosis.

**Recommendations** (1) This pilot compilation should be expanded to include experimental results from other cell types and with other types of nanomaterials. (2) Safety levels of human exposure to a specific type of nanoparticle should be formulated based on results from human and animal studies using internationally accepted prediction models. (3) Public research money should be allocated for toxicological studies of nanoparticles in the health and environmental context related to Thailand.



# คำสำคัญ

toxicology, nanomaterial, nanoparticle, nanosilver, nano-silver, silver nanoparticle, apoptosis, lipid peroxidation, chromosomal damage, oxidative stress



# สารบัญ

|                                                                        |      |
|------------------------------------------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ                                                        | V    |
| บทคัดย่อ                                                               | VII  |
| คำสำคัญ                                                                | IX   |
| สารบัญ                                                                 | XI   |
| สารบัญตาราง                                                            | XIII |
| สารบัญรูป                                                              | XV   |
| คำอธิบายตัวย่อ                                                         | XVII |
| บทนำรวม                                                                | XIX  |
| 1. ความเป็นมาและระเบียบวิธีวิจัย                                       | 1    |
| 1.1. ความเป็นมาและวัตถุประสงค์                                         | 1    |
| 1.2. ขั้นตอนการดำเนินงาน                                               | 3    |
| 1.3. ระเบียบวิธีวิจัย                                                  | 3    |
| 2. การสังเคราะห์และลักษณะของอนุภาคโลหะเงินนาโน                         | 8    |
| 2.1. วิธีการสังเคราะห์อนุภาคโลหะเงินนาโน                               | 9    |
| 2.2. ขนาดของอนุภาคโลหะเงินนาโน                                         | 13   |
| 2.3. การเคลือบผิวอนุภาคโลหะเงินนาโน                                    | 14   |
| 2.4. การจับตัวกันของอนุภาคโลหะเงินนาโน                                 | 15   |
| 2.5. การแตกตัวของอนุภาคโลหะเงินนาโนออกเป็นอนุมูลเงิน ( $\text{Ag}^+$ ) | 16   |
| 3. ประเภทของเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย                                      |      |
| 4. การทำลายเซลล์และความเป็นพิษต่อเซลล์                                 | 23   |
| 4.1. หลักการทดสอบ                                                      | 23   |
| 4.2. รายงานผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง                                     | 28   |
| 5. การลำเลียงอนุภาคโลหะเงินนาโนเข้าและออกจากเซลล์                      | 33   |
| 5.1. หลักการทดสอบ                                                      | 33   |
| 5.2. รายงานผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง                                     | 35   |
| 6. ความเครียดออกซิเดชัน และการตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ                 | 39   |
| 6.1. หลักการทดสอบ                                                      | 39   |

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.2.รายงานผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง                                                                        | 43 |
| 7. การปล่อยสัญญาณเคมีจากเซลล์ การส่งสัญญาณเคมีเข้าเซลล์ และการเคลื่อนที่ตอบสนองต่อสัญญาณเคมีจากเซลล์อื่น | 47 |
| 7.1.หลักการทดสอบ                                                                                         | 47 |
| 7.2.รายงานผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง                                                                        | 49 |
| 8. ความเสียหายของโครโมโซม ชีวโมเลกุล และวัฏจักรของเซลล์                                                  | 52 |
| 8.1.หลักการทดสอบ                                                                                         | 52 |
| 8.2.รายงานผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง                                                                        | 55 |
| 9. สรุปความเป็นพิษของอนุภาคโลหะเงินนาโนต่อเซลล์ของมนุษย์                                                 | 59 |
| 9.1.ความเป็นพิษของ AgNP มาจากการปลดปล่อย Ag <sup>+</sup> ลงไปในสารละลายหรือไม่                           | 59 |
| 9.2.กลไกความเป็นพิษของ AgNP กับ lipid peroxidation                                                       | 59 |
| 9.3.กลไกความเป็นพิษของ AgNP กับไมโทคอนเดรีย                                                              | 60 |
| 9.4.กลไกความเป็นพิษของ AgNP กับความเครียดออกซิเดชัน                                                      | 60 |
| 9.5.กลไกความเป็นพิษของ AgNP กับดีเอ็นเอและโครโมโซม                                                       | 60 |
| 9.6.ความเชื่อมโยงของกลไกความเป็นพิษของ AgNP                                                              | 61 |
| 9.7.ระดับมาตรฐานความปลอดภัยของ AgNP ในมนุษย์                                                             | 62 |
| 9.8.ข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย                                                                                 | 62 |

## ภาคผนวก

|                                                     |      |
|-----------------------------------------------------|------|
| 1. ผลจากการคัดกรองเอกสารชั้นที่ 3                   | A1-1 |
| 2. รายละเอียดการจัดกลุ่มเอกสารจากการคัดกรองรอบที่ 3 | A2-1 |
| 3. ตารางคัดกรองเอกสารในรอบที่ 4                     | A3-1 |

# สารบัญตาราง

|              |                                                                                                     |    |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ตารางที่ 1.1 | ขั้นตอนการดำเนินงานของโครงการฯ                                                                      | 3  |
| ตารางที่ 1.2 | Code of Reliability (CoR) หรือ Modified Klimish Code<br>ที่ใช้ในการให้คะแนนความน่าเชื่อถือของเอกสาร | 7  |
| ตารางที่ 2.1 | Standard Reduction Potential                                                                        | 10 |
| ตารางที่ 2.2 | Reduction Potential ของสารกลุ่ม phenoxy และ flavonoid ที่พบในพืช                                    | 12 |



# สารบัญรูปและแผนภูมิ

|            |                                                    |    |
|------------|----------------------------------------------------|----|
| รูปที่ 1.1 | กราฟแสดงการเพิ่มจำนวนของเอกสารในช่วงปี 2004-2010   | 4  |
| รูปที่ 9.1 | แผนที่องค์ความรู้ เชื่อมโยงกลไกความเป็นพิษของ AgNP | 61 |





# คำอธิบายตัวย่อ

|                  |                                                                                                              |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AgNP             | silver nanoparticles<br>อนุภาคโลหะเงินนาโน                                                                   |
| ANS              | 1-anilino-8- naphthalene sulfonate                                                                           |
| ATP              | adenosine triphosphate                                                                                       |
| CBMN             | cytokinesis-blocked micronucleus assay                                                                       |
| CoR              | Code of Reliability                                                                                          |
| DCF-DA           | 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate                                                                   |
| DHE              | dihydroethidium                                                                                              |
| DLS              | Dynamic Light Scattering                                                                                     |
| EDX Spectroscopy | energy dispersive x-ray spectroscopy                                                                         |
| hMSC             | human mesenchymal stem cells                                                                                 |
| IMR              | (Coriell) Institute of Medical Research                                                                      |
| N.A.             | not applicable                                                                                               |
| NP               | nanoparticles<br>อนุภาคนาโน                                                                                  |
| PBMC             | human peripheral blood mononuclear<br>cells                                                                  |
| PBS              | Phosphate Buffer Saline                                                                                      |
| PHA              | phytohemagglutinin                                                                                           |
| PI               | propidium iodide                                                                                             |
| ppm              | part per million                                                                                             |
| PRP              | platelet-rich plasma                                                                                         |
| PVP              | polyvinylpyrrolidone                                                                                         |
| ROS              | reactive oxygen species                                                                                      |
| RT-PCR           | real-time polymerase chain reaction                                                                          |
| SEM              | scanning electron microscopy<br>scanning electron microscope<br>กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด         |
| STEM             | scanning transmission electron<br>microscope<br>scanning transmission electron<br>microscopy                 |
| TEM              | transmission electron microscopy<br>transmission electron microscope<br>กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน |
| TNF              | tumor necrosis factor                                                                                        |
| VEGF             | vascular endothelial growth factor                                                                           |



# บทนำรวม

## แผนงานวิจัยองค์ความรู้ด้านความปลอดภัยนาโนโลหะ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เป็นเวลาเกือบหนึ่งทศวรรษ ที่ประเทศไทยมีการใช้วัสดุนาโนในทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุภาคโลหะนาโน (zero valent metal nanoparticles) ได้ถูกใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาเคลือบผิวของเส้นใย และของผงซักฟอกเป็นต้น ซึ่งนับวันแต่จะมีการใช้งานเป็นจำนวนมากขึ้น รวมทั้งการใช้งานในทางแพทย์ของอนุภาคโลหะทองคำนาโน และการใช้อนุภาคโลหะเหล็กนาโนในการบำบัดน้ำเสียด้วย ในขณะที่ไทยยังขาดแคลนองค์ความรู้ที่เกี่ยวกับความปลอดภัยของอนุภาคโลหะนาโน

### วัตถุประสงค์ของแผนงานวิจัย

แผนงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ ในการสืบค้น ประมวล และวิเคราะห์องค์ความรู้เกี่ยวกับความปลอดภัยของอนุภาคโลหะนาโน เพื่อสร้างเป็นแผนที่องค์ความรู้ขึ้น (วัตถุประสงค์นี้ เป็นวัตถุประสงค์ที่ได้รับการปรับแก้แล้ว หลังจากได้รับอนุมัติทุนวิจัยเฉพาะโครงการย่อยที่ 1)

### รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย

เมื่อแรกยื่นข้อเสนอโครงการใน พ.ศ. 2553 นั้น แผนงานวิจัยนี้ประกอบด้วย 2 โครงการวิจัยย่อย โครงการวิจัยย่อยที่ 1 เป็นการสืบค้น รวบรวม และสกัดองค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของอนุภาคโลหะเงินนาโน

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการพิษวิทยา เพื่อเสริมสร้างองค์ความรู้ เกี่ยวกับความปลอดภัยของอนุภาคโลหะเงินนาโน

อย่างไรก็ตาม คณะผู้ตรวจสอบทางวิชาการ ได้อนุมัติทุนวิจัยให้เฉพาะโครงการวิจัยย่อยที่ 1 ทำให้แผนงานวิจัยนี้ ประกอบด้วยโครงการวิจัยย่อยเพียงโครงการเดียว

ต่อมา ในระหว่างการนำเสนอรายงานความก้าวหน้าของโครงการ ครั้งที่ 1 คณะผู้ตรวจสอบทางวิชาการได้กระชับขอบเขตของโครงการฯ ให้แคบเข้า จากการวิเคราะห์องค์ความรู้ที่เป็นผลการทดลองในเซลล์ทุกชนิด เป็นการวิเคราะห์องค์ความรู้จากการทดลองในเซลล์ของมนุษย์เท่านั้น นอกจากนั้นยังให้คงชื่อแผนงานวิจัย “แผนงานวิจัยองค์ความรู้ด้านความปลอดภัยนาโนโลหะ” (Zero Valent Metal Nanosafety Knowledge Research) แต่เปลี่ยนชื่อโครงการวิจัยเป็น “โครงการวิเคราะห์ประเมินองค์ความรู้ด้านความปลอดภัยนาโนโลหะ: กรณีความเป็นพิษของ

อนุภาคโลหะเงินนาโนในเซลล์มนุษย์” (Zero Valent Metal Nanosafety Knowledge Analysis and Assessment: Toxicity of silver nanoparticles in human cells)

## ประโยชน์ที่ได้รับ

ระดับแรก เป็นประโยชน์ที่จะตกแก่หน่วยงาน ที่สามารถนำองค์ความรู้ไปใช้ประโยชน์ตามพันธกิจของหน่วยงานนั้นๆ ได้โดยตรง เช่น กระทรวงสาธารณสุขใช้ในการจัดการสารเคมี กระทรวงเกษตรใช้ในการจัดการสารเคมีเกษตร กระทรวงแรงงานใช้ในมาตรการรักษาสุขภาพของผู้ใช้แรงงาน สำนักงานคณะกรรมการคุ้มครองผู้บริโภคใช้ในการคุ้มครองผู้บริโภคจากอันตรายของสารนาโนในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เป็นต้น นอกจากนี้ กระทรวงพาณิชย์ด้วยความร่วมมือของกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ยังสามารถใช้องค์ความรู้นี้เป็นพื้นฐานในการเจรจาทางการค้าระหว่างประเทศที่เกี่ยวข้องกับสินค้าที่มีวัสดุนาโนเป็นองค์ประกอบได้ด้วย

ระดับต่อมา เป็นประโยชน์ที่จะตกแก่ประชาชน อันเป็นกลุ่มเป้าหมายที่จะได้รับประโยชน์ ไม่ว่าจะเป็นประชาชนที่เป็นผู้ใช้แรงงาน ประชาชนส่วนใหญ่ที่ใช้สินค้าเช่นเครื่องสำอางที่มีวัสดุนาโนเป็นส่วนผสม หรือประชาชนทั่วไป ซึ่งมีสุขภาพขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมที่สะอาด เป็นต้น

ระดับสูงสุด เป็นประโยชน์ต่อเศรษฐกิจและสังคมมหภาค ผ่านทางคุณภาพของสิ่งแวดล้อม คุณภาพชีวิตของผู้ใช้แรงงาน คุณภาพชีวิตของผู้บริโภค ตลอดจนความสามารถแข่งขันในตลาดโลกของสินค้าไทย

ประโยชน์ดังกล่าวข้างต้นอาจอธิบายในรายละเอียดได้ ดังนี้

- นักวิทยาศาสตร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งนักวิทยาศาสตร์ที่ร่วมเป็นผู้ทรงคุณวุฒิอ่านวิเคราะห์ประเมินเอกสาร จะได้รับองค์ความรู้ในสาขาของตน ซึ่งจะเสริมสร้างความเชี่ยวชาญในสาขานั้นๆ
- นักวิทยาศาสตร์ไทยได้เห็นแนวทางของการศึกษาพฤติกรรมของอนุภาคนาโน ซึ่งจะนำไปประยุกต์ใช้กับอนุภาคนาโนชนิดอื่น ที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมไทยได้
- ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ และ/หรือ คณะกรรมการนาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สามารถใช้องค์ความรู้จากแผนงานวิจัยนี้เป็นฐานของโครงการสร้างความตระหนักรู้ด้านความปลอดภัยนาโน
- ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ และ/หรือ คณะกรรมการนาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สามารถนำองค์ความรู้จากแผนงานวิจัยนี้ ไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการเจรจาระหว่างประเทศ เกี่ยวกับความปลอดภัยของนาโนเทคโนโลยี และวัสดุนาโน เช่น ในเวทีของ OECD Working Party on Manufactured Nanomaterials (OECD-WPMN)

- กระทรวงสาธารณสุข จะเป็นผู้ใช้รายใหญ่ ที่จะนำองค์ความรู้ที่ได้ ไปสนับสนุนการกำกับดูแล ทั้งในส่วนของยา อาหาร เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์
- กระทรวงสาธารณสุข สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ ไปสนับสนุนการเจรจาระหว่างประเทศ เกี่ยวกับความปลอดภัยของสารเคมีต่อสุขภาพ เช่น ในเวที Intergovernmental Forum on Chemical Safety (IFCS)
- กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม สามารถนำองค์ความรู้ ซึ่งเป็นผลของการวิจัยนี้ ไปใช้สนับสนุนการกำกับดูแลคุณภาพสิ่งแวดล้อม รวมทั้งการออกกฎหมายระเบียบข้อบังคับ และแนวปฏิบัติต่าง ๆ
- กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม สามารถนำองค์ความรู้ ซึ่งเป็นผลของการวิจัยนี้ ไปใช้ประกอบในการเจรจาระหว่างประเทศเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม เช่น ในเวทีของสหประชาชาติ (SAICM-ICCM)
- กระทรวงแรงงาน และกระทรวงอุตสาหกรรม สามารถนำผลจากโครงการวิจัยนี้ ไปใช้ในสนับสนุนการพัฒนามาตรฐานด้านชีวอนามัย
- สำนักงานคณะกรรมการคุ้มครองผู้บริโภค สามารถนำผลของโครงการนี้ ไปใช้ในการออกมาตรฐานควบคุมฉลากของผลิตภัณฑ์นาโน เป็นต้น
- ผู้ใช้แรงงานซึ่งเป็นผู้มีส่วนได้เสีย จะลดความเสี่ยงด้านความปลอดภัยและสุขภาพจากวัสดุนาโน และผลิตภัณฑ์นาโน
- ประชาชนทั่วไปในฐานะผู้บริโภค ซึ่งเป็นผู้มีส่วนได้เสีย จะลดความเสี่ยงด้านความปลอดภัยของวัสดุนาโน และจะสามารถเลือกซื้อสินค้าได้อย่างฉลาดขึ้น
- ประชาชนทั่วไป ซึ่งเป็นผู้มีส่วนได้เสีย จะได้รับประโยชน์ต่อสุขภาพ ผ่านทางสิ่งแวดล้อมที่ได้รับการจัดการที่ดีขึ้นจากองค์ความรู้ที่ได้รับจากแผนงานนี้
- ประชาชนที่ทำธุรกิจหลายแขนง ซึ่งเป็นผู้มีส่วนได้เสีย จะได้ประโยชน์ผ่านการเจรจาการค้าระหว่างประเทศโดยหน่วยงานของรัฐที่กล่าวถึงข้างต้น ซึ่งอาศัยองค์ความรู้จากโครงการนี้ ทำให้ไทยไม่เสียเปรียบต่างชาติ

อนึ่ง คณะผู้ตรวจสอบทางวิชาการ ได้สรุปประโยชน์ที่จะได้รับจากผลงานวิจัยว่า “ได้ข้อมูลที่จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่ทำงานวิจัยทางด้านนาโนเพื่อความปลอดภัยของผู้ใช้งาน [เนื่องจาก] ความเป็นพิษของ AgNP [ที่] ยังไม่เป็นที่ประจักษ์ในสาธารณชนมากนัก เพราะยังมีการนำเสนอผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในชีวิตประจำวัน ซึ่งมนุษย์มีโอกาสสัมผัสได้มากอย่างต่อเนื่องทั้ง ๆ ที่ผลพิสูจน์ความปลอดภัยยังไม่เด่นชัด”

## หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม  
กระทรวงแรงงาน กระทรวงอุตสาหกรรม สำนักงานคณะกรรมการคุ้มครองผู้บริโภค

ตามความเห็นของคณะผู้ตรวจสอบทางวิชาการ หน่วยงานที่ควรแนะนำให้ นำผลงานวิจัยนี้ไปใช้ประโยชน์ ได้แก่

- หน่วยงานวิจัยด้านนาโนภายในประเทศ
- มหาวิทยาลัยที่สอนเกี่ยวกับพิษวิทยา ชีววิทยา
- ภาคเอกชนที่คิดจะนำเสนอผลิตภัณฑ์ที่มี AgNP

# 1. ความเป็นมาและระเบียบวิธีวิจัย

## 1.1. ความเป็นมาและวัตถุประสงค์

ปัญหาเรื้อรังที่ไทยต้องเผชิญในหลายปีที่ผ่านมา คือความขาดแคลนข้อมูลและองค์ความรู้เกี่ยวกับความปลอดภัยของวัสดุนาโน ซึ่งนอกจากจะแทบไม่มีผลงานวิจัยในประเทศแล้ว ผลงานวิจัยหลายชิ้นขึ้นเกี่ยวกับความปลอดภัยของวัสดุนาโนที่ได้รับการตีพิมพ์ในต่างประเทศ ก็ไม่อาจเข้าถึงได้โดยสะดวก (หลายเรื่องไม่มีในเครือข่ายอินเทอร์เน็ต หรือเก็บค่าเข้าชมหลายสิบเหรียญสหรัฐต่อเรื่อง) แต่ที่แย่กว่าก็คือ ผลงานวิจัยบางชิ้นยังขัดแย้งกันเอง ไม่เช่นนั้นก็ใช้วัสดุนาโนที่แตกต่างกัน หรือใช้วัสดุเหมือนกันแต่ทำในสภาวะต่างกัน จนเป็นการยากที่จะนำผลการวิจัยมาเทียบเคียงกันได้โดยตรง และปริมาณของเอกสารเป็นอุปสรรคต่อการอ่านให้ได้ใจความครอบคลุม

เนื่องจากอนุภาคนาโนที่เป็นโลหะที่มีวาเลนซ์เท่ากับศูนย์ (zeo valent metal nanoparticles) เริ่มมีการใช้มากในประเทศไทย เช่น การผสมอนุภาคเงินนาโน (nanosilver) ลงในผงซักฟอก และมีแนวโน้มที่จะมีการใช้มากขึ้นเรื่อยๆ เช่น การใช้อนุภาคทองคำนาโน (nanogold) ในการตรวจโรค ตรวจสุขภาพ และในเครื่องสำอาง เป็นต้น โครงการนี้จึงจะเริ่มเน้นที่องค์ความรู้ของความปลอดภัยนาโนในส่วนของโลหะที่มีวาเลนซ์เท่ากับศูนย์

โครงการนี้ มีความตั้งใจแต่ดั้งเดิม เพื่อรวบรวมเอกสารเกี่ยวกับความปลอดภัยนาโนของอนุภาคโลหะ ซึ่งแทบทั้งหมดเป็นเอกสารจากต่างประเทศ กรองเบื้องต้นตามความสำคัญและความสามารถในการเข้าถึงให้เหลือจำนวนน้อยลง แล้วอ่านวิเคราะห์ประเมินเอกสารจากต่างประเทศดังกล่าวข้างต้น โดยคณะนักวิทยาศาสตร์และวิศวกรในสาขาที่เกี่ยวข้อง เพื่อประเมินความสำคัญ และความน่าเชื่อถือของเอกสารแต่ละเรื่อง พร้อมกับสกัดความเชื่อมโยงกับเอกสารอื่นที่ใกล้เคียงกัน เพื่อเขียนออกมาในรูปของแผนที่ ให้เห็นความเชื่อมโยงขององค์ความรู้เป็นกลุ่มก้อน เป็นการให้ความสะดวกแก่ผู้ที่จะนำไปใช้งาน หรือต่อยอดองค์ความรู้ และให้ความเข้าใจที่ลึกซึ้งกว่าการหยิบฉวยเอกสารแต่ละชิ้นมาอ่านเมื่อถึงคราวจำเป็น การที่โครงการนี้นั้นข้อมูลจากต่างประเทศเป็นหลัก เพราะข้อมูลในประเทศไทยมีอยู่น้อยมาก

อย่างไรก็ตาม หลังจากทีคณะผู้ตรวจสอบทางวิชาการ ได้กำหนดขอบเขตของการศึกษารั้งนี้ให้แคบลงแล้ว จึงสรุปได้ว่า

1. การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการรวบรวมองค์ความรู้ด้านพิษวิทยาจากรายงานผลการวิจัยเฉพาะกรณีความเป็นพิษของอนุภาคโลหะเงินนาโนในเซลล์ของมนุษย์
2. องค์ความรู้ที่จะได้รับ ควรที่จะสามารถใช้ระบุ hazard หรืออันตรายที่อาจจะเกิดขึ้นได้ จากการที่เซลล์ของมนุษย์สัมผัสกับอนุภาคโลหะเงินนาโน
3. รายงานผลการวิจัยที่จะศึกษารวบรวม ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคเงินนาโนเมื่อออกไปอยู่ในสิ่งแวดล้อม (environmental fate) และมีความเกี่ยวข้องน้อยมาก กับการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคเงินนาโนเมื่อได้รับเข้าไปในร่างกาย (เพราะแทบไม่มีผู้ทำวิจัยไว้ในมนุษย์)

ผลจากโครงการนี้ จะช่วยสนับสนุนการรวบรวมและวิเคราะห์ประเมินเอกสารที่ได้รวบรวมไว้ให้ออกมาเป็นแผนที่องค์ความรู้ ทั้งนี้ผลของการรวบรวม ศึกษา และวิเคราะห์ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นรากฐานเชิงองค์ความรู้ ที่จะสนับสนุนกิจกรรมอื่นๆ อีกเป็นจำนวนมาก ทั้งที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยนาโน (อาทิ การสร้างความตระหนักถึงประเด็นความปลอดภัยของนาโนเทคโนโลยีและวัสดุนาโน) และที่เกี่ยวกับนาโนเทคโนโลยีในภาพรวม อีกทั้งยังจะเป็นฐานทางวิชาการ ในการออกแนวปฏิบัติและมาตรฐาน ซึ่งจำเป็นต่อการกำกับดูแลความปลอดภัยนาโนในอนาคตอันใกล้อีกด้วย



## 1.2. ขั้นตอนการดำเนินงาน

ขั้นตอนการดำเนินงาน (work plan) ของโครงการ ตามที่นำเสนอไว้ในสัญญาเงินทุนอุดหนุนการวิจัย มีดังนี้

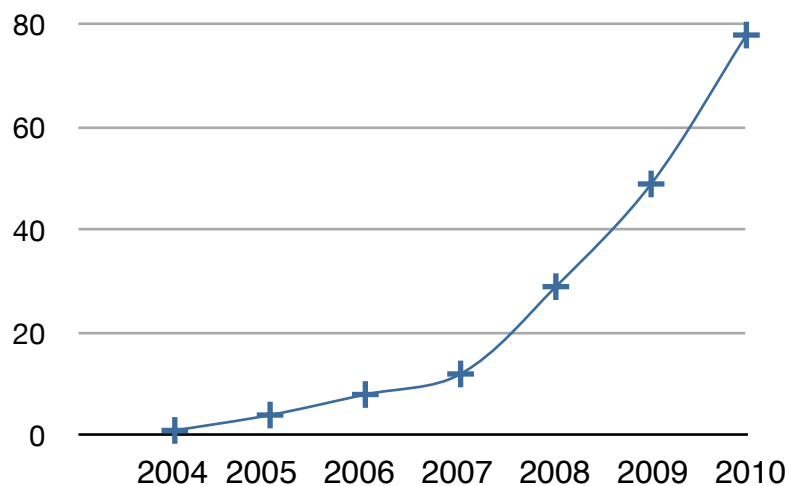
| กิจกรรม                                             | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| ทบทวนข้อมูลความปลอดภัยนาโน                          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| รวบรวมเอกสารจากต่างประเทศ (ส่วนใหญ่เป็นบทความวิจัย) |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| สรรหาผู้ทรงคุณวุฒิ และเชิญมาเป็นผู้วิเคราะห์ประเมิน |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| สร้างแบบประเมิน                                     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| อ่านประเมิน สองรอบ                                  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| ประมวลผลการประเมิน จัดทำแผนที่องค์ความรู้           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| สรุปการวิเคราะห์ผล เตรียมรายงาน                     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| จัดประชุมที่ปรึกษาแผนงาน                            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| ส่งรายงานความก้าวหน้าและร่างรายงานฉบับสมบูรณ์       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์                                |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |

ตารางที่ 1.1: ขั้นตอนการดำเนินงานของโครงการฯ

## 1.3. ระเบียบวิจัย

### 1.3.1. การทบทวนข้อมูลความปลอดภัยนาโน

ได้ทบทวนข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับความปลอดภัยนาโนจากเอกสารต่างประเทศ เพื่อเป็นพื้นฐานความเข้าใจในการแปลผลการวิจัย และได้สอดแทรกไว้ในบทต่างๆ ของรายงานนี้ ตามความเหมาะสม



**รูปที่ 1.1: กราฟแสดงการเพิ่มจำนวนของเอกสารในช่วงปี 2004-2010**

แกนนอนเป็นปีที่ตีพิมพ์ แกนตั้งเป็นจำนวนเอกสารบทความวิจัยเกี่ยวกับความปลอดภัยนาโน (จินนาโนยกเว้นจุลชีพ) ตัวเลขของปี 2011 ไม่ได้แสดงไว้ เนื่องจากเก็บข้อมูลได้เพียงเดือนเมษายน 2011 เท่านั้น

### 1.3.2. การสืบค้นเอกสารจากต่างประเทศ

ผู้ดำเนินการวิจัยได้สืบค้นเอกสารจำนวนหลายร้อยรายการจากต่างประเทศ ในจำนวนนี้ส่วนหนึ่งเป็นเอกสารที่ไม่สามารถหาเอกสารฉบับเต็มได้จากประเทศไทย อย่างไรก็ตาม มีเอกสารหลายรายการที่ไม่สามารถสืบค้นได้ เนื่องจากตีพิมพ์หลังจากระยะเวลาที่กำหนดไว้ในแผนการวิจัย ตัวอย่างเช่น การทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคโลหะเงินนาโนขององค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (Organisation for Economic Co-operation and Development หรือ OECD) ซึ่งมีกำหนดการตีพิมพ์ในช่วง ค.ศ. 2012-2013 ก็ไม่ได้อยู่ในกลุ่มของเอกสารที่สืบค้นได้ ปัญหานี้สะท้อนสภาพความเป็นจริงของความปลอดภัยนาโน ที่ยังอยู่ในขั้นเริ่มต้น จึงจำเป็นต้องมีการติดตามสกัดองค์ความรู้ต่อไปอีกหลายปี

### 1.3.3. การรวบรวมเอกสารจากต่างประเทศ

ผู้วิจัยสามารถหาบทความวิจัยฉบับเต็มได้กว่า 200 รายการสำหรับนำมาวิเคราะห์ นอกจากนั้นยังหาเอกสารฉบับเต็มในส่วนของบริษัทความทั่วไปเกี่ยวกับจินนาโนได้อีกกว่า 75 รายการ ซึ่งนำมาเป็นเอกสารประกอบแต่ไม่ได้นำมาวิเคราะห์ต่อเนื่องจากอยู่นอกเหนือจากขอบเขตของการวิจัยตามสัญญาเงินทุน

### 1.3.4. การคัดกรองเอกสาร

โดยสรุป การคัดกรองเอกสารเริ่มต้นด้วยเอกสารวิจัย ฯลฯ หลายร้อยเรื่องที่สืบค้นได้จากต่างประเทศ ผู้ดำเนินการวิจัยได้คัดกรองขั้นที่ 1 ให้เหลือจำนวนประมาณ 300 เรื่อง เกี่ยวกับความปลอดภัยของเงินนาโน แล้วคัดกรองขั้นที่ 2 ให้เหลือประมาณ 200 เรื่องตามสัญญาวิทยุวิจัย จากนั้นได้คัดกรองให้เหลือประมาณ 100 เรื่องตามสัญญาวิทยุวิจัย และในการนำเสนอรายงานความก้าวหน้าของการวิจัยครั้งที่ 2 คณะผู้ตรวจสอบทางวิชาการ ได้กำหนดขอบเขตของการศึกษาครั้งนี้ ให้เป็นการศึกษาเฉพาะกรณีความเป็นพิษของอนุภาคโลหะเงินนาโนในเซลล์ของมนุษย์ ทำให้จำนวนเอกสารเหลือประมาณ 30 รายการ โดยมีรายละเอียดการคัดกรองดังนี้

แนวคิดดั้งเดิมในข้อเสนอโครงการได้วางระเบียบวิธีการคัดกรองเอกสารไว้ว่า การสืบค้นเอกสารที่เกี่ยวกับความปลอดภัยของนาโนโลหะ ควรจะได้เอกสารผลการวิจัยประมาณ 200 เรื่อง อย่างไรก็ตาม เมื่อโครงการนี้ได้เริ่มขึ้นและกิจกรรมการสืบค้นและรวบรวมเอกสารจากต่างประเทศได้ดำเนินไปเรื่อยๆ ผู้ดำเนินการวิจัยก็พบว่า จำนวนเอกสารที่สืบค้นได้ มีจำนวนมากกว่าที่ได้คาดคะเนไว้แต่แรกในขณะที่เขียนข้อเสนอโครงการวิจัย ยิ่งสืบค้นยิ่งพบมากขึ้นเรื่อยๆ จนได้ซื้อบทความและบทความย่อจำนวนกว่า 400 เรื่อง โดยที่ส่วนมากเป็นบทความใหม่ๆ จึงเกิดปัญหาว่าจะหาอย่างไรให้สามารถดำเนินโครงการจนสำเร็จและเกิดประโยชน์ตามที่คาดหวังไว้แต่แรก หลังจากได้พิจารณาอย่างรอบคอบแล้ว ผู้ดำเนินการวิจัยจึงได้ปรับการคัดกรองออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

**ขั้นแรก การคัดกรองอย่างหยาบ** เป็นการลดจำนวนเอกสารลง โดยไม่ลดความลึก (depth) ขององค์ความรู้ ซึ่งทำได้โดยลดความกว้าง (scope) ของอนุภาคนาโนโลหะ ให้เหลือเฉพาะอนุภาคเงินนาโน (nano silver) ซึ่งมีเหตุผลอธิบายได้ว่า ในปัจจุบันอนุภาคเงินนาโนน่าจะเป็นอนุภาคนาโนลำดับที่สองของประเทศไทยในทางเศรษฐกิจ (ที่หนึ่งคือ carbon black ซึ่งใช้เป็นส่วนผสมของยางรถยนต์ แต่อยู่นอกเหนือขอบเขตของโครงการวิจัยนี้เนื่องจากคาร์บอนไม่ใช่โลหะ) ส่วนในด้านความปลอดภัยนั้น อนุภาคเงินนาโนถูกตั้งข้อสงสัยเรื่องความปลอดภัยทั้งต่อสุขภาพและต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากความสามารถของมันในการฆ่าเชื้อโรค อย่างไรก็ตามหลังจากการคัดกรองอย่างหยาบแล้ว ก็ยังได้เอกสารจำนวนประมาณ 300 เรื่อง ซึ่งมากกว่า 200 เรื่องที่วางแผนไว้ในสัญญาวิทยุวิจัย

ขั้นที่ 2 **การคัดกรองให้เหลือประมาณ 200 เรื่อง** จากการทดลองคัดกรองหลายวิธี ผู้ดำเนินการวิจัยพบว่า สามารถลดจำนวนของเอกสารลงให้เหลือประมาณ 200 เรื่องได้ โดยตัดการศึกษาพิษของเงินนาโนต่อจุลชีพจำนวนประมาณ 100 เรื่องออกไป โดยมีเหตุผลอธิบายได้ว่า เราเริ่มพิจารณาเฉพาะประเด็นความปลอดภัยต่อสัตว์และพืชชั้นสูงเสียก่อน ส่วนการทดลองในจุลชีพนั่น จะให้ไปอยู่ในความครอบคลุมของโครงการที่ขอรับทุนสนับสนุนจากศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ ในปีงบประมาณ 2555

ขั้นที่ 3 **การคัดกรองให้เหลือบทความวิจัยประมาณ 100 เรื่อง** เงื่อนไขในการคัดกรองคือ ต้องมีตัวเอกสารฉบับเต็ม ซึ่งเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยเท่านั้น และต้องเกี่ยวข้องกับความปลอดภัยโดยตรง (คือไม่นับเอกสารการพัฒนาระเบียบวิธีวิจัย เครื่องมือวิจัย ฯลฯ) การคัดกรองในรอบนี้ ได้ทำเป็นตารางขนาดใหญ่ มีความยาวถึง 83 หน้ากระดาษ (นำเสนอแล้วในการรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 2) แสดงถึงโครงการ นักวิจัย หน่วยงานและประเทศ วัสดุนาโนที่ใช้ สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการทดลอง การค้นพบ และข้อสรุปหรือข้อสังเกต ผลจากขั้นตอนนี้ เป็นเอกสารที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของอนุภาคเงินนาโนโดยเฉพาะ จำนวน 119 เรื่อง ผลจากการคัดกรองขั้นที่ 3 (รายละเอียดในภาคผนวกที่ 1) ได้รับการจัดแบ่งเป็น 6 กลุ่มใหญ่ดังต่อไปนี้ (รายละเอียดในภาคผนวกที่ 2)

- กลุ่ม 1000: Microbes
- กลุ่ม 2000: Green Plants
- กลุ่ม 3000: Invertebrates
- กลุ่ม 4000: Fish and amphibians
- กลุ่ม 5000: Mammals
- กลุ่ม 6000: Human

ขั้นที่ 4 **คัดกรองเหลือบทความประมาณ 30 เรื่อง** ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ในขณะนำเสนอรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 2 ของโครงการฯ คณะผู้ตรวจสอบทางวิชาการ ได้กำหนดให้ลดขอบเขตของการศึกษา ให้เป็นการศึกษาเฉพาะกรณีความเป็นพิษของอนุภาคโลหะเงินนาโนในเซลล์ของมนุษย์ ทำให้จำนวนเอกสารเหลือประมาณ 30 รายการ (ซึ่งได้แสดงรายการเอกสารดังกล่าวใน powerpoint slide ให้คณะผู้ตรวจสอบทางวิชาการได้เห็นชื่อการศึกษาทั้ง 30 รายการแล้วในขณะหารือ)

| CoR      | Category of Reliability                                                                                   |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1</b> | <b>reliable without restriction</b>                                                                       |
| 1a       | good laboratory practice study                                                                            |
| 1b       | comparable to [other studies]                                                                             |
| 1c       | test procedure in accordance with national standard methods (AFNOR, DIN, etc.)                            |
| 1d       | test procedure in accordance with general accepted scientific standards and describe in sufficient detail |
| <b>2</b> | <b>reliable with restriction</b>                                                                          |
| 2a       | study without detailed documentation                                                                      |
| 2b       | study with acceptable version                                                                             |
| 2c       | comparable to [other studies] with acceptable restrictions                                                |
| 2d       | test procedure in accordance with national standard methods with acceptable restrictions                  |
| 2e       | study well document, meets generally accepted scientific principles, acceptable for assessment            |
| 2f       | acceptable calculation method                                                                             |
| 2g       | data from handbook or collection data                                                                     |
| <b>3</b> | <b>not reliable</b>                                                                                       |
| 3a       | documentation insufficient for assessment                                                                 |
| 3b       | significant methodological deficiencies                                                                   |
| 3c       | unsuitable test system                                                                                    |
| <b>4</b> | <b>not assignable</b>                                                                                     |
| 4a       | abstract                                                                                                  |
| 4b       | secondary literature                                                                                      |
| 4c       | original referenced not yet available                                                                     |
| 4d       | original referenced not yet translated                                                                    |
| 4e       | documentation insufficient for assessment                                                                 |

## ตารางที่ 1.2: Code of Reliability (CoR) หรือ Modified Klimish Code

ที่ใช้ในการให้คะแนนความน่าเชื่อถือของเอกสาร

ที่มา: ECETOC. 2006 *Synthetic Amorphous Silica*. ECETOC JACC No. 51. (ISSN 0773-6339-51) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. p. 3. และ Klimisch HJ, Andreae M, Tillmann U. 1997. A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 25:1-5.

### 1.3.5. การอ่านวิเคราะห์

เป็นการอ่านอย่างละเอียดเพื่อให้ได้ข้อสรุป ที่จะได้นำเสนอต่อไปในบทที่ 2 (อนุภาคนาโนที่ใช้) และในบทที่ 3 (ชนิดของเซลล์ที่ใช้) ส่วนองค์ความรู้ที่สกัดได้จากรายงานผลการวิจัย อยู่ในบทที่ 4-8

ในบทสุดท้าย เป็นการนำองค์ความรู้ที่สกัดได้ในบทที่ 4-8 มารวมกัน ให้อยู่ในรูปแบบที่เชื่อมโยงองค์ความรู้ในบทต่างๆ เข้าด้วยกัน เพื่อให้เกิดภาพใหญ่ของความเป็นอันตรายของอนุภาคโลหะเงินนาโนที่ได้รับการทดลองไว้ในเซลล์ของมนุษย์

### 1.3.6. การประเมินความน่าเชื่อถือของเอกสาร

เอกสารที่ผ่านการคัดกรองรอบสุดท้าย ได้รับการประเมินความน่าเชื่อถือโดยใช้สองวิธีประกอบกัน คือ

- **ใช้การกำหนด code of reliability**

Code of Reliability (CoR ดูตารางที่ 1.2) เป็นการให้คะแนนความน่าเชื่อถือของเอกสาร ที่ใช้กันแพร่หลายในวงการพิษวิทยา ในที่นี้ใช้ CoR ที่ปรับปรุงขึ้นจากรหัสที่เรียกว่า Modified Klimish Code (ECETOC 2006 ปรับปรุงจาก Klimish, Andreae & Tillmann 1997) โดยทั่วไปมักใช้เกณฑ์ว่า เฉพาะเอกสารที่ได้ CoR อยู่ในกลุ่มที่ 1 และ 2 เท่านั้นจะได้รับการพิจารณา

เอกสารแทบทั้งหมดที่ใช้ในการอ่านวิเคราะห์ แต่ละฉบับมี CoR อยู่ในกลุ่ม 1 ตรงตามเกณฑ์สากล มีเอกสารส่วนน้อย ที่ขาด methodological detail ไปบ้าง แต่เป็นการขาดในส่วนของการสังเคราะห์อนุภาค ไม่ได้ขาดในส่วนการวิเคราะห์ทางพิษวิทยา จึงได้ CoR อยู่ในกลุ่ม 2 ซึ่งก็ยังไม่พยายอมรับได้ ทั้งยังไม่มีเอกสารฉบับใดที่อยู่ในกลุ่ม 4 เลย นอกจากนั้น หลังจากการอ่านวิเคราะห์แล้ว ได้มีการประเมินอีกครั้งหนึ่ง ว่าไม่มีเอกสารฉบับใดเข้าอยู่ในกลุ่ม 3b หรือ 3c สรุปว่า เอกสารทุกฉบับที่ใช้ในการศึกษานี้ ผ่านเกณฑ์การประเมินโดย CoR

- **ใช้การประเมินความน่าเชื่อถือตามความเห็นของผู้เชี่ยวชาญ**

เอกสารที่ผ่านการคัดกรองในรอบสุดท้าย ได้รับการประเมินจากผู้เชี่ยวชาญ ในด้านความน่าเชื่อถือ และในด้านความสำคัญของเอกสารฉบับนั้นๆ ต่อความเข้าใจเรื่องความปลอดภัยของอนุภาคโลหะเงินนาโน

## 2. การสังเคราะห์และลักษณะของ อนุภาคโลหะเงินนาโน

### 2.1. วิธีการสังเคราะห์อนุภาคโลหะเงินนาโน

ส่วนใหญ่ใช้การรีดิวซ์ไอออนเงิน ( $\text{Ag}^+$ ) ให้เป็นโลหะเงิน สิ่งที่แตกต่างกันในการสังเคราะห์ในการศึกษาแต่ละเรื่อง ได้แก่ (1) ชนิดและความเข้มข้นของเกลือเงินที่ใช้ตั้งต้น (2) ชนิดและความเข้มข้นของรีดิวซ์เอเจนต์ (3) ชนิดและความเข้มข้นของสารอื่นที่เติมลงไปเพื่อให้เคลือบผิวของอนุภาคโลหะเงินนาโนที่เกิดขึ้น (4) การกระทำทางกายภาพ เช่น การผสมหรือกวนในขณะที่เกิดปฏิกิริยา (5) อุณหภูมิในขณะที่เกิดปฏิกิริยา (6) ระยะเวลาทำปฏิกิริยา

การรีดิวซ์  $\text{Ag}^+$  ให้รับอิเล็กตรอนกลายเป็น  $\text{Ag}^0$  จำเป็นต้องหารีดิวซ์เอเจนต์ มาคายอิเล็กตรอนให้  $\text{Ag}^+$  รีดิวซ์เอเจนต์ดังกล่าวจำเป็นต้องมี reduction potential พอที่จะรีดิวซ์  $\text{Ag}^+$  ให้เป็น  $\text{Ag}^0$  ได้

ค่า reduction potential เป็นตัวเลขที่บอกศักยภาพในการรับอิเล็กตรอน ในทางทฤษฎีเมื่อรวมตัวเลข reduction potential ของทั้งสอง half reaction (คือปฏิกิริยา reduction หรือการรับอิเล็กตรอน กับปฏิกิริยา oxidation หรือการคายอิเล็กตรอน ซึ่งแสดงด้วยสมการ reduction กลับทิศทาง) ดังแสดงตัวอย่าง Standard Reduction Potential ไว้ในตารางที่ 2.1 จะได้เป็นตัวเลข reversible voltage ของ galvanic cell ซึ่งจากหลักการ thermodynamics มีความสัมพันธ์โดยตรงกับ free energy ตามสมการต่อไปนี้

|      |            |               |      |
|------|------------|---------------|------|
|      | $\Delta G$ | $= -nE$       | eV   |
| หรือ | $\Delta G$ | $= -23.06 nE$ | kcal |
| หรือ | $\Delta G$ | $= -nEF$      | J    |

โดยที่  $n$  = จำนวนโมลของอิเล็กตรอนที่รับ,  $E$  = reversible voltage ของ galvanic cell และ  $F$  = Faraday Constant = 96,487 coulomb/mole ของอิเล็กตรอน

## Standard Reduction Potentials at 298K, 1M, 1atm

| HALF-REACTION                                                                                                                                                     | E° (V) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| $\text{F}_2(\text{g}) + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{F}^-(\text{aq})$                                                                                           | +2.87  |
| $\text{O}_3(\text{g}) + 2\text{H}^+(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{O}_2(\text{g}) + \text{H}_2\text{O}(\text{l})$                                     | +2.07  |
| $\text{Co}^{3+}(\text{aq}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Co}^{2+}(\text{aq})$                                                                                    | +1.82  |
| $\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq}) + 2\text{H}^+(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}(\text{l})$                                                | +1.77  |
| $\text{PbO}_2(\text{s}) + 4\text{H}^+(\text{aq}) + \text{SO}_4^{2-}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{PbSO}_4(\text{s}) + 2\text{H}_2\text{O}(\text{l})$ | +1.70  |
| $\text{Ce}^{4+}(\text{aq}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Ce}^{3+}(\text{aq})$                                                                                    | +1.61  |
| $\text{MnO}_4^-(\text{aq}) + 8\text{H}^+(\text{aq}) + 5\text{e}^- \rightarrow \text{Mn}^{2+}(\text{aq}) + 4\text{H}_2\text{O}(\text{l})$                          | +1.51  |
| $\text{Au}^{3+}(\text{aq}) + 3\text{e}^- \rightarrow \text{Au}(\text{s})$                                                                                         | +1.50  |
| $\text{Cl}_2(\text{g}) + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{Cl}^-(\text{aq})$                                                                                         | +1.36  |
| $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}(\text{aq}) + 14\text{H}^+(\text{aq}) + 6\text{e}^- \rightarrow 2\text{Cr}^{3+}(\text{aq}) + 7\text{H}_2\text{O}(\text{l})$            | +1.33  |
| $\text{MnO}_2(\text{s}) + 4\text{H}^+(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Mn}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{H}_2\text{O}(\text{l})$                             | +1.23  |
| $\text{O}_2(\text{g}) + 4\text{H}^+(\text{aq}) + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}(\text{l})$                                                           | +1.23  |
| $\text{Br}_2(\text{l}) + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{Br}^-(\text{aq})$                                                                                         | +1.07  |
| $\text{NO}_3^-(\text{aq}) + 4\text{H}^+(\text{aq}) + 3\text{e}^- \rightarrow \text{NO}(\text{g}) + 2\text{H}_2\text{O}(\text{l})$                                 | +0.96  |
| $2\text{Hg}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Hg}_2^{2+}(\text{aq})$                                                                                | +0.92  |
| $\text{Hg}_2^{2+} + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{Hg}(\text{l})$                                                                                                 | +0.85  |
| $\text{Ag}^+(\text{aq}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}(\text{s})$                                                                                             | +0.80  |
| $\text{Fe}^{3+}(\text{aq}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}(\text{aq})$                                                                                    | +0.77  |
| $\text{O}_2(\text{g}) + 2\text{H}^+(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$                                                         | +0.68  |
| $\text{MnO}_4^-(\text{aq}) + 2\text{H}_2\text{O}(\text{l}) + 3\text{e}^- \rightarrow \text{MnO}_2(\text{s}) + 4\text{OH}^-(\text{aq})$                            | +0.59  |
| $\text{I}_2(\text{s}) + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{I}^-(\text{aq})$                                                                                           | +0.53  |
| $\text{O}_2(\text{g}) + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{OH}^-(\text{aq})$                                                                    | +0.40  |
| $\text{Cu}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cu}(\text{s})$                                                                                         | +0.34  |
| $\text{AgCl}(\text{s}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}(\text{s}) + \text{Cl}^-(\text{aq})$                                                                     | +0.22  |
| $\text{SO}_4^{2-}(\text{aq}) + 4\text{H}^+(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{SO}_2(\text{g}) + 2\text{H}_2\text{O}(\text{l})$                            | +0.20  |
| $\text{Cu}^{2+}(\text{aq}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu}^+(\text{aq})$                                                                                       | +0.15  |
| $\text{Sn}^{4+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Sn}^{2+}(\text{aq})$                                                                                   | +0.13  |
| $2\text{H}^+(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2(\text{g})$                                                                                           | 0.00   |
| $\text{Pb}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Pb}(\text{s})$                                                                                         | -0.13  |
| $\text{Sn}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Sn}(\text{s})$                                                                                         | -0.14  |
| $\text{Ni}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Ni}(\text{s})$                                                                                         | -0.25  |
| $\text{Co}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Co}(\text{s})$                                                                                         | -0.28  |
| $\text{PbSO}_4(\text{s}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Pb}(\text{s}) + \text{SO}_4^{2-}(\text{aq})$                                                             | -0.31  |
| $\text{Cd}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cd}(\text{s})$                                                                                         | -0.40  |
| $\text{Fe}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Fe}(\text{s})$                                                                                         | -0.44  |
| $\text{Cr}^{3+}(\text{aq}) + 3\text{e}^- \rightarrow \text{Cr}(\text{s})$                                                                                         | -0.74  |
| $\text{Zn}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Zn}(\text{s})$                                                                                         | -0.76  |
| $2\text{H}_2\text{O}(\text{l}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2(\text{g}) + 2\text{OH}^-(\text{aq})$                                                          | -0.83  |
| $\text{Mn}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Mn}(\text{s})$                                                                                         | -1.18  |
| $\text{Al}^{3+}(\text{aq}) + 3\text{e}^- \rightarrow \text{Al}(\text{s})$                                                                                         | -1.66  |
| $\text{Be}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Be}(\text{s})$                                                                                         | -1.85  |
| $\text{Mg}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Mg}(\text{s})$                                                                                         | -2.37  |
| $\text{Na}^+(\text{aq}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Na}(\text{s})$                                                                                             | -2.71  |
| $\text{Ca}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Ca}(\text{s})$                                                                                         | -2.87  |
| $\text{Sr}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Sr}(\text{s})$                                                                                         | -2.89  |
| $\text{Ba}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Ba}(\text{s})$                                                                                         | -2.90  |
| $\text{K}^+(\text{aq}) + \text{e}^- \rightarrow \text{K}(\text{s})$                                                                                               | -2.93  |
| $\text{Li}^+(\text{aq}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Li}(\text{s})$                                                                                             | -3.05  |

ตารางที่ 2.1: Standard Reduction Potential

ที่มา: [http://www.jesuitnola.org/upload/clark/refs/red\\_pot.htm](http://www.jesuitnola.org/upload/clark/refs/red_pot.htm)

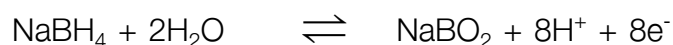
ตามหลักการ thermodynamics ถ้าปฏิกิริยาจะเกิดได้เอง (spontaneous)  $\Delta G$  จะต้องน้อยกว่า 0 จากสมการข้างต้นจึงเห็นได้ว่า  $\Delta G$  จะน้อยกว่า 0 ได้ก็ต่อเมื่อ  $E$  มากกว่า 0 วิธีที่จะทำให้  $E > 0$  ได้ (คือรีดิวซ์  $\text{Ag}^+$  ได้) ก็คือปฏิกิริยา half-reaction ของสารที่จะนำมาใช้เป็นรีดิวซิงเอเจนต์จะต้องมี reduction potential ของ half reaction ในตารางที่ 2.1 ต่ำกว่า 0.80 โวลต์ ซึ่งเป็นค่า reduction potential ของปฏิกิริยารับอิเล็กตรอน  $\text{Ag}^+(\text{aq}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}(\text{s})$  นั่นเอง



สาร reducing agent ที่นิยมใช้กัน แบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

### 2.1.1. Sodium borohydride

Sodium borohydride เป็น reducing agent คือให้อิเล็กตรอนแก่  $\text{Ag}^+$  ตามสมการ (Nunno et al, 1988 หน้า 57)



Sodium borohydride จัดว่าเป็นรีดิวซิงเอเจนต์ที่แรง (มี reduction potential ตีลบมาก) และสามารถทำให้มีความรุนแรงขึ้นได้อีกมากด้วยการเติมสาร additive เช่น tetraethylene glycol dimethyl ether (Tetraglyme) เป็นต้น การเตรียม AgNP จึงทำได้ง่าย มี yield สูง เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์ AgNP ในระดับอุตสาหกรรม แต่เป็นวิธีที่ไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

รายงานวิจัยที่สืบค้นได้ มีหลายฉบับที่ใช้ AgNP ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีนี้ (AshaRani et al, 2009a; AshaRani et al, 2009b ฯลฯ) อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก sodium borohydride ที่อาจจะยังหลงเหลืออยู่จากการสังเคราะห์ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นในการออกแบบการทดลอง จึงมักเติม supernatant ที่ได้จากการปั่นแยกหลังจากการ wash AgNP ครั้งสุดท้ายลงไปด้วยในกลุ่มควบคุม (control) โดยคาดหวังว่ากลุ่มควบคุมจะไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อเซลล์ (AshaRani et al, 2009b)

### 2.1.2. สารที่มีหมู่ hydroxyl (สารประเภท alcohol)

สารอินทรีย์ หรือสารชีวเคมีที่เป็นรีดิวซิงเอเจนต์ เพราะมีหมู่ hydroxyl (-OH) มีหลายประเภท แต่ที่นิยมใช้ คือกลุ่ม polyol เช่น ethylene glycol (Greulich et al, 2009) สารเหล่านี้เป็นรีดิวซิงเอเจนต์ที่อ่อนกว่า sodium borohydride ซึ่งอาจเป็นผลดีต่อการควบคุมขนาดของอนุภาค

### 2.1.3. สารที่มีหมู่ aldehyde

รีดิวซิงเอเจนต์ที่มีหมู่อัลดีไฮด์ ได้แก่ น้ำตาลบางประเภท และแป้ง ที่มี reducing end ของน้ำตาลอยู่ สารในกลุ่มนี้เป็นที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์ AgNP ในฐานะกรรมวิธีที่เป็นมิตรต่อ

| สาร                  | reduction potential (V) |
|----------------------|-------------------------|
| hesperidin           | 0.72                    |
| rutin                | 0.60                    |
| (+)-catechin         | 0.57                    |
| (-)-epigallocatechin | 0.43                    |
| quercetin            | 0.33                    |
| catechol             | 0.53                    |
| methyl gallate       | 0.56                    |
| 3,5-dihydroxy-anisol | 0.84                    |

**ตารางที่ 2.2:** Reduction potential ของสารกลุ่ม phenoxy และ flavonoid ที่พบในพืช

ที่มา: Nadagouda et al, 2010.

สิ่งแวดล้อม นอกจากนั้น สารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ยังอาจช่วยเคลือบอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้อีกด้วย

#### 2.1.4. สารสกัดจากพืช (natural products)

พืชไม่ว่าสดหรือแห้ง มีสารประกอบที่ทำหน้าที่เป็นรีดิวซิงเอเจนต์อยู่เป็นจำนวนมาก ดังแสดงตัวอย่างไว้ในตารางที่ 2.2 ซึ่งถึงแม้จะมีความแรงรีดิวซิงเคมีทางอุตสาหกรรม เช่น sodium borohydride ไม่ได้ก็ตาม แต่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่า

การใช้สารสกัดจากพืช มักใช้ในลักษณะ crude extract ทำให้มีต้นทุนการผลิตสูง นอกจากนั้นอาจมีสารหลายชนิดที่ช่วยในการเคลือบผิวของ AgNP ที่สังเคราะห์ขึ้นอีกด้วย

#### 2.1.5. การสร้างสารเชิงซ้อน (complex formation)

อนุมูลเงิน  $Ag^+$  สามารถจับกับแอมโมเนีย เช่น แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เป็น silver hydroxide ammonium complex ซึ่งเมื่อนำไปทำ thermal decomposition จะได้ AgNP วิธีนี้อาจใช้ในการเคลือบอนุภาคนาโนของโลหะชนิดอื่นให้มีเปลือกนอกเป็นโลหะเงิน หรืออาจนำแนวคิด

ไปสร้างหมู่อะมิโนขึ้นบนผิวนอกของอนุภาคนาโนชนิดหนึ่ง เพื่อให้เงินเข้ามาเกาะ กลายเป็นเปลือกโลหะเงินได้เช่นเดียวกัน (Kar et al 2011; Ghorashi and Kamali, 2011) ผลจากการสังเคราะห์จะได้อนุภาคโลหะเงินนาโน หรือเปลือกเงิน ที่มีแอมโมเนีย อนุภาคนาโนในสารตั้งต้น (เช่น ในเตรท) ตัวทำลายและสารที่เหลือจากปฏิกิริยา (เช่นฟอร์มัลดีไฮด์และเมทานอล) ซึ่งควรจะล้างออกให้หมด เพราะว่าถ้าไม่ล้าง จะเกิด cytotoxic effect ต่อเซลล์ได้ (Samberg et al, 2010)

## 2.2. ขนาดของอนุภาคโลหะเงินนาโน

ขนาดที่หลากหลายของ AgNP ในการศึกษาต่างๆ ส่งผลไปถึงพื้นที่ผิว และความไวต่อปฏิกิริยาเคมีของอนุภาค รวมทั้งความสามารถในการชอกชอนของอนุภาคไปยังตำแหน่งต่างๆ ในเซลล์ จึงเป็นปัญหาใหญ่ของการเปรียบเทียบผลการศึกษาวิจัย

AgNP ที่เป็น primary particle โดดๆ มีเส้นผ่าศูนย์กลางได้ตั้งแต่สุดขอบเขตขั้นต่ำของขนาดนาโน (nanoscale) คือประมาณ 1 nm ไปจนถึงสุดขอบเขตด้านสูงของขนาดนาโน คือประมาณ 100 nm การวัดขนาด (size) และการกระจายตัวของขนาด (size distribution) ของอนุภาคเหล่านี้ มักใช้เทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS) ประกอบกับการส่องดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

### 2.2.1. การวัดขนาดด้วยวิธี Dynamic Light Scattering

วิธี Dynamic Light Scattering (DLS) ใช้การยิงลำแสงเลเซอร์ผ่านเข้าไปในสารตัวอย่างอนุภาคในสารตัวอย่างนั้น จะกระเจิงแสง (scatter) แบบที่พลังงานไม่ลดหรือเพิ่ม (elastic scattering) แต่เครื่องวัดความไวสูง จะสามารถจับความถี่ของแสงที่เปลี่ยนไปเล็กน้อยเนื่องจากการเคลื่อนที่ของอนุภาค ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาค จึงสามารถวัดขนาดของอนุภาคออกมาได้ในลักษณะการกระจายตัวของขนาด (size distribution) จึงให้ความสะดวก รวดเร็ว ข้อดีของเทคนิคนี้คือผู้ใช้ไม่สามารถเห็นภาพของอนุภาคที่กำลังวัดขนาดอยู่ จึงไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นอนุภาคโดดๆ (primary particles) หรืออนุภาคที่จับตัวกันแบบใดแบบหนึ่ง

### 2.2.2. การวัดขนาดจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน (transmission electron microscope หรือ TEM)

กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน สามารถใช้ศึกษา AgNP ได้โดยไม่ต้องย้อมสี และให้ความละเอียดของขนาดได้ดี แต่จะต้องวัดขนาดของอนุภาคเป็นจำนวนมาก จึงจะวาดกราฟการกระจายของขนาดได้

ในกรณีกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้เป็น scanning transmission electron microscopy (STEM) สามารถใช้ยืนยันองค์ประกอบของอนุภาคด้วยว่าเป็น  $\text{Ag}^0$  จริง

### 2.2.3. การวัดขนาดจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด (scanning electron microscope หรือ SEM)

กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด ให้ความสะดวกในการศึกษารูปร่างและขนาดของอนุภาคนาโน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อจับกันเป็นก้อนหลวมหรือกลุ่มมวล แต่มีข้อจำกัดด้านกำลังขยาย เมื่อใช้ส่องดูอนุภาคนาโนเดี่ยวๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง AgNP ที่มีขนาดเล็กประมาณ 1 nm ในเอกสารรายงานการวิจัยที่รวบรวมได้ มีตัวอย่างการวัดขนาดของ AgNP ในช่วง 6-20 nm โดยใช้ SEM (Asharani, 2009a, Asharani, 2009b)

### 2.2.1. การวัดขนาดจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Atomic Force Microscope (AFM)

ในทางทฤษฎี กล้องจุลทรรศน์ชนิด AFM มีกำลังขยายพอที่จะส่องเห็นอนุภาคโลหะเงินนาโนที่เล็กที่สุดที่สามารถสังเคราะห์ได้ อย่างไรก็ตาม ไม่ปรากฏในรายงานการวิจัยที่สืบค้นได้ ว่ามีการใช้เทคนิคนี้ในการวิจัยจริง ๆ

## 2.3. การเคลือบผิวอนุภาคโลหะเงินนาโน

AgNP ที่สังเคราะห์ขึ้น มักได้รับการเคลือบผิวด้วยสารต่างๆ หลากหลาย เช่น polyethylene glycol glycolic acid แป้งชนิดต่างๆ polyvinylpyrrolidone (PVP) (Greulich et al, 2009) ฯลฯ ซึ่งเดิมลงไปในขณะที่ทำปฏิกิริยารีดักชันอนุมูลเงิน สารเคลือบผิว (coating agent หรือ capping agent) เหล่านี้ มีผลถึงประจุไฟฟ้าและลักษณะของพื้นผิวภายนอกของ AgNP อย่างไรก็ตาม การวิจัยด้านพิษวิทยาส่วนมากไม่ได้มีการวัดประจุไฟฟ้าบนพื้นผิวของ AgNP ไว้ด้วย

ประโยชน์ของการเคลือบผิว คือ ช่วยให้ AgNP ที่สังเคราะห์ได้ จับตัวกันน้อยลง และช่วยชะลอการออกซิไดซ์ AgNP โดยออกซิเจนในอากาศที่ละลายลงไปในตัว

เนื่องจากสารเคลือบผิวเองอาจจะมีผลต่อการทำงานของเซลล์ได้ ดังนั้นจึงนิยมเติมสารเคลือบผิวที่ใช้ ในกลุ่มควบคุม (control) ของการทดลองต่างๆ ด้วย แต่ไม่มีหลักเกณฑ์ที่แน่ชัดว่าควรจะเติมลงไปด้วยความเข้มข้นเท่าใด

## 2.4. การจับตัวกันของอนุภาคโลหะเงินนาโน

AgNP ที่ไม่ได้เกาะตัวกับอนุภาคอื่น เรียกว่าเป็น **อนุภาคนาโนปฐมภูมิ (primary nanoparticle)** ซึ่งในสถานะที่เหมาะสมอาจรวมตัวกันจนมีขนาดใหญ่ขึ้นได้ในสองลักษณะ คือ

- **ก้อนหลอม หรือ กลุ่มก้อน (aggregate)** หมายถึง อนุภาคที่ประกอบขึ้นด้วยอนุภาคที่เชื่อมกันอย่างแน่นหนาหรือหลอมเข้าด้วยกัน ทำให้พื้นที่ผิวภายนอก มีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับผลบวกของพื้นที่ผิวของอนุภาคย่อยๆ<sup>1</sup> การจับตัวกันเป็นก้อนหลอม ทำให้ได้อนุภาคขนาดใหญ่ ที่มีความแข็งแรง ไม่แตกกลับไปเป็นอนุภาคย่อยได้ง่าย มีความทนทานต่อการสั่นด้วยคลื่นความถี่สูง (sonication)
- **กลุ่มมวลง หรือ รวมมวลง (agglomerate)** หมายถึง อนุภาค หรือก้อนหลอม หรือของผสมของทั้งสองอย่าง ที่มาเกาะกันอย่างหลวมๆ ทำให้พื้นที่ผิวภายนอก มีขนาดใกล้เคียงกับผลบวกของพื้นที่ผิวของอนุภาคย่อยๆ<sup>2</sup> การจับตัวกันแบบกลุ่มมวลง ทำให้ได้อนุภาคขนาดใหญ่ ซึ่งถ้ามีการสั่นสะเทือนมากพอ หรือทำให้แรงที่เกาะยึดกันอยู่อย่างหลวมๆ สลายไป มันก็จะแยกกลับเป็นอนุภาคเล็กๆ ได้อีก

<sup>1</sup> **aggregate:** particle comprising strongly bonded or fused particles where the resulting external surface area may be significantly smaller than the sum of calculated surface area of the individual components. Note 1: The forces holding an aggregate together are strong forces, for example covalent bonds, or those resulting from sintering or complex physical entanglement. Note 2: Aggregates are also termed secondary particles and the original source particles are termed primary particles. ที่มา: ISO/TS 27687:2008(E), definition 3.3 อนึ่ง คำว่า aggregate ราชบัณฑิตยสถานบัญญัติศัพท์ว่า “กลุ่มก้อน” หรือ “รวมกลุ่ม”

<sup>2</sup> **agglomerate:** collection of weakly bound particles or aggregates or mixture of the two where the resulting external surface area is similar to the sum of the surface areas of the individual components. Note 1: The forces holding an agglomerate together are weak forces, for example van der Waals forces, or simple physical entanglement. Note 2: Agglomerates are also termed secondary particles and the original source particles are termed primary particles. ที่มา: ISO/TS 27687:2008(E), definition 3.2 อนึ่ง ราชบัณฑิตยสถานบัญญัติศัพท์ agglomeration ว่า “การรวมมวลง” และบัญญัติศัพท์ agglutination ว่า “การเกาะกลุ่ม”

ผลจากการจับตัวกันเป็นก้อนหลวม ทำให้พื้นที่ผิวของ AgNP ลดลงได้มาก แต่ถ้าจับตัวกันเป็นกลุ่มมวลงกลมๆ พื้นที่ผิวอาจลดลงไม่มากนัก อนุภาคขนาดใหญ่ที่เกิดขึ้น จึงอาจยังคงมีสมบัติบางประการของอนุภาคนาโนอยู่ ถึงแม้จะมีขนาดใหญ่กว่าขนาดนาโนมากก็ตาม

AgNP ที่ไม่ได้เคลือบไว้ด้วยสารอื่น อาจจะรวมกันเป็นกลุ่มมวลงได้ในน้ำ และหากยิ่งเพิ่ม ionic strength ขึ้น เช่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ อนุภาคโลหะเงินนาโนก็จะยิ่งเกาะกันเป็นกลุ่มมวลงได้ดีขึ้น เนื่องจากการ shielding ประจุไฟฟ้าบนผิวของแต่ละอนุภาคโดยสารละลายเกลือ การเคลือบผิวของอนุภาคโลหะเงินนาโนด้วย polyvinylpyrrolidone ไม่ช่วยป้องกันการจับตัวกันของอนุภาคในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเติม fetal calf serum (FCS) ลงไปให้มีความเข้มข้น 10% จะป้องกันการจับตัวกันของอนุภาคโลหะเงินนาโนได้ (Grulich et al, 2009)

## 2.5. การแตกตัวของอนุภาคโลหะเงินนาโนออกเป็นอนุมูลเงิน ( $\text{Ag}^+$ )

ในการสังเคราะห์ AgNP จากอนุมูล  $\text{Ag}^+$  เมื่อได้ AgNP แล้ว ตามปกติจะต้องมีขั้นตอนการทดสอบว่า Ag ที่สังเคราะห์ได้ เป็นโลหะเงิน ไม่ใช่เป็นอนุมูลเงินอีกต่อไป โดยดูได้จาก doublet peaks ของ x-ray diffraction ที่ 367.6 and 373.6 eV (ตรงกับ binding energies ของ Ag 3d5/2 และ Ag 3d3/2 ตามลำดับ) ถูกเลื่อนไปอยู่ที่ 368.0 and 374.0 eV (Chun et al, 2010)

อย่างไรก็ตาม เมื่ออนุภาคโลหะเงินนาโนสัมผัสกับน้ำ มันจะถูกออกซิไดซ์ และปล่อยอนุมูลเงิน (silver ion,  $\text{Ag}^+$ ) ลงไปในน้ำตลอดเวลา ทำนองเดียวกับที่ตรวจพบในอนุภาคโลหะโคบอลต์นาโน และอนุภาคโลหะนิกเกิลนาโน ที่ปลดปล่อยไอออนบวกลงไปในน้ำ (Kumar, 2006 อ้างถึงใน Asharani et al, 2009b)

อนุมูลเงินนี้มีสมบัติฆ่าจุลชีพ (antimicrobial) ทั้งที่เป็นแบคทีเรียและรา ที่ความเข้มข้นต่ำๆ เพียงไม่กี่ nM ในขณะที่อนุภาคโลหะเงินนาโน (zero valent silver nanoparticle) ไม่มีสมบัติฆ่าจุลชีพ (Lok et al, 2007) แต่มีสมบัติ cytotoxic ต่อเซลล์มนุษย์ ที่ความเข้มข้นในช่วง 5-50 ug/ml ซึ่งตัวเลขที่แน่ชัดอาจจะขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาค และสารเคลือบผิวอนุภาค (Grulich et al, 2009)

เนื่องจากการแตกตัวให้อนุมูลเงิน ทำให้การทดลองด้านพิษวิทยาของอนุภาคโลหะเงินนาโน มักจะทำความเข้าใจไปกับการทดลองกับอนุมูลเงินที่ไม่มีโลหะเงินอยู่ด้วย (เช่นทดลองกับสารละลายเกลือ silver acetate) เพื่อเปรียบเทียบผล

## เอกสารอ้างอิง

- AshaRani, P.V., M.P. Hande, and S. Valiyaveetil. 2009. "Anti-proliferative activity of silver nanoparticles." *BMC Cell Biology* **10**:65-79.
- Asharani, P. V., G. Low Kah Mun, et al. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* **3**(2): 279-290.
- Chun, J.Y. H.K. Kang, L. Jeong, Y.O. Kang, J. Oh, I. Yeo, S.Y. Jung, W.H. Park, and B. Min. 2010. Epidermal cellular response to poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, **78**(2):334-342.
- Greulich, C., S. Kittler, M. Epple, G. Muhr, and M. Köller. (2009). "Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs)." *Langenbeck's Archives of Surgery* **394**(3): 495-502.
- Hackenberg, S., A. Scherzed, M. Kessler, S. Hummel, A. Technau, K. Froelich, C. Ginzkey, C. Koehler, R. Hagen, and N. Kleinsasser. 2011. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters* **201**:27-33.
- Kar, P., N.C. Pradhan, and B. Adhikari. 2011. Doping of processable conducting poly(m-aminophenol) with silver nanoparticles. *Polymer Advanced Technologies*. 22(6): 1060-1066.
- Kumar, C. 2006. *Nanomaterials-Toxicity, Health and Environmental Issues*; Wiley- VCH Verlag GmbH & Co: Weinheim, Germany, Vol. 5.
- Lok, C., C. Ho, R. Chen, Q. He, W. Yu, H. Sun, P.K. Tam, J. Chiu, and C. Che. 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J. Biol. Inorg. Chem.* **12**:527-534.

- Nadagouda, M.N., A.B. Castle, R.C. Murdock, S.M. Hussain, and R.S. Verma. 2010. *In vitro* biocompatibility of nanoscale zerovalent iron particles (NZVI) synthesized using tea polyphenols. *Green Chem.* **12**:114-122.
- Nunno, T., S. Palmer, M. Arienti, and M. Breton. 1988. *Toxic Waste Minimization in the Printed Circuit Board Industry*. Pollution Technology Review No. 162. Park Ridge, NJ:Noyes Data Corporation. ISBN: 0-8155-1183-3.
- Samberg, M.E., S.J. Oldenburg, and N.A. Monteiro-Riviere. 2010. Evaluation of silver nanoparticles toxicity in skin *in vivo* and keratinocytes *in vitro*. *Environmental Health Perspectives.* **118**(3):407-413.



### 3. ประเภทของเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย

การศึกษาวิจัยที่สืบค้นและรวบรวมรายงานได้ จำกัดอยู่แต่เฉพาะเซลล์มนุษย์ ซึ่งนับไปแล้วค่อนข้างจะหลากหลาย แต่พอจะจัดกลุ่มได้ดังนี้<sup>3</sup>

**กลุ่ม 6200: Normal human primary cells and tissues** ประกอบด้วยเซลล์ที่มาจากมนุษย์โดยตรง โดยไม่ถูก transformed ในขั้นตอนการเตรียมเซลล์ ข้อดีของการเลือกใช้เซลล์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ (1) ลักษณะทางชีวเคมีของเซลล์ใกล้เคียงกับเซลล์ในมนุษย์จริงมากที่สุด เป็นต้นว่าเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสัมผัสสวัสดุนานในทางการหายใจ (เช่น human lung fibroblasts) หรือทางผิวหนัง (เช่น human epidermal keratinocytes culture) ก็อาจนับว่าเป็นเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องใกล้เคียงกับช่องทางที่อนุภาคโลหะเงินนาโนอาจเป็นพิษต่อมนุษย์ได้ (2) มีความไวต่อผลกระทบของสารพิษมากกว่า cell line และ (3) รองรับการศึกษเชิงเปรียบเทียบในเซลล์หรือเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันในสิ่งมีชีวิตต่าง species กัน อย่างไรก็ตาม ข้อด้อยของการใช้ primary cell culture คือ (1) ต้องใช้ความพยายามแยกเซลล์หลากหลายซึ่งมักจะปนกันมาจากการตัดเนื้อเยื่อ และ (2) เซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้มักจะสูญเสียลักษณะเฉพาะของเซลล์ชนิดนั้นๆ อย่างรวดเร็ว เป็นผลให้อาจมีปัญหาเรื่อง reproducibility ของผลการทดลอง ตัวอย่างของเซลล์ในกลุ่มนี้ได้แก่

- human keratinocytes
- NHEK: normal human epidermal keratinocytes culture ซึ่งสามารถมี terminal differentiation สร้าง keratin และเซลล์ชั้นบนของโคโลนีจะหมดความสามารถในการแบ่งตัวและเริ่มสร้าง cornified cell envelope (Ekwall et al, 1990, หน้า 79; Kalinin, Marekov & Steinert, 2001)
- liver cells and Chang liver cells
- human fibroblasts
- human lung fibroblasts
- human mesenchymal stem cells

<sup>3</sup> **กลุ่ม 6100: Human** ประกอบด้วย review articles ที่รวบรวมงานในเซลล์หลากหลาย แทบทั้งหมดเป็นงานที่อยู่ในกลุ่ม 6200, 6300 และ 6400 ส่วนบทความที่ไม่อยู่ในกลุ่มดังกล่าว เป็นบทความที่ไม่สามารถหาเอกสารฉบับเต็มได้ (ตรงกับ CoR กลุ่ม 4 ซึ่งไม่ใช้ในการศึกษาอยู่แล้ว) การทบทวนเอกสารในกลุ่มนี้ ไม่ได้นำมาใช้ จนกว่าจะได้สกัดองค์ความรู้จากรายงานวิจัยทุกฉบับเสร็จเรียบร้อยแล้ว จึงจะอ่านเอกสารในกลุ่มนี้ด้วย ก่อนเขียนบทสรุป

- peripheral blood mononuclear cells (PBMC)
- J-774: macrophage
- macrophage culture
- human washed platelets
- human ecto-cervical tissue

**กลุ่ม 6300: Human non-cancer cell lines** เป็นเซลล์มนุษย์ที่ถูกเพาะเลี้ยงเป็น cell culture และได้รับการ subculture มาหลายชั่ววัฏจักร (spontaneous transformation) หรือถูก transform ด้วยไวรัส สารเคมี หรือตัวกระทำทางกายภาพ (induced transformation) เป็นต้น cell line ในกลุ่มนี้อาจจะเป็น finite cell line ซึ่งมีจำนวนการแบ่งตัวจำกัดประมาณ 40-50 generations หรือ continuous cell line ซึ่งเป็นอมตะ ตัวอย่างของ cell line ในกลุ่มนี้ได้แก่

- BEAS-2B: human bronchial epithelial cell line
- HCE-T human corneal epithelial cell line
- HaCaT: human keratinocyte immortal cells
- IMR-90: human lung fibroblast cell line มีที่มาจากเนื้อเยื่อปอดของ human female embryo ที่ถูกทำแท้งในกระบวนการรักษา ได้รับการพัฒนาขึ้นโดย เมื่อ ค.ศ. 1975 เพื่อเป็น “a highly characterized, rigorously growing primary human fibroblast cell line” ที่ในปัจจุบันเป็น cell line มาตรฐานซึ่งใช้ในการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์หลายสาขา (Beiswanger, 2004)
- Jurkat: immortalized T lymphocyte cells

**กลุ่ม 6400: Human cancer cells และ cell lines** เป็น cells และ continuous cell line ที่ได้มาจากเซลล์มะเร็ง มีข้อดีที่เพาะเลี้ยงได้ง่าย แต่เซลล์อาจมีลักษณะแตกต่างจากเซลล์ปกติของมนุษย์ได้มาก ตัวอย่างในกลุ่มนี้ได้แก่

- fibrosarcoma
- skin carcinoma
- glioblastoma
- A549: human lung adenocarcinoma cell line
- HepG2: human hepatoma cells

- HT29: human colon adenocarcinoma cell line
- Caco-2: heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cells
- THP-1: human acute monocytic leukemia cell line
- SGC7901: gastric cancer cells
- MCF-7: breast cancer cells
- HeLa cells
- HL60: Human promyelocytic leukemia cell line

โดยสรุป เอกสารการวิจัยที่รวบรวมได้ เป็นการทดลองแบบนอกกาย (in vitro) ไม่ว่าจะใช้เซลล์ของมนุษย์ที่เลี้ยงไว้เป็น primary cell culture หรือใช้ cell line มนุษย์ หรือเซลล์มะเร็งของมนุษย์ที่เลี้ยงไว้เป็น cell line อื่นๆ ไม่ปรากฏว่ามีรายงานการทดลองแบบในกาย (in vivo) ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากปัญหาจรรยาบรรณของการวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

- Beiswanger, C. 2004. A brief history of IMR-90. in *Cell Collection*, A publication of the Coriell Cell Repositories 2003/2004, p. 5. <http://www.cogforlife.org/imr90CoriellFullReport.pdf>
- Kalinin, A., L.N. Marekov & P.M. Steinert. 2001. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J. Cell Sci.* **114**:3069-3070.
- Ekwall, B., V. Silano, A. Paganuzzi-Stammati & F. Zucco. 1990. Toxicity tests with mammalian cell cultures. in Bourdeau et al. ed. *Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects*. John Wiley & Sons, Ltd.

## 4. การทำลายเซลล์และความเป็นพิษต่อเซลล์

รายงานผลการวิจัยที่ทำในเซลล์มนุษย์ มีความครอบคลุมเพียงแต่ในแต่ละประเด็นยังมีจำนวนการทดลองค่อนข้างน้อย ทำให้การยืนยันผลการทดลองมักจะมีไม่สมบูรณ์

### 4.1. หลักการทดสอบ

การทดสอบภาพรวมของเซลล์ ตรงกับคำศัพท์ว่า viability assay กับ cytotoxicity assay ซึ่งหลายสำนักอาจใช้ในความหมายที่ต่างกันอยู่บ้าง ในที่นี่จึงจะใช้ viability assay ในความหมายว่า การทดสอบการอยู่รอด (หรือการตาย) ของเซลล์ ส่วน cytotoxicity assay ใช้ในความหมายว่า การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ คือเซลล์อาจมีสภาพป่วยหรือสุขภาพไม่ดี (unhealthy) แต่ไม่ถึงกับตาย และอาจกลับฟื้น (recover) คืนสภาพเป็นเซลล์ปกติได้

#### 4.1.1. สัณฐานและพฤติกรรมของเซลล์ (morphology and behavior)

การศึกษาในกลุ่มนี้ ใช้การสังเกต live cells ผ่านกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ optics ที่ไม่ต้องย้อมสี เช่น phase contrast microscopy และ differential interference contrast (DIC) microscopy (Nomarski) ทำให้เห็นสัณฐานของเซลล์และความผิดปกติ เช่น การลอกขึ้นจากพื้นผิวที่เกาะอยู่ (detachment) การมีถุงน้ำโป่งขึ้นบนผิวจนบวมเป็นก้อนและอาจหลุดออกจากเซลล์ในที่สุด (blebbing) การมีถุงน้ำในเซลล์ (vacuolization) ฯลฯ

การสังเกต living cells ผ่านกล้องจุลทรรศน์ ทำให้สามารถบันทึกกิจกรรมที่เซลล์ทำเป็นปกติว่ามีความเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเคลื่อนไหวหรือเคลื่อนที่ (motility) ในรูปแบบต่าง ๆ ทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ รวมทั้งการแบ่งเซลล์ ซึ่งจะได้กล่าวต่อไปในหัวข้อการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรของเซลล์

#### 4.1.2. การเจริญเติบโตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ (growth)

การทดลองทางพิษวิทยาส่วนใหญ่ ไม่ได้ตรวจวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ เนื่องจากผู้วิจัยให้ความสำคัญต่อการเจ็บป่วยหรือการตายของเซลล์มากกว่า แต่ในกรณีที่เฝ้าพบความเจ็บป่วยเฉียบพลัน มีความเป็นไปได้ที่จะตรวจสอบดูว่า เซลล์ยังมีการเติบโตในระยะยาวที่ปกติอยู่หรือไม่

การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ อาจทำได้ในหลายรูปแบบ เพื่อให้ได้ตัวเลขความเข้มข้นของสารที่สงสัย ที่ทำให้เซลล์ร้อยละ 50 ไม่เติบโต ซึ่งเรียกว่า median inhibitory dose (ID<sub>50</sub>) การเจริญเติบโตของเซลล์อาจวัดได้โดย

- วัด plating efficiency หรือความสามารถของเซลล์ในการสร้างโคโลนี (Bourdeau et al, 1990, หน้า 80)
- นับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (แทนการวัดความขุ่นของ medium ซึ่งทำได้ไม่สะดวกในกรณีเซลล์มนุษย์ ซึ่งมักเกาะติดผิวของภาชนะ)
- วัดปริมาณโปรตีน, DNA หรือเอนไซม์ที่มีในเซลล์

#### 4.1.3. การรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สารผ่านเข้าและออกจากเซลล์ได้สะดวก

การทดสอบการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นเครื่องบอกการตายของเซลล์ เพราะทันทีที่เซลล์ตาย เยื่อหุ้มเซลล์จะเริ่มปล่อยให้สารต่างๆ ผ่านเข้าออกได้โดยสะดวก การทดสอบในกลุ่มนี้ส่วนมากจึงใช้การย้อมสีเซลล์ด้วย vital dye (vital stain) เช่น trypan blue ซึ่งจะเข้าไปย้อมเซลล์ที่ตายแล้วให้ติดสีฟ้า ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสี มองในกล้องจุลทรรศน์เห็นเป็นสีเทาจางๆ หรือสีปกติของเซลล์ชนิดนั้นๆ (Hackenberg et al, 2011)

แทนที่จะทดสอบการเข้าเซลล์ที่ตายแล้วโดย vital stains ก็อาจจะทดสอบสารที่มีอยู่ในเซลล์ตามธรรมชาติ ซึ่งจะรั่วออกมาจากเซลล์เมื่อเซลล์ตาย เช่น ทดสอบเอนไซม์ acid phosphatase (Ekwall et al, 1990, หน้า 81) หรือทดสอบเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ใน medium รอบๆ เซลล์ ด้วยการวัด enzymatic activity ของ LDH (พบได้ในชุดตรวจ CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay ซึ่งเป็นส่วนผสมของ substrate ของ LDH ได้แก่ lactate กับ NAD<sup>+</sup> ในความเข้มข้นที่สูง แล้ววัด NADH ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาด้วยการที่ NADH ช่วยใหเอนไซม์ diaphorase เปลี่ยน resazurin (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one) ให้กลายเป็น resorufin ซึ่งเป็นสารที่วาวแสง (excitation/emission = 563/587 nm) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเซลล์ปกติก็สร้าง NADH ดังนั้นเพื่อป้องกันการรบกวนจากเซลล์ปกติ การทดสอบนี้จึงมักทำที่อุณหภูมิต่ำ (อุณหภูมิห้อง) และใช้เวลาการทดสอบที่สั้น (ประมาณ 10 นาที)

อีกวิธีหนึ่งที่จะทดสอบหาการรั่วของ lactate dehydrogenase ก็คือการใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์คู่ควบเป็นเวลา 30 นาที เพื่อเปลี่ยน tetrazolium salt (INT) ซึ่งออกสีเหลือง ให้เป็นสาร

formazan สีม่วงแดง โดยที่ความเข้มของสีขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่แตก แล้วจึงวัดการดูดกลืนแสงของ medium (พบได้ในชุดตรวจ CytoTox 96® Non-Radiative Cytotoxicity Assay) โดยต้องระวังว่า medium ที่เลี้ยงเซลล์ไว้ ไม่ได้มี LDH จาก serum ที่อยู่ในสูตร และไม่ได้ผสมด้วย phenol red ซึ่งจะออกสีแดงคล้ายกับสีของ formazan ที่ต้องการวัด

การทดสอบในกลุ่มนี้ ปัจจุบันนิยมใช้ fluorogenic peptide substrate ชนิดที่ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์ที่มีชีวิตได้ เช่น bis-alanyl-alanyl-phenylalanyl-rhodamine 110 หรือ bis-AAF-R110 (พบได้ในชุดตรวจ CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay และชุดตรวจ MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay) ซึ่งเมื่อเติมลงไปใน cell culture แล้ว bis-AAF-R110 จะถูกย่อยด้วย protease ที่รั่วออกมาจากเซลล์ที่ตายแล้ว ได้สาร rhodamine ซึ่งเป็นสารวาวแสง (fluorescent) ซึ่งตรวจพบได้โดยการใช้ spectrofluorometer วัดแสงจาก cell culture หรือใช้ flow cytometry

ในทางตรงกันข้าม เราอาจใช้ความสามารถในการสะสมสารไว้ในเซลล์ เป็นเครื่องบอกการมีชีวิตของเซลล์ได้ เป็นต้นว่าเมื่อเซลล์ถูกย้อมสี neutral red เซลล์ที่มีชีวิตจะสะสมสีไว้ในไซโตพลาสซึม ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะไม่สามารถสะสมสีได้ (Bourdeau et al, 1990, หน้า 80)

สารอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ คือ calcein-AM (acetomethoxy calcein หรือ fluorexon-AM) 1 uM in culture media จะแพร่ผ่าน plasma membrane เข้าไปในเซลล์ แล้วถูก esterase ภายในเซลล์ย่อยให้กลายเป็น calcein (fluorexin) ซึ่งจับ  $\text{Ca}^{2+}$  และ  $\text{Mg}^{2+}$  ได้สารวาวแสง (excitation/emission = 495/515 nm) ส่งในกล้องจุลทรรศน์ florescence microscope เห็นเซลล์ที่มีชีวิตเป็นสีเขียว (Greulich, 2009)

การทดสอบการสะสมสารไว้ในเซลล์ ปัจจุบันนิยมใช้ fluorogenic, cell-permeant peptide substrate เช่น glycyl-phenylalanyl-amino-fluorocoumarin หรือ GF-AFC (พบได้ในชุดตรวจ MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay) ซึ่งเมื่อเติมลงไปใน cell culture แล้ว GF-AFC จะถูกลำเลียงเข้าไปในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ แล้วถูกย่อยด้วย protease ในเซลล์ ได้สาร coumarin ซึ่งเป็นสารวาวแสง ซึ่งสามารถตรวจพบได้ทั้งโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescence microscope โดยการใช้ spectrofluorometer วัดแสงจาก cell จำนวนมากพร้อมกัน ใน cell culture หรือใช้ flow cytometer แยกตรวจทีละเซลล์อย่างรวดเร็ว

อนึ่ง การที่เยื่อหุ้มเซลล์ตายที่รั่วแล้วปล่อยให้สารผ่านเข้าออกได้ทั้งสองทาง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการทดสอบ cell viability โดยใช้สีย้อมสองสีพร้อมกัน เช่น ย้อมเซลล์ใน 40 ug/ml fluorescein diacetate ผสมกับ 50 ug/ml ethidium bromide แล้ว excite ด้วยแสงสีน้ำเงิน (ความยาวคลื่น 488 nm) เซลล์ที่มีชีวิตจะย้อมติดสีเขียวของ fluorescein ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะย้อมติดสีส้มในนิวเคลียส (Hackenberg, et al 2011)

#### 4.1.4. ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของเซลล์ (metabolic capacity)

การเปลี่ยนแปลงทางเคมีซึ่งเป็นการทำงานตามปกติของเซลล์ จะเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ลดลง ถ้าหากเซลล์ได้รับสารที่เป็นพิษ หรือถูกกระตุ้นให้เกิดสารที่เป็นพิษขึ้นในเซลล์ ดังนั้นผลการทดสอบ metabolic capacity จึงเป็นการมองที่ปลายเหตุ ถ้าพบว่าความสามารถในการเปลี่ยนแปลงทางเคมีลดลง จึงควรตรวจสอบดูว่าเกิดมาจากสาเหตุอะไร ผ่านทางกลไกอะไร (เช่น ความเครียดออกซิเดชัน หรือ oxidative stress เป็นต้น)

เราสามารถประเมิน metabolism ของเซลล์ได้จากระดับความเข้มข้นของสารเคมีในกระบวนการชีวเคมีตามปกติของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารเคมีที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างพลังงานของเซลล์ ว่ามีระดับผิดไปจากปกติหรือไม่ สารเคมีที่นิยมวัด ได้แก่ ATP ซึ่งเป็นสารเก็บพลังงานไว้ในรูปของพลังงานศักย์ทางเคมี และ reducing equivalents เช่น NADH และ NADPH และสารอื่นๆ ใน electron transport chain ส่วนก๊าซออกซิเจนที่เซลล์ใช้ในการหายใจนั้น ถึงแม้สามารถวัดได้เช่นกัน แต่ไม่พบในรายงานการวิจัยที่ได้คัดเลือกไว้

เซลล์ที่มีชีวิตตามปกติจะสร้าง ATP อยู่ตลอดเวลา แต่ไม่สะสมไว้มาก เนื่องจากมีกิจกรรมที่ต้องใช้ ATP อยู่ตลอดเวลาเช่นกัน (เช่น  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase ใน plasma membrane มีหน้าที่รักษาระดับของ resting potential) เซลล์ที่ “ป่วย” อาจจะสร้าง ATP น้อยลง แต่ที่แน่นอนคือทันทีที่เซลล์ตาย การสร้าง ATP จะลดลงอย่างรวดเร็ว ระดับของ ATP ที่วัดได้ใน cell culture จึงเป็นดัชนีบ่งบอกสุขภาพของเซลล์ และจำนวนของเซลล์ที่ยังเหลือรอดอยู่ได้ (ในกรณีหลังนี้สมมติให้ระดับของ ATP ที่ลดลง มาจากการตายของเซลล์เท่านั้น) การวัด ATP ในเซลล์ทำได้โดยย่อย plasma membrane ให้สลายตัว ปล่อยให้ ATP ออกมาใน medium ในขณะที่เติมสารยับยั้ง ATPase activity ตามปกติของเซลล์ จากนั้นจึงวัดระดับของ ATP เช่นโดยการใช้ปฏิกิริยา luciferin-luciferase bioluminescent reaction (พบในชุดตรวจ CellTiter-Glo®) แล้วบันทึกแสงที่เกิดขึ้นด้วยกล้อง CCD หรือเครื่องวัดที่ดัดแปลงมาจาก fluorometer



ระดับความเข้มข้นของ ATP ที่ลดลงใน cell population อาจหมายถึงความถึงการที่เซลล์ตายไปบางส่วน แต่ถ้าจำนวนเซลล์หรือความหนาแน่นไม่เปลี่ยนแปลง ระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของ ATP ที่ลดลงก็จะเป็นเครื่องชี้ metabolic capacity ที่ลดลง

เราอาจประเมินระดับพลังงานของเซลล์ได้อีกวิธีหนึ่ง คือ ประเมินจาก mitochondrial membrane potential โดยย้อมด้วยสี JC-1 เป็นเวลา 30 นาทีที่ 37 °C (Piao et al, 2011)

ในการวัด reducing equivalents ในเซลล์ (เช่นใน CellTiter-Blue® Cell Viability Assay) นิยมวัดด้วยการรีดิวซ์ resazurin ซึ่งมีสีน้ำเงินเข้มและแทบจะไม่วาวแสงเลย ให้เป็น resorufin ซึ่งเป็นสารวาวแสง (excitation/emission = 579/584 nm) โดยทำปฏิกิริยาที่ 37°C เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง (อุณหภูมิสูงและใช้เวลานานกว่าการทดสอบ LDH ดังกล่าวถึงข้างต้น เพื่อเน้นเซลล์มีชีวิต) จุดเด่นของการทดสอบด้วย resazurin อยู่ที่ความง่าย ความสะดวก และประหยัด ของวิธีการทดสอบ

อีกแนวทางหนึ่ง reducing equivalents ในเซลล์อาจวัดได้โดยการรีดิวซ์ tetrazolium dye ชนิดใดชนิดหนึ่งให้เป็นสารประเภท formazan ซึ่งมีสีม่วง โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงในเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นใดความยาวคลื่นหนึ่งในช่วง 500-600 nm หลังให้ทำปฏิกิริยา 1 ถึง 4 ชั่วโมงแล้วแต่การออกแบบการทดสอบ tetrazolium dye ที่นิยมใช้มีหลายชนิด เช่น

- **MTT** (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) เป็นสารสีเหลืองตามสูตรดั้งเดิม เมื่อถูกรีดิวซ์แล้วให้สาร formazan ที่ไม่ละลายน้ำ จึงต้องเติมน้ำยา solubilizing solution (ซึ่งอาจประกอบด้วย DMSO หรือ acidified ethanol solution หรือ SDS ในสารละลาย HCl เจือจาง) จึงจะเกิดสารละลายสีม่วงให้วัดค่าการดูดกลืนแสงได้

- **MTS** (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) เป็นอนุพันธ์ของ tetrazolium salt เช่นเดียวกับ MTT เมื่อถูกรีดิวซ์แล้วให้สาร formazan ที่วัดค่าการดูดกลืนแสงใน phosphate buffer saline ได้ที่ความยาวคลื่นระหว่าง 490-500 nm (พบได้ในชุดตรวจ CellTiter 96® AQueous series เช่น ชุดตรวจ CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) ชุดตรวจที่ใช้ปฏิกิริยาของ MTS กับ electron coupling reagent phenazine methosulfate (**PMS**) มักเรียกกันว่า “one-step MTT assay” ซึ่งหมายถึงการให้ความสะดวกในการทำการทดลอง (พบได้ในชุดตรวจ CellTiter 96®

AQueous series เช่น ชุดตรวจ CellTiter 96® AQueous One Non-Radioactive Cell Proliferation Assay)

• **WSTs** (Water soluble Tetrazolium salts) เป็น tetrazolium dye ใหม่ ๆ ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยการเติมหมู่ที่มีประจุไฟฟ้า หมู่ hydroxyl หรือหมู่ sulfonate เข้าไปใน phenyl ring ของ tetrazolium salt เพื่อให้สาร formazan ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยารีดักชันเป็นสารที่ละลายน้ำได้ จึงให้ความสะดวกในการทำการทดลอง ให้สัญญาณที่แรงกว่า MTT และลดความเป็นพิษต่อเซลล์ สาร WST ที่พบได้มากคือ **XTT** (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)

## 4.2. รายงานผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 4.2.1. สัณฐานและพฤติกรรมของเซลล์ (morphology and behavior)

ทั้ง MR-90 normal human lung fibroblast และ U251 human glioblastoma cells ที่สัมผัสกับอนุภาคโลหะเงินนาโนขนาด 6-20 nm (เคลือบด้วย soluble potato starch) จะไม่แผ่บนพื้นผิวตามปกติ โดยจะกลมมากขึ้น มีติ่ง (blebbling) ออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ และมี filopodia น้อยลง RT-PCR ของ filamin mRNA แสดงให้เห็นการ down regulation ของ filamin ซึ่งเป็นกลุ่มของ actin binding proteins ที่มีหน้าที่ในการสร้างโครงข่าย cytoskeleton (Asharani et al, 2009a) บนผิวเซลล์ U251 ปรากฏเป็น dark orange patch ซึ่งไม่สามารถล้างออกได้ คล้ายกับจะเป็นอนุภาคที่ adsorb อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ (Asharani et al, 2009b)

MR-90 normal human fibroblasts ที่สัมผัสกับ AgNP ที่ความเข้มข้น 0, 25, 100, 200 และ 400 ug/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วล้างเอาอนุภาคนาโนออก สามารถกลับเป็นปกติ (recover) ได้ในเวลาประมาณ 3, 3, 5, 15 และ 30 วันตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่ปรากฏความเปลี่ยนแปลงในรูปพรรณสัณฐานของนิวเคลียส (Asharani et al, 2009a)

ในการทดลองให้เซลล์ NHEK และ NHEF สัมผัสกับ PVP fiber ที่ฝังไว้ด้วย AgNP หรือ Ag+ ปรากฏว่า ลักษณะและพฤติกรรมการแผ่ตัว (spreading) ของเซลล์ มีความไวต่อ AgNP และ Ag+ ใกล้เคียงกัน (Chun et al, 2010)

ในกรณีของ platelets < 100 nm AgNP (Aldrich 576832) สามารถ induce platelet activation ได้ ในขณะที่ 5-8  $\mu\text{m}$  Ag particles อ่อนกำลังกว่ามาก นอกจากนั้น AgNP ยังทำให้เกิด phosphatidylserine (PS) exposure ซึ่งเป็นขั้นตอนการเตรียมใช้งาน (precoagulant activation) ของ platelets ตามปกติ (Jun et al, 2011)

#### 4.2.2. การเจริญเติบโตของเซลล์ (growth)

ไม่ปรากฏการทดสอบในรายงานผลการวิจัยที่รวบรวมได้

#### 4.2.3. การรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane leakage)

platelets จาก fresh human blood ไม่แสดงการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ให้ตรวจพบ LDH ใน outside medium ได้ แม้ว่าจะอยู่ใน 500  $\mu\text{M}$  AgNP ก็ตาม (Shrivastava et al. 2009) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาใน L5178Y cells และ BEAS-2B cells ซึ่งไม่เห็นการรั่วของเซลล์ที่ 500  $\mu\text{M}$  AgNP เช่นเดียวกันทั้งๆ ที่เป็นเซลล์และ AgNP คนละชนิด แต่ที่ความเข้มข้นของ AgNP สูงมาก (เป็นสิบเท่าของ 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) แสดง dose-dependent toxicity จาก trypan blue exclusion assay เมื่อได้สัมผัสกับ <100 nm AgNP ที่ซื้อมาจาก Sigma-Aldrich (Kim et al, 2010)

การทดลองให้ human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells สัมผัสกับ < 50 nm AgNP (Sigma) แล้ววัดการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่า AgNP เริ่มแสดงความมีพิษต่อเซลล์ที่ 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Hanckenberg, 2011)

#### 4.2.4. ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของเซลล์ (metabolic capacity)

เซลล์ IMR-90 human lung fibroblasts และ U251 human glioblastoma cells ที่สัมผัสอยู่กับ 6-20 nm AgNP ที่เคลือบด้วยแป้ง เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง มีระดับของ ATP ในเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดและ dose dependent การทดสอบการรีดิวซ์ resazurin ให้เป็น resorufin ซึ่งเป็นสารเรืองแสง โดยใช้ชุดตรวจ CellTiter-Blue® Cell Viability Assay ช่วยยืนยันผลการทดสอบจากระดับความเข้มข้นของ ATP (Asharani et al, 2009b)

จากการวัดด้วย CellTiter- 96® aqueous cell proliferation assay kit พบว่า 1.5 nm AgNP ความเข้มข้น > 15 ppm (เคลือบด้วย polymer หรือ surfactant) แสดง cytotoxic effect ต่อ PBMC ที่ถูกกระตุ้นโดย PHA (Shin et al, 2007) few

เมื่อ human mesenchymal stem cells สัมผัสเป็นเวลา 7 วัน กับ AgNP ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 nm ที่เคลือบด้วย PVP ใน medium ที่เติม 10% FCS ครึ่งหนึ่งของเซลล์ตาย เมื่อใช้ AgNP ความเข้มข้นมากกว่า ~3 ug/ml ส่วนในกลุ่มควบคุม ครึ่งหนึ่งของเซลล์ตายเมื่อใช้ Ag<sup>+</sup> ions ความเข้มข้นมากกว่า ~1 ug/ml (Greulich et al, 2009) ผู้วิจัยได้ตั้งสมมุติฐานว่า cytotoxic effect มีความแตกต่างทางกลไกจาก antimicrobial effect ซึ่งเกิดที่ความเข้มข้นของ Ag น้อยกว่ามาก อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ เนื่องจากความแตกต่างระหว่างขนาด รูปร่าง และสารเคลือบผิวของ AgNP และสถานะที่ใช้ในการทดลองต่างๆ ที่ผู้วิจัยได้วิจารณ์เปรียบเทียบ (Greulich et al, 2009)

อย่างไรก็ตาม เมื่อเติม AgNP ขนาด 20-80 nm ที่เคลือบผิวด้วยคาร์บอน และที่ไม่ได้เคลือบผิว ลงไปใน culture ของ human epidermal keratinocytes (HEK) ไม่พบความเปลี่ยนแปลงของ viability (Samberg et al, 2010)

## เอกสารอ้างอิง

- AshaRani, P.V., M.P. Hande, and S. Valiyaveetil. 2009. "Anti-proliferative activity of silver nanoparticles." *BMC Cell Biology* **10**:65-79.
- Asharani, P. V., G. Low Kah Mun, et al. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* **3**(2): 279-290.
- Chun, J.Y. H.K. Kang, L. Jeong, Y.O. Kang, J. Oh, I. Yeo, S.Y. Jung, W.H. Park, and B. Min. 2010. Epidermal cellular response to poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, **78**(2):334-342.
- Ekwall, B., V. Silano, A. Paganuzzi-Stammati & F. Zucco. 1990. Toxicity tests with mammalian cell cultures. in Bourdeau et al. ed. *Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Hackenberg, S., A. Scherzed, M. Kessler, S. Hummel, A. Technau, K. Froelich, C. Ginzkey, C. Koehler, R. Hagen, and N. Kleinsasser. 2011. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters* **201**:27-33.
- Jun, E., K. Lim, K. Kim, O. Bae, J. Noh, K. Chung, and J. Chung. 2011. Silver nanoparticles enhance thrombus formation through increased platelet aggregation and procoagulant activity. *Nanotoxicology*, (Early Online):158–168
- Piao, M.J., K.A. Kang, I.K. Lee, H.S. Kim, S. Kim, J.Y. Choi, J. Choi, and J.W.Hyun. 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells though inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letter*. **201**:92-100.
- Samberg, M.E., S.J. Oldenburg, and N.A. Monteiro-Riviere. 2010. Evaluation of silver nanoparticles toxicity in skin *in vivo* and keratinocytes *in vitro*. *Environmental Health Perspectives*. **118**(3):407-413.



## 5. การลำเลียงอนุภาคโลหะเงินนาโนเข้า และออกจากเซลล์

นอกเหนือจากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ในภาพรวม เช่น การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การเติบโต การสร้างพลังงาน การตาย ฯลฯ ของเซลล์มนุษย์ ที่นำเสนอไว้ในบทก่อนหน้านี้แล้ว การศึกษาที่มีการรายงานไว้เป็นเบื้องต้น ก็คือผลของการแผ่รังสีจากการสัมผัสของอนุภาคกับเยื่อหุ้มเซลล์ การลำเลียงอนุภาคเข้าเซลล์ การกระจายตัวของอนุภาคที่เข้าไปในเซลล์แล้ว และการลำเลียงหรือการขับอนุภาสดังกล่าวออกจากเซลล์

### 5.1. หลักการทดสอบ

#### 5.1.1. การผ่านผิวหนังของอนุภาคโลหะเงินนาโน

โดยทั่วไปใช้อุปกรณ์ Franz static diffusion cell (Franz, 1975) ซึ่งซึ่งผิวหนัง (เช่น abdominal skin ที่ได้รับการบริจาค หรือเป็นของเหลือจากการทำศัลยกรรม) ไว้ระหว่างสอง compartments ด้านหนึ่งเป็นผิวหนังด้านนอกที่สัมผัสกับอนุภาคนาโน ในรูป ผงฝุ่น แขนงลอยในของเหลว หรือในเจล ครีม ฯลฯ ส่วนอีกด้านหนึ่งสมมุติว่าเป็นเลือดในร่างกาย ที่สามารถดูดตัวอย่างออกมาตรวจวัดความเข้มข้นของอนุภาคได้ อุปกรณ์ทั้งสองด้านมีระบบควบคุมอุณหภูมิ และระบบกวนหรือไหลเวียนไม่ให้สารละลายที่ใช้แทนเลือดหยุดนิ่ง (แคว้นอยู่กับที่ ไม่ได้ไหลไปไหน จึงเรียกว่า static) อุปกรณ์ที่มีขายในท้องตลาดมักมีหลาย diffusion cells อยู่ในชุด (block) เดียวกัน เพื่อสะดวกในการควบคุมอุณหภูมิ และทำหลายการทดลองขนานกันไป รวมทั้งสำหรับเตรียมตัวอย่างไว้ส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่เวลาต่างๆ เพื่อสังเกตว่าอนุภาคนาโนผ่านเข้าไปในเซลล์หรือไม่ หรือแทรกเข้าไปในช่องว่างระหว่างเซลล์ เช่น ในรูขุมขน ใน stratum corneum lipidic matrix ฯลฯ

ผลการทดลองมักวาดเป็นกราฟ แสดงความเข้มข้นของอนุภาคที่ตรวจพบที่ compartment ด้านในร่างกาย ณ เวลาหลังเริ่มทำการทดลอง พร้อม electron micrograph ณ เวลาหนึ่งๆ

### 5.1.2. การลำเลียงอนุภาคเข้าเซลล์

ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทั้ง TEM และ STEM ในการติดตามการลำเลียงอนุภาคเข้าเซลล์ โดยที่จุดเด่นของ STEM คือความสามารถในการระบุตำแหน่งของ AgNP โดยใช้เทคนิค Energy Dispersive X-ray (EDX) Spectroscopy จุดอ่อนของเทคนิคในกลุ่มนี้ คือไม่สามารถใช้กับเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้

การตรวจสอบว่า endosome เป็นชนิดที่ผ่านทางโครงสร้าง clathrin coated pits หรือไม่ ทำได้โดยกำจัด  $K^+$  นอกเซลล์ (Asharani et al, 2009b) แล้วตรวจสอบว่า endocytosis ยังเกิดขึ้นได้หรือไม่

การตรวจสอบว่า endosome เป็นชนิด macropinocytosis หรือไม่ ทำได้โดยการเติม wortmanin ซึ่งจะไปยับยั้งการเกิด macropinocytosis (Asharani et al, 2009b)

การตรวจสอบว่า endosome เป็นชนิดที่ผ่านขั้นตอน caveolin dependent endocytosis หรือไม่ ทำได้โดยการเติม nystatin ซึ่งจะไปยับยั้งการเกิด caveolin dependent endocytosis (Asharani et al, 2009b)

### 5.1.3. การกระจายตัวของอนุภาคขณะอยู่ในเซลล์

ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทั้ง TEM และ STEM/EDX ในการติดตามอนุภาค AgNP ขณะอยู่ในเซลล์

### 5.1.4. การลำเลียงอนุภาคออกจากเซลล์

ในระดับเซลล์ สามารถใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทั้ง TEM และ STEM/EDX ในการติดตามอนุภาค AgNP ขณะถูกลำเลียงออกจากเซลล์

ในระดับ cell population ใช้การ wash เซลล์ แล้วแยกวิเคราะห์ Ag ในส่วนที่เป็นเซลล์ และในส่วนน้ำล้างหลังจากปั่นแยก



## 5.2. รายงานผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 5.2.1. การเคลื่อนที่ของอนุภาคโลหะเงินนาโนผ่านผิวหนัง

ในระดับผิวหนัง มีการทดสอบการเคลื่อนที่ของ AgNP ขนาด  $25 \pm 7.1$  nm ซึ่งเคลือบไว้ด้วย PVP ผ่าน human abdominal full thickness skin ซึ่งติดตั้งไว้บน Franz static diffusion cell สรุปได้ว่า การดูดซึม AgNP ผ่านผิวหนังมนุษย์เกิดขึ้นในระดับต่ำ เมื่อเทียบกับการดูดซึมอนุภาคโลหะอื่น แต่ถ้าผิวหนังอยู่ในสภาพ damaged skin การดูดซึมอาจมากขึ้นกว่าเท่าตัว อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีผลการศึกษาที่ชัดเจน ว่า AgNP ผ่านผิวหนังทาง intercellular transcutaneous pathway เช่น hair follicle orifices และ stratum corneum lipidic matrix เช่นเดียวกับอนุภาคอีกหลายชนิด หรือผ่านเข้าเซลล์ผิวหนัง แล้วไปปล่อยออกด้านในร่างกาย (Larese et al, 2009)

### 5.2.2. การลำเลียงอนุภาคเข้าเซลล์

ผลการศึกษาด้วย TEM แสดงว่า 6-20 nm AgNP ที่เคลือบด้วยแป้ง ถูกลำเลียงเข้าเซลล์ IMR-90 normal human lung fibroblasts และ U251 human glioblastoma cells ผ่านกระบวนการ endocytosis กระบวนการ uptake นี้สามารถเกิดขึ้นได้ แม้ clathrin coated pits จะถูกยับยั้งไว้ด้วยการลด  $K^+$  ด้านนอกเซลล์ หรือแม้ caveoli pits จะถูกยับยั้งโดย nystatin แต่ถ้าเติม wortmanin ซึ่งยับยั้งปรากฏการณ์ macropinocytosis การ uptake AgNP เข้าเซลล์จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จึงสรุปในเบื้องต้นได้ว่า AgNP ถูกลำเลียงเข้าเซลล์ดังกล่าวโดยกระบวนการ macropinocytosis เป็นหลัก (Asharani et al, 2009a)

### 5.2.3. การกระจายตัวของอนุภาคขณะอยู่ในเซลล์

ใน IMR-90 normal human lung fibroblasts และ U251 human glioblastoma cells 6-20 nm AgNP ที่เคลือบด้วยแป้ง กระจายตัวค่อนข้างสม่ำเสมอ TEM แสดงให้เห็น endosomes ที่มี AgNP อยู่ภายใน อยู่ใกล้เยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนั้นยังเห็น autophagic vacuoles ที่ภายในเต็มไปด้วย วัสดุรูปร่างเหมือนไมโทคอนเดรีย ซึ่งบรรจุไว้ด้วยอนุภาคที่ไม่ให้อิเล็กตรอนผ่านได้ (Asharani et al, 2009a)

การทดลองให้ human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells สัมผัสกับ < 50 nm AgNP (Sigma) พบว่า AgNP เข้าไปภายในเซลล์ได้ และเข้าไปถึงนิวเคลียสด้วย (Hanckenberg, 2011)

#### 5.2.4. การลำเลียงอนุภาคออกจากเซลล์

ผลการศึกษาแสดงว่า 6-20 nm AgNP ที่เคลือบด้วยแป้ง ถูกขับออกจากเซลล์ IMR-90 normal human lung fibroblasts และ U251 human glioblastoma cells อย่างช้าๆ โดยมีอัตราการลำเลียงขึ้นกับความเข้มข้นของอนุภาค และเพิ่มขึ้นตามเวลา โดยที่ร้อยละ 10 ของ AgNP ถูกขับออกใน 2 ชั่วโมง ร้อยละ 66 ถูกขับออกใน 48 ชั่วโมง แต่ร้อยละ 34 ของ AgNP ไม่ถูกขับออกจากเซลล์เลย (Asharani et al, 2009a)

## เอกสารอ้างอิง

- AshaRani, P.V., M.P. Hande, and S. Valiyaveetil. 2009. "Anti-proliferative activity of silver nanoparticles." *BMC Cell Biology* **10**:65-79.
- Asharani, P. V., G. Low Kah Mun, et al. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* **3**(2): 279-290.
- Franz, T.J., 1975. On the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol.* **93**: 633–640.
- Hackenberg, S., A. Scherzed, M. Kessler, S. Hummel, A. Technau, K. Froelich, C. Ginzkey, C. Koehler, R. Hagen, and N. Kleinsasser. 2011. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters* **201**:27-33.
- Larese, F.F., F. D'Agostin, M. Crosera, G. Adami, N. Renzi, M. Bovenzi, and G. Maina. 2009. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology.* **255**:33-37.



## 6. ความเครียดออกซิเดชัน และการตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ

ความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นสภาวะความเครียดในระดับเซลล์ เมื่อระบบปกติของเซลล์ ไม่สามารถกำจัดสารพวก reactive oxygen species (ROS) ได้หมด ความเสียหายซึ่ง ROS ก่อขึ้นในเซลล์ จะส่งผลกระทบไปถึง metabolism ของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผ่านทาง JNK activation pathway ไปลด membrane potential ที่ไมโทคอนเดรีย เริ่มกระบวนการ caspase activation เพื่อทำลายเซลล์อย่างเป็นระบบ (apoptosis) ซึ่งเป็นกลไกตามธรรมชาติ สำหรับกำจัดเซลล์ที่มีการทำงานผิดปกติ (Piao et al, 2011)

### 6.1. หลักการทดสอบ

#### 6.1.1. ความเครียดออกซิเดชัน

ความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นสภาวะความเครียดในระดับเซลล์ เมื่อระบบปกติของเซลล์ ไม่สามารถกำจัดสารพวก reactive oxygen species (ROS) ได้หมด อันอาจส่งผลกระทบไปถึง metabolism ของเซลล์ และการเกิดโรคหลายชนิด

สารในกลุ่ม ROS เกิดขึ้นจากการทำงานตามปกติของเซลล์ แต่ก็อาจเกิดจากการกระตุ้นจากภายนอกได้ จึงมีความหวังใญ่ว่า AgNP จะสามารถทำให้เกิด oxidative stress ในเซลล์มนุษย์ได้หรือไม่ ไม่ว่าจะโดยตัวของมันเอง หรือผ่านทางกลไกอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อมีรายงานการวิจัยในเซลล์ RAW 264.7 (macrophage-like, Abelson leukemia virus transformed cell line derived from BALB/c mice) ว่ามีความเป็นไปได้ที่อนุภาคนาโนหลายชนิด จะทำอันตรายต่อเซลล์ผ่านทาง oxidative stress (Xia et al, 2006)

ปกติในการตรวจวัด ROS จะต้องทำ viability assay ก่อน เพื่อเลือกสภาวะการทดลอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งขนาดความเข้มข้นของ AgNP ไม่ให้เซลล์ตาย

ROS วัดได้โดยการย้อมเซลล์ด้วย 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) ซึ่งจะแพร่เข้าเซลล์แล้วถูก intracellular esterase ตัดหมู่ acetate ออก ได้สีที่มีประจุไฟฟ้า จึง

ไม่สามารถแพร่ออกจากเซลล์ได้ ซึ่งในที่สุดจะถูกเปลี่ยนสภาพจากไม่วาวแสงเป็นวาวแสง (excitation 492-495 nm, emission 517-527 nm) เมื่อถูกออกซิไดซ์ด้วย ROS ส่วน positive control ใช้เซลล์ที่แช่ไว้ในไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์

dihydroethidium เป็นสารที่ได้จากการรีดิวซ์ ethidium bromide ปกติในสภาวะถูกรีดิวซ์ จะสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เข้าไปวาวแสงเป็นสีน้ำเงินอยู่ในเซลล์ได้ แต่เมื่อถูกออกซิไดซ์ เช่น โดย superoxide radicals จะได้ ethidium ซึ่งจะเข้าไปย้อม DNA ทำให้การวาวแสงเปลี่ยนเป็นสีแดง (peak emission ประมาณ 600 nm และยาวไปจนเกือบถึง 700 nm)

ในกรณีที่ต้องการวัด superoxide radicals กลุ่มควบคุมใช้เซลล์ที่บ่มไว้ใน diethyldithiocarbamic acid (DDC) ซึ่งเป็น strong inhibitor ของเอนไซม์ superoxide dismutase

การทดสอบความเครียดออกซิเดชันอีกแนวหนึ่ง เป็นการทดสอบ intracellular antioxidant systems ซึ่งได้แก่ glutathione (GCL-GSS-GSH), superoxide dismutase, catalase, ฯลฯ

glutathione (GSH) เป็น antioxidant scavenger หลักของเซลล์ มีหน้าที่กำจัด ROS เพื่อลด oxidative stress ต่อเซลล์ เซลล์สังเคราะห์ GSH โดยปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน ซึ่งต้องใช้ ATP ได้แก่ (1) สังเคราะห์ gamma-glutamylcystein ขึ้นจากปฏิกิริยา rate-limiting step ระหว่าง L-glutamate กับ cystein โดยใช้เอนไซม์ gamma-glutamylcystein synthetase (GCL) และ (2) เติม glycine เข้าไปด้าน C-terminus ของ gamma-glutamylcystein โดยเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ glutathione synthetase (GSS) ดังนั้น แนวทางการวิเคราะห์ GSH ในเซลล์ จึงมีดังนี้ คือ

(1) วิเคราะห์ GSH โดยตรง โดยใช้เทคนิค high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy (Piao, 2011) หรือใช้ commercial colorimetric assay (เช่น GSH-400 จาก OXIS International ซึ่งอ่านผลจากการดูดกลืนแสงที่ 400 nm) หรือย้อมเซลล์ด้วย CMAC ซึ่งเป็นสีย้อมวาวแสง (excitation/emission = 351/380 nm) (Tauskela et al, 2000 อ้างถึงใน Piao, 2011)

(2) วิเคราะห์หาเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์ GSH ได้แก่ GCL และ GSS โดย western blot คือใช้ electrophoresis แยกโปรตีนเสียก่อน จากนั้น transfer protein bands ที่ได้ลงไปอยู่บน nitrocellulose membrane ก่อนที่จะ incubate ด้วย primary antibody แล้วจะ incubate ด้วย second antibody ก็ได้ ส่วนการ detect ก็แล้วแต่ว่า เป็น radioactive label หรือเป็น chemiluminescent label บน antibody

### 6.1.2. การตายอย่างเป็นระบบ (apoptosis)

ธรรมชาติมีวิธีกำจัดเซลล์ที่มีความผิดปกติมาก โดยเฉพาะความผิดปกติทางพันธุกรรมไม่ให้แบ่งตัว และถูกย่อยสลายอย่างเป็นระบบ เพื่อนำสารต่างๆ กลับมาใช้ใหม่

เทคนิคมาตรฐานที่ใช้กันมานาน คือการตรวจหา nicks จาก DNA fragmentation ซึ่งเป็นผลจากการย่อยของ nuclease ตาม apoptotic cascade การตรวจประเภทนี้เรียกว่า terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) Assay (Kylarova et al, 2002) โดยการใช้เอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ต่อ X-dUTP (X-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate) เข้าไปเป็น X-dU ที่ terminal end ของสาย DNA จากนั้นก็ย้อมสีเซลล์เพื่อตรวจดูว่ามีร่องรอยของ nicks ที่ terminal end หรือไม่ การตรวจต้องแล้วแต่ X ซึ่งต่ออยู่กับ dUTP ซึ่งใช้ทำปฏิกิริยาในตอนแรก โดยทำใน flow cytometer เพื่อให้ได้ข้อมูลเป็นรายเซลล์ และข้อมูลทางสถิติของทั้ง population

- ถ้า X-dUTP เป็น biotin-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate ปลาย terminal end จะถูก label ด้วย biotin การตรวจใช้การย้อมด้วย fluorescent-avidin เป็นต้น
- ถ้า X-dUTP เป็น 5-bromo-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate ปลาย terminal end จะถูก label ด้วย BrdU การตรวจใช้การย้อมด้วย fluorescent-antibody ต่อ BrdU เช่นย้อมด้วย Alexa Fluor® ซึ่งเป็น antibody ต่อ BrdU เชื่อมกับสารวาวแสงจำพวก fluorescein
- ถ้า X-dUTP เป็น fluorescein-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate ปลาย terminal end จะถูก label ด้วย fluorescein-dU ซึ่งเป็นสารวาวแสงในตัวเอง ไม่ต้องย้อมสีอีก (excitation/emission ~ 495/550 nm)

Annexin assay เป็นการทดสอบที่ใหม่กว่า โดยอาศัยการค้นพบว่า phosphatidylserine (PS) ถูกลำเลียงจากด้านใน ไปยังด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เริ่มจะเกิด apoptosis ในการทดสอบ

ใช้ fluorescein conjugate annexin ซึ่งจะจับตัวกับ phosphatidylserine เป็นผลให้เซลล์ที่เริ่มจะเกิด apoptosis ถูกย้อมด้วยสีดังกล่าว ส่องดูได้ในกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (excitation/emission = 496/550 nm) หรือวัดได้ใน spectrofluorometer หรือใน flow cytometer ซึ่งมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยคำนวณทางสถิติให้ด้วย

ในการทดสอบเดียวกัน มักจะมีการเติม propidium iodide (PI) ลงไปด้วย เพื่อหา necrotic cells ซึ่ง membrane เสียความสามารถในการกั้นไม่ให้สารต่างๆ เข้าไปในเซลล์ PI จึงเข้าไป label DNA ของเซลล์ที่ตายแบบ necrosis ได้ การใช้ PI คู่กับ annexin จึงทำให้สามารถแยกเซลล์ออกได้เป็นสี่กลุ่ม (Sigma-Aldrich, 2012; AshaRani 2009b) คือ

- viable cells: annexin V - PI - ไม่ติดสีเขียว
- early apoptotic cells: annexin V + PI - ย้อมติดสีเขียวเท่านั้น
- late apoptotic cells: annexin V + PI + ย้อมติดทั้งสีเขียวและแดง
- necrotic cells: annexin V - PI + ย้อมติดสีแดงเท่านั้น

การทดลองโดยใช้เทคนิคนี้ ทำกับเซลล์จำนวนน้อยที่แผ่อยู่บนพื้นผิว หรือทำกับเซลล์จำนวนมาก ใน flow cytometer ก็ได้โดยใช้เครื่องมือสองความยาวคลื่น ซึ่งเป็นเครื่องมือมาตรฐานอยู่แล้ว แต่ปัญหาของเทคนิคนี้ อยู่ที่การแปลผลที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ AgNP ว่ามีคำอธิบายอย่างอื่นนอกจาก apoptosis หรือไม่ และในการศึกษาควรจะต้องทำการวัด DNA breakage ควบคู่ไปด้วย (AshaRani et al 2009b)

อนึ่ง การปล่อย PS จากด้านในไปด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์เมื่อเริ่มจะเกิด apoptosis นี้ มีความคล้ายคลึงกับ “PS exposure” ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกเริ่มของ platelet aggregation ดังนั้น จึงมีการศึกษาความสามารถของ AgNP ในการ activate platelet aggregation ด้วย (เช่น Jun, 2011) แต่ในที่นี้จะไม่กล่าวถึง เนื่องจากจะเน้นเฉพาะความเป็นพิษต่อเซลล์

นอกจากนั้น โปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ apoptosis เช่น cytochrome c, caspase 9 และ caspase 3 สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้ western blot ด้วย antibody ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนแต่ละชนิด (Piao et al, 2011)



## 6.2. รายงานผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 6.2.1. ความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress)

ไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งที่เกิดการสร้าง ROS ขึ้นในเซลล์ ในกระบวนการ oxidative phosphorylation ออกซิเจนถูกรีดิวซ์เป็นน้ำด้วยการเติมอิเล็กตรอนอย่างระมัดระวังตามห่วงโซ่การลำเลียงอิเล็กตรอน แต่บางครั้งอิเล็กตรอนก็อาจหลุดออกมา เมื่อ molecular oxygen รับอิเล็กตรอนเข้าไปจะเกิดเป็น superoxide anion radical ซึ่งจะถูกลดลงเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอาจจะถูกรีดิวซ์จนเต็มทีกลายเป็นน้ำ หรือถูกรีดิวซ์บางส่วนเป็น hydroxyl radical ซึ่งนับเป็นออกซิแดนท์ที่แรงที่สุดชนิดหนึ่งในธรรมชาติ (Boonstra et al, 2004 อ้างถึงใน Asharani et al, 2009b) สารพิษที่เซลล์ได้รับเข้าไปเพิ่มอัตราการสร้าง superoxide anion radical ด้วยการขัดขวางการลำเลียงอิเล็กตรอน (ในกรณีนี้อัตราการสังเคราะห์ ATP จะลดลง) หรือไม่ก็รับอิเล็กตรอนมาจากสารในห่วงโซ่การลำเลียงอิเล็กตรอน แต่กลับส่งต่อให้ molecular oxygen (Turrens et al. 2003 อ้างถึงใน Asharani et al, 2009b) AgNP อาจจะเปลี่ยนแปลงการทำงานของไมโทคอนเดรียโดยการขัดขวางห่วงโซ่การลำเลียงอิเล็กตรอน ทำให้เกิด ROS มากขึ้น และ ATP น้อยลง ในขณะที่ระดับ ROS ที่สูงขึ้นก็จะไปทำลายโปรตีนและ DNA ต่อไป

การทดลองกับ IMR-90 normal human lung fibroblasts U251 human glioblastoma cells แสดงว่ามีการสร้าง peroxide และ superoxide มากขึ้นอย่างสำคัญในเซลล์ที่ได้สัมผัสกับ 6-20 nm AgNP ที่เคลือบด้วยแป้ง ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ug/ml AgNP (Asharani et al, 2009b)

จากการทดสอบด้วย RT-PCR พบว่า IMR-90 human lung fibroblasts และ U251 human glioblastoma cells ที่สัมผัสอยู่กับ 6-20 nm AgNP ที่เคลือบด้วยแป้ง แสดง upregulation ของ metallothionein และ hemoxygenase-1 (Asharani et al, 2009a) metallothionein เป็นสารเคมีที่ช่วยในระบบ metal detoxification ของเซลล์ และมักใช้เป็น biomarker ของ metal-induced cytotoxicity ส่วน hemoxygenase-1 เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ย่อยสลาย heme แต่มีผลข้างเคียงเป็นการช่วยป้องกันอันตรายต่อเซลล์จาก oxidizing environment (Morse & Choi, 2005) นอกจากนั้น การทดลองในแบคทีเรียเมื่อไม่นานมานี้ ยังพบว่า ความเป็นพิษของ AgNP ส่วนใหญ่มาจาก oxidative stress และไม่ขึ้นกับความเป็นพิษของ  $Ag^+$  ไอออน (Kim et al, 2007)

ในการทดลองให้ human Chang liver cells สัมผัสกับ <100 nm AgNP (Sigma) ปรากฏว่าระดับของ glutathione ลดลงเรื่อยๆ จากประมาณ 450 uM ลงมาเหลือไม่ถึง 50 mM ภายใน 24 ชั่วโมง ในขณะที่ระดับของ GCLC และ GSS ก็ลดลงในรูปแบบเดียวกัน (Piao et al, 2011)

### 6.2.2. การตายอย่างเป็นระบบ (apoptosis)

กลไกความเป็นพิษต่อเซลล์ของ AgNP อาจจะผ่านทางการตายอย่างเป็นระบบ (apoptosis) เนื่องจากเมื่อปี 2007 มีรายงานการเกิด apoptosis จาก AuNP ซึ่งปกติมีความเป็นพิษน้อยกว่า AgNP อย่างสำคัญ (Pan et al, 2007) และในเวลาไล่เลี่ยกัน ก็มีรายงานว่าพบการเกิด apoptosis จาก AgNP ใน cell line หนู (Hsin et al, 2008)

การทดลองในเซลล์ IMR-90 human lung fibroblasts ด้วยวิธีวัด annexin พบเซลล์เพียงจำนวนน้อย ที่เกิด apoptosis และ necrosis แม้เซลล์จะได้สัมผัสกับ AgNP ที่ความเข้มข้นสูงสุดในการทดลอง (400 ug/ml 6-20 nm AgNP เคลือบด้วยแป้ง) ส่วนในความเข้มข้น AgNP ที่ต่ำ (25-100 ug/ml) จำนวนเซลล์ที่เกิด apoptosis เพิ่มขึ้นร้อยละ 5-9 เทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามผู้วิจัยไม่อาจสรุปให้ชัดเจนได้มากกว่านี้ เนื่องจากอาจมีคำอธิบายว่า ตัวเลขการเพิ่มของ apoptosis อาจเกิดมาจาก ROS ที่เพิ่มขึ้น (Asharani et al, 2009b)

ในการทดลองใน THP-1 cells (human acute monocytic leukemia cell line) พบว่า 0-7.5 ug/ml 69 nm AgNP ที่เคลือบ PVP สามารถกระตุ้นให้เกิด apoptosis ได้ โดยมี threshold concentration ประมาณ 1.5 ug/ml และร้อยละของเซลล์ที่เกิด necrosis มีค่าประมาณ 3 เท่าของเซลล์ที่เกิด apoptosis ณ ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดลอง ในขณะที่ไอออนเงิน ( $Ag^+$ ) มี threshold concentration ประมาณ 0.5 ug/ml (Foldbjerg et al, 2009)

ในการทดลองให้ human Chang liver cells สัมผัสกับ <100 nm AgNP (Sigma) ปรากฏ apoptotic bodies (micronuclear) ซึ่ง correlate ทางเวลากับการลดของ mitochondria membrane potential และการเพิ่มของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis รวมทั้ง active form ของ JNK ด้วย (Piao et al, 2011)

## เอกสารอ้างอิง

- Asharani, P. V., G. Low Kah Mun, et al. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* **3**(2): 279-290.
- Foldbjerg, R., P. Olesen, M. Hougaard, D.A. Dang, H.J. Hoffman and H. Autrup. 2009. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology Letters*. **190**:156-162.
- Hsin, Y., C. Chen, S. Huang, T. Shih, P. Lai, and P.J. Chueh. 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK- dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters*. **179**:130-139.
- Jansky, L., P. Reymanova, and J. Kopecky. 2003. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by *Borrelia*. *Physiol. Res*. **52**:593-598.
- Jun, E., K. Lim, K. Kim, O. Bae, J. Noh, K. Chung, and J. Chung. 2011. Silver nanoparticles enhance thrombus formation through increased platelet aggregation and procoagulant activity. *Nanotoxicology*, (Early Online):158–168
- Kim J.S., E. Kuk, K.N. Yu, J.H. Kim, S.J. Park, H.J. Lee, S.H. Kim, Y.K. Park, Y.H. Park, C.Y. Hwang, Y.K. Kim, Y.S. Lee, D.H. Jeong, M.H. Cho. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* **3**:95-101.
- Piao, M.J., K.A. Kang, I.K. Lee, H.S. Kim, S. Kim, J.Y. Choi, J. Choi, and J.W.Hyun. 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letter*. **201**:92-100.
- Promega. 2011. Protocols & Applications Guide. 3. Apoptosis <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/apoptosis/>,

4. Cell Viability <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability/>

Sigma-Aldrich. 2012. APOAF SIGMA Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit. Sigma-Aldrich on-line catalog. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/apoaf?lang=en>

Tauskela, J.S., K. Hewitt, L.P. Kang, T. Comas, T. Gendron, A. Hakim, M. Hogan, J. Durkin, and P. Morley. 2000. Evaluation of glutathione-sensitive fluorescent dyes in cortical culture. *Glia* **30**:329–341.

Xia, T., M. Kovichich, J. Brant, M. Hotze, J. Sempf, T. Oberley, C. Sloutas, J.I. Yeh, M.R. Wiesner, and A.E. Nel. 2006. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Letters* **6**(8):1794-1807.

## 7. การปล่อยสัญญาณเคมีจากเซลล์

### การส่งสัญญาณเคมีเข้าเซลล์

### และการเคลื่อนที่ตอบสนองต่อสัญญาณเคมีจากเซลล์อื่น

การส่งสัญญาณในรูปของสารเคมี เพื่อสื่อสารระหว่างเซลล์ให้ทำงานร่วมกันได้อย่างสอดคล้อง และตอบสนองต่อสิ่งเร้าหรืออันตรายได้ตามความจำเป็น เป็นกิจกรรมที่สำคัญมากอย่างหนึ่งของร่างกาย ซึ่งประกอบด้วยเซลล์จำนวนมาก ดังนั้น การปล่อยสัญญาณเคมีออกจากเซลล์ การรับสัญญาณเคมีจากเซลล์อื่น การส่งสัญญาณเคมีภายในเซลล์เอง และการเคลื่อนที่ตอบสนองต่อสารเคมีจากเซลล์อื่น จึงเป็นสิ่งที่ต้องทดสอบว่าถูกกระทบจากความเป็นพิษของ AgNP หรือไม่ เพียงใด

#### 7.1. หลักการทดสอบ

##### 7.1.1. การปล่อยสัญญาณเคมีจากเซลล์

สารเคมีที่เซลล์ปล่อยออกมา ไม่ว่าจะเป็นกลุ่ม interleukin เช่น IL-6, IL-8, IL-11 หรือกลุ่ม growth factor เช่น vascular endothelial growth factor (VEGF) สามารถวัดความเข้มข้นได้โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้ commercial antibodies และ standards

##### 7.1.2. การส่งสัญญาณเคมีภายในเซลล์

การส่งสัญญาณเคมีภายในเซลล์ ทำนองคล้ายกับ second messenger นั้น ที่มีการศึกษาอย่างใกล้ชิด คือการเปลี่ยนแปลงของ  $\text{Ca}^{2+}$  ซึ่งติดตามได้โดยใช้ calcium indicator

calcium indicator ที่นิยมใช้ได้แก่ Fura-2, Fluor-3 และ Fluor-4 ในรูปต่างๆ กัน เช่น ในรูป ester ที่สามารถ partition ผ่าน plasma membrane เข้าไปภายในเซลล์ได้ และเมื่อถูก cytoplasmic esterase ย่อยให้อยู่ในรูปที่มีประจุไฟฟ้าแล้ว ก็จะสะสมอยู่ในเซลล์ ไม่สามารถผ่าน กลับออกมานอกเซลล์ได้ ในทางปฏิบัติ ต้องใช้ calcium buffer เพื่อทำ standard curve ภายใน เซลล์ชนิดที่ต้องการศึกษา และต้องระวังว่า ความเข้มข้นของ indicator ไม่มากจนกระทั่งทำตัวเป็น calcium buffer เสียเอง ทั้งยังต้องมีขั้นตอนให้เซลล์พักฟื้นหลังการเติม indicator เนื่องจากสารที่เป็นตัวทำลาย indicator และสารที่เป็นผลจากปฏิกิริยาของ esterase อาจมีความเป็นพิษต่อ เซลล์ได้

### 7.1.3. การเคลื่อนที่ตอบสนองต่อสัญญาณเคมีจากเซลล์อื่น (chemotaxis)

chemoattractant solution เตรียมได้จากการกระตุ้น peripheral blood mononuclear cells (PBMC ซึ่งเตรียมจากการ centrifuge whole blood @ 400xg 30 นาที ใน ficoll density gradient) ด้วย 5 ug/ml lipopolysaccharide (LPS) แล้วปั่นแยกเอาเฉพาะ cell-free supernatant

chemotaxis วัดได้ด้วยวิธี transwell assay โดยการเติม chemoattractant solution ลง ใน 24-well plate (พร้อมกับสารที่ต้องการวัด toxicity) ตามด้วย Falcon™ FluoroBlok™ inserts (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) pore size 3  $\mu\text{m}$  แล้วเติมเซลล์ (พร้อมกับ สารที่ต้องการวัด toxicity) ลงไปบน insert หลังจากรอ 3 วันใน culture condition ก็นับเซลล์ที่ได้ transmigrate ผ่านรูลงไปจนถึงด้านล่างโดยการย้อมสี เช่น calcein-AM แล้วนับเซลล์ใน fluorescence microscope

## 7.2. รายงานผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 7.2.1. การปล่อยสัญญาณเคมีออกจากเซลล์

ตามปกติ เมื่อกระตุ้น human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ด้วย phytohemagglutinin (PHA) PBMC จะปล่อย cytokine ออกมาหลายชนิด เพื่อส่งสัญญาณบอกเซลล์อื่นๆ ให้เตรียมป้องกันตัวและกำจัดผู้บุกรุกซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ร่างกายด้วย

อันที่จริงตามปกติ PBMC ก็สร้าง IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 และ IL-1 $\beta$  อยู่บ้างแล้ว แต่เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS แล้ว PCMB จะเพิ่มการสร้าง IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  เป็นอย่างมาก และเพิ่มการสร้าง IL-6 บ้างเล็กน้อย ในขณะที่มีการหน่วงเวลาการเพิ่มการสร้าง IL-10 (Jansky, Reymanova & Kopecky, 2003)

ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 15 ppm AgNP แสดงความเป็นพิษต่อ PBMC ดังจะเห็นได้จากการลดการปล่อย IL-5, INF และ TNF อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 15 ppm AgNP มีผลยับยั้งอ่อนๆ ต่อการปล่อย IL-5 และยับยั้งอย่างแรง ต่อการปล่อย INF-g และ TNF-a ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ AgNP ที่ใช้ ความรู้นี้นี้อาจนำมาใช้ออกแบบยาลดปฏิกิริยาตอบสนองของร่างกาย โดยเฉพาะการอักเสบ ซึ่งพบได้ในหลายโรค ที่อาการของโรคมาจากปฏิกิริยาของร่างกายเอง (Shin et al, 2007)

100 nm AgNP ที่เคลือบด้วย PVP ที่ความเข้มข้นมากกว่า 5 ug/ml สามารถลดการปล่อย cytokine ชนิด IL-6, IL-8, and VEGF จาก human mesenchymal stem cells ในขณะที่ Ag+ ในความเข้มข้นเพียง 2 ug/ml ขึ้นไป สามารถให้ผลเช่นเดียวกัน ในการทดลองชุดเดียวกันนี้ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ AgNP สามารถยับยั้งการปล่อย cytokines ได้ ปรากฏว่าเซลล์ถูกกระตุ้นให้ปล่อย IL-8 แทนที่จะถูกยับยั้ง ซึ่งพบได้ในการทดลองกระตุ้น human multipotent mesenchymal stem cells ด้วย Ni<sup>2+</sup> อีกด้วย (Habijan et al 2007 อ้างถึงใน Greulich et al, 2009)

การทดลองให้ human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells สัมผัสกับ < 50 nm AgNP (Sigma) พบว่ามีการกระตุ้น (activate) เซลล์เกิดขึ้น (Hanckenberg, 2011)

### 7.2.2. การส่งสัญญาณเคมีภายในเซลล์

จากการทดลองติดตามเซลล์ IMR-90 normal human lung fibroblasts และ U251 human glioblastoma cells ด้วย calcium indicator พบ calcium transient เกิดขึ้นในไซโตพลาสซึมเมื่อเซลล์ดังกล่าวถูกกระตุ้นด้วย 6-20 nm AgNP ที่เคลือบด้วยแป้ง (AshaRani et al, 2009a)

เมื่อให้ IMR-90 fibroblasts สัมผัสกับ 6-20 nm AgNP ที่เคลือบด้วยแป้ง แล้วจึงย้อมด้วย calcium indicator ก็พบการแกว่งตัว (fluctuation) ของระดับความเข้มข้นของ  $\text{Ca}^{2+}$  ในไซโตพลาสซึมในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงที่ติดตาม ส่วน U251 human glioblastoma cells นั้นเมื่อถูกกระทำเช่นเดียวกันกับ IMR-90 ก็เกิดการแกว่งตัวของระดับความเข้มข้นของ  $\text{Ca}^{2+}$  ในรูปร่างที่ต่างกัน และในเวลาที่ยืดยาวออกไปเป็น 48 ชั่วโมง (AshaRani et al, 2009a)

การแกว่งของระดับความเข้มข้นของ  $\text{Ca}^{2+}$  ภายในเซลล์ ถือว่าเป็นการทำลายความสมดุลของแคลเซียมในเซลล์ (disruption of calcium homeostasis) ซึ่งจะส่งผลไปยังระบบสำคัญของสองส่วนของเซลล์ คือ ระบบการสร้างพลังงานใน mitochondria และระบบการควบคุมรูปร่างและการเคลื่อนที่ของเซลล์ ที่ขึ้นอยู่กับ cytoskeleton (AshaRani et al, 2009a)

### 7.2.3. การเคลื่อนที่ตอบสนองต่อสัญญาณเคมีจากเซลล์อื่น

การวัด chemotaxis ใน hMSC เข้าหา supernatant ของ stimulated leukocytes ใน transwell assay แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของ AgNP ที่ยับยั้ง chemotaxis ได้ มีระดับใกล้เคียงกับความเข้มข้นของ AgNP ที่เป็นพิษต่อเซลล์ ส่วนในกรณี  $\text{Ag}^+$  นั้น ความเข้มข้นที่ยับยั้ง chemotaxis ได้ มีระดับต่ำกว่าความเข้มข้นของ AgNP ที่เป็นพิษต่อเซลล์ (Greulich et al, 2009)

การทดลองให้ human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells สัมผัสกับ < 50 nm AgNP (Sigma) พบว่า migration ยังคงเกิดขึ้นได้ตามปกติ ณ ความเข้มข้นของ AgNP ที่ต่ำกว่าความเข้มข้นที่เป็นพิษ, 10 ug/ml (Hanckenberg, 2011)



## เอกสารอ้างอิง

- AshaRani, P.V., M.P. Hande, and S. Valiyaveetil. 2009. "Anti-proliferative activity of silver nanoparticles." *BMC Cell Biology* **10**:65-79.
- Jansky, L., P. Reymanova, and J. Kopecky. 2003. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by *Borrelia*. *Physiol. Res.* **52**:593-598.
- Greulich, C., S. Kittler, M. Epple, G. Muhr, and M. Köller. 2009. Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs). *Langenbecks Arch. Surg.* **394**:495–502
- Habijan,T., O. Bremm, S. Esenwein, G. Muhr, and M. Köller. 2007. Influence of nickel ions on human multipotent mesenchymal stem cells. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **38**
- Hackenberg, S., A. Scherzed, M. Kessler, S. Hummel, A. Technau, K. Froelich, C. Ginzkey, C. Koehler, R. Hagen, and N. Kleinsasser. 2011. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters* **201**:27-33.
- Shin, S., M. Ye, H. Kim, and H. Kang. 2007. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology* **7**:1813-1818.

## 8. ความเสียหายของโครโมโซม ซิวโมเลกุล และวัฏจักรของเซลล์

ในระดับย่อยที่สุด AgNP อาจจะทำให้เกิดความเสียหายต่อชีวโมเลกุลชนิดต่าง ๆ เช่น โปรตีน ลิพิด และกรดนิวคลีอิก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง DNA และโครโมโซม ซึ่งในกรณีหลังนี้จะเป็นความเสียหายอย่างร้ายแรงต่อเซลล์ เนื่องจาก DNA มีหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรม และเป็นแม่แบบของการสร้างโปรตีน เพื่อใช้ในการทำงาน ตลอดจนดำรงความเป็นเอกลักษณ์ของเซลล์ ธรรมชาติจึงมีระบบที่จะยับยั้งไม่ให้เซลล์ที่มีความผิดปกติของ DNA และโครโมโซม แบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น ทำให้เซลล์ที่ DNA เสียหายมาก เกิดความผิดปกติในวัฏจักรตามไปด้วย นอกเหนือจากการถูกกำจัดไปโดยกระบวนการ apoptosis ดังกล่าวแล้วในบทก่อน ๆ

### 8.1. หลักการทดสอบ

#### 8.1.1. ความเสียหายของดีเอ็นเอและโครโมโซม (chromosomal damage)

Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay (CBMN) เป็นเทคนิคที่ใช้วัดการแตกตัว (breakage) ของโครโมโซม ด้วยการนับจำนวนเซลล์ที่มี spontaneous micronucleus ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าอีก daughter nucleus หนึ่งหลังจากการแบ่งตัว โดย cytokinesis ถูกยับยั้งไว้ด้วย cytochalasin ความถี่ของ spontaneous micronucleus ขึ้นอยู่กับ (1) mutation ของ kinetochore proteins, centromeres หรือ spindle apparatus ที่ส่งผลให้โครโมโซมแบ่งตัวไม่เท่ากัน หรือโครโมโซมหายไปในช่วงตอน anaphase ของการแบ่งนิวเคลียส ซึ่งในกรณีหลังนี้พบได้ประมาณครึ่งหนึ่งของการเกิด micronucleus ทั้งหมด (2) DNA strand breaks ที่ไม่ได้ถูกซ่อมแซม ไม่ว่าจะเป็นผลมาจากภายในเซลล์เองหรือจากสารพิษภายนอกเซลล์ ทำให้ได้โครโมโซมที่แบ่งตัวแล้วมีขนาดไม่เท่ากัน ซึ่งในกรณีหลังนี้พบได้อีกครึ่งหนึ่งของการเกิด micronucleus ทั้งหมด (Fenech, 1993)

Alkaline Single-Cell Electrophoresis ที่มักเรียกกันว่า Comet Assay เป็นเทคนิคที่ใช้วัดการขาดของสาย DNA ที่อยู่ในโครโมโซม ด้วยการหล่อเซลล์ที่ศึกษาเข้าไปใน agarose จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายต่างของ detergent ซึ่งเป็นด่าง แล้วนำไปทำ electrophoresis

สนามไฟฟ้าจะดูดให้ DNA ที่ขาดเป็นชิ้นเล็กๆ เคลื่อนที่ออกมาจากเซลล์ เมื่อย้อมสีแล้ว จะเห็นเป็นหางยาวชี้ไปทางขั้วบวก (Collins, 2004) ถ้าหางยิ่งยาวและใหญ่ แปลว่ายิ่งมีความเสียหายต่อ DNA ในโครโมโซมมาก

การบอกผลของ Comet Assay ในเชิงปริมาณ ทำได้โดยบอกเป็น Olive tail moment (OTM) หรือเรียกสั้นๆ ว่า tail moment ซึ่งหมายถึง ผลคูณของร้อยละของ DNA ในหางของ comet กับระยะห่างระหว่าง (intensity centroid) ของหัวกับหาง (Vilhar, 2004)

อีกวิธีหนึ่งที่วัด DNA fragmentation คือ การวิเคราะห์ cytoplasmic histone-associated DNA fragmentation โดยใช้ชุดตรวจสอบจากบริษัท Roach Diagnostics

นอกจากการวัด DNA breakage แล้ว อีกสิ่งหนึ่งที่สามารถวัดได้ คือ DNA mutation

การวัด DNA mutation ทำได้โดย mouse lymphoma thymidine kinase (tk+/-) gene mutation assay (MLA) ที่นิยมใช้กันก็คือ L5178YTK+/- mouse lymphoma-TK assay ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่ผ่าเหล่า (TK-) จึงไม่สามารถ express thymidine kinase ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยน thymidine monophosphate (TMP) analog เช่น trifluorothymidine (TFT) ที่ผสมไว้ใน assay ให้เป็นสารพิษออกมาฆ่าเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงเติบโตได้ตามปกติ แต่หากเซลล์ได้สัมผัสกับสารเคมีที่เป็น mutagen จะทำให้เกิด point mutation ที่ TK locus ได้ TK ปกติกลับคืนมา เมื่อเปลี่ยนเป็น selective medium ที่ผสม TFT ไว้ เซลล์จะตาย สภาวะที่เหมาะสมในการทดลองนี้ สามารถยืนยันได้ด้วย positive controls เช่น methylmethanesulfonate (MMS) and cyclophosphamide (CP)

เนื่องจากสารเคมีหลายชนิด โดยตัวของมันเองอาจไม่ได้เป็น mutagen แต่ถ้าถูกเอนไซม์ในตับเปลี่ยนให้เป็น metabolite บางชนิดอาจเป็น mutagen ได้ ดังนั้น ในการทำ MLA จึงมักจะมีตัวอย่างส่วนหนึ่ง ซึ่งนำไปผสมกับ crude extract ของเอนไซม์จากตับหนูที่ถูก induce ไว้ ก่อนให้ผลิตเอนไซม์ออกมามากๆ เรียก crude extract นี้ว่า S9

colonies ของเซลล์ที่นับได้ มีทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็กปนกัน colonies ขนาดใหญ่แสดงถึงเซลล์ที่ไม่ตาย เนื่องจากสารที่สังสัยหรือ metabolites ของมันไม่มีฤทธิ์เป็น mutagen ส่วน colonies ขนาดเล็กแสดงถึงเซลล์ที่มี DNA/chromosome damage มาก จนถึงแม้จะไม่ express TK และรอดอยู่ได้ แต่ก็ป่วยมาก สัดส่วนของ large/small colonies เป็นเครื่องชี้ mode of action ของสารที่ต้องสงสัย ว่าเป็น mutagen เป็นหลัก หรือ ทำให้เกิด chromosome damage เป็นหลัก

### 8.1.2. การเปลี่ยนแปลงของวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle)

การติดตามการเปลี่ยนแปลงของวัฏจักรของเซลล์ ทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่สะดวก คือทำทั้ง population ด้วยการใช้ flow cytometry

การติดตาม DNA ใน cell population ทำได้โดยการย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide แล้ววัดด้วย flow cytometry (Asharani et al, 2009b) เนื่องจากการวัดใน flow cytometry เกิดขึ้นทีละเซลล์ การประมวลผลจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์จึงทำให้ทราบถึงปริมาณ DNA ในแต่ละเซลล์ ซึ่งจะบอกตำแหน่งของแต่ละเซลล์ใน cell cycle และคิดออกมาเป็นร้อยละได้

สมมุติฐานเบื้องต้นหลังการหา cell cycle profile ก็คือ DNA และ chromosome damage จะกระตุ้นกลไกตามธรรมชาติที่จะยับยั้งการแบ่งเซลล์ ดังนั้นเซลล์ที่ถูกทำลาย DNA จึงควรจะถูกหยุด (arrest) ไว้ที่บางตำแหน่งใน cell cycle โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ที่ G2/M

### 8.1.3. ความเสียหายของชีวโมเลกุลชนิดอื่น

นอกเหนือจากความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นต่อดีเอ็นเอและโครโมโซมแล้ว ชีวโมเลกุลอื่นที่อาจเกิดความเสียหายจาก AgNP ได้แก่ ลิพิดและโปรตีน

lipid peroxidation วัดได้โดยการวิเคราะห์หา 8-isoprostane (marker ของ lipid ที่ถูกออกซิไดซ์) ด้วยชุดตรวจ ELISA (Manzer et al, 2006; Beauchamp et al, 2002 อ้างถึงใน Piao et al, 2011)

เราอาจคาดคะเนระดับโดยประมาณของ lipid peroxidation ได้โดยย้อมเซลล์ด้วย diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) ซึ่งตามปกติไม่วาวแสง แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับ peroxide แล้วจะให้ diphenyl-1-pyrenylphosphine oxide (DPPP-O) ซึ่งวาวแสง (excitation/emission = 351 nm / 380 nm)

นอกจาก lipid จะถูกออกซิไดซ์จาก oxidative stress แล้ว โปรตีนก็ถูกออกซิไดซ์ได้เช่นกัน เกิดเป็น carbonyl proteins ซึ่งสามารถวัดได้ด้วยวิธี ELISA (เช่นใช้ชุดตรวจจากบริษัท Cell Biolabs)

โปรตีนที่มีระดับการ expression ลดลง สามารถศึกษาได้ด้วยเทคนิคทาง molecular biology เช่น ใช้เทคนิค RT-PCR กับ mRNA ของ filamin ศึกษาการ downregulation โปรตีน

filamin (เพื่อเชื่อมโยงเข้ากับการเปลี่ยนแปลงทาง cytoskeleton และ cellular motility) เป็นต้น (AshaRani, 2009a)

## 8.2. รายงานผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 8.2.1. ความเสียหายของดีเอ็นเอและโครโมโซม (DNA and chromosome damages)

จากการทำ TUNEL assay ใน THP-1 cells (human acute monocytic leukemia cell line) พบว่า 0-7.5 ug/ml 69 nm AgNP ที่เคลือบ PVP สามารถทำให้เกิด DNA breakage ซึ่งมีค่ามากขึ้นตาม dose และตามเวลา (Foldbjerg et al, 2009)

จากการทดลองให้เซลล์ IMR-90 normal human lung fibroblasts กับ U251 human glioblastoma cells สัมผัสกับ 6-20 nm AgNP ที่เคลือบด้วยแป้ง พบ chromosome aberration มากขึ้นตามความเข้มข้นของ AgNP และพบการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมใน U251 เซลล์มากกว่าใน IMR-90 เซลล์ (AshaRani et al, 2009a) และเมื่อวัด chromosomal breakage โดย cytokinesis-blocked micronucleus assay (CBMN) และโดย Comet Assay แล้ว ก็พบว่ามี ความเสียหายเกิดขึ้นมาก ในรายงานฉบับนี้ พบความเสียหายของ DNA มาก (tail moment เพิ่ม 2 เท่าของกลุ่มควบคุมที่ > 100 ug/ml AgNP ในกรณี U251 และ tail moment เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ก่อนข้างจะเป็นปฏิกิริยากับความเข้มข้นของ AgNP โดย tail เพิ่มขึ้นประมาณ 6 เท่าของกลุ่มควบคุมที่ 400 ug/ml AgNP (AshaRani et al, 2009b) ความสามารถทำให้เกิด chromosome damage ได้รับการยืนยันในเซลล์ L5178Y cells and BEAS-2B (Kim et al, 2010)

ความสามารถเป็น mutagen ของ AgNP ที่ประเมินจาก mouse lymphoma thymidine kinase (tk+/-) gene mutation assay (MLA) IC<sub>20</sub> ของ AgNP ในเซลล์ L5178Y เท่ากับ 3,769.53 µg/mL และ 1,796.88 µg/mL เมื่อเติมและไม่เติม S-9 (crude extract จากตับหนู) ตามลำดับ ส่วนในเซลล์ BEAS-2B ค่า IC<sub>20</sub> เท่ากับ 1,171.88 µg/mL และ 761.72 µg/mL เมื่อเติมและไม่เติม S-9 ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า AgNP เป็นพิษมากกว่าเมื่อไม่เติม S9 และมากกว่าในเซลล์ BEAS-2B เมื่อเทียบกับในเซลล์ L5178Y แต่เนื่องจากค่าที่ได้ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ จึงสรุปว่าความเป็นพิษหลักของ AgNP ไม่ได้มาจากการเป็น mutagen (Kim et al, 2010)

การทดลองให้ human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells สัมผัสกับ 0.1 ug/ml ของ < 50 nm AgNP (Sigma) แล้ววัด พบว่ามีการทำลาย DNA ที่ 1, 3, และ 24 ชั่วโมง (Hanckenberg, 2011)

### 8.2.2. การเปลี่ยนแปลงของวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle)

U251 human glioblastoma cells ที่สัมผัสกับ 6-20 nm AgNP ที่เคลือบด้วยแป้ง แสดง G2/M arrest เพิ่มขึ้นประมาณเท่าตัวของกลุ่มควบคุม ในขณะที่ IMR-90 human lung fibroblasts ที่สัมผัสกับ AgNP ชนิดเดียวกัน แสดง G2/M arrest เพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่าของกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับสมมุติฐานว่า DNA damage จากการสัมผัสกับ AgNP จะทำให้เซลล์ที่พิการ ถูกยับยั้งไว้ใน G2/M มากขึ้น (Asharani et al, 2009b)

### 8.2.3. ความเสียหายของชีวโมเลกุลอื่น

10-15 nm AgNP ยับยั้งการเพิ่มของ F-actin เมื่อ platelets ถูก induce ด้วย thrombin โดยต้องสงสัยว่าจะรบกวน barbed-end polymerization ของ actin นอกจากนั้น AgNP ยังทำให้เกิดความปั่นป่วนใน platelet membrane โดยดูจาก binding ของ ANS (Shrivastava et al, 2009)

## เอกสารอ้างอิง

- AshaRani, P.V., M.P. Hande, and S. Valiyaveetil. 2009. "Anti-proliferative activity of silver nanoparticles." *BMC Cell Biology* **10**:65-79.
- Asharani, P. V., G. Low Kah Mun, et al. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* **3**(2): 279-290.
- Beauchamp, M.C., E. Letendre, and G. Renier. 2002. Macrophage lipoprotein lipase expression is increased in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* **43**, 215–222.
- Foldbjerg, R., P. Olesen, M. Hougaard, D.A. Dang, H.J. Hoffman and H. Autrup. 2009. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology Letters*. **190**:156-162.
- Fenech, M. 1993. The cytokinesis-blocked micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives Supplements*. **101**(Supplement 3):101-107.
- Hackenberg, S., A. Scherzed, M. Kessler, S. Hummel, A. Technau, K. Froelich, C. Ginzkey, C. Koehler, R. Hagen, and N. Kleinsasser. 2011. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters* **201**:27-33.
- Kim, Y., S.I. Yang, and J. Ryu. 2010. Cytotoxicity and genotoxicity of nano-silver in mammalian cell lines. *Mol. Cell Toxicol.* **6**:119-125.
- Manzer, R., J. Wang, K. Nishina, G. McConville, and R.J. Mason. 2006. Alveolar epithelial cells secrete chemokines in response to IL-1beta and lipopolysaccharide but not to ozone. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **34**, 158–166.
- Piao, M.J., K.A. Kang, I.K. Lee, H.S. Kim, S. Kim, J.Y. Choi, J. Choi, and J.W.Hyun. 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells though inhibition

of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letter*. **201**:92-100.

Promega. 2011. Protocols & Applications Guide. 3. Apoptosis <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/apoptosis/>,  
4. Cell Viability <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability/>

Shrivastava, S., T. Bera, S.K. Singh, G. Singh, P. Ramachandrarao, and D. Dash. Characterization of antiplatelet properties of silver nanoparticles. *ACSNANO* **3**(6): 1357-1364.

Vilhar, B. 2004. Help! There is a comet in my computer! A dummy's guide to image analysis used in the comet assay. <http://botanika.biologija.org/exp/comet/Comet-principles.pdf>



## 9. สรุปความเป็นพิษของอนุภาคโลหะเงิน นาโนต่อเซลล์ของมนุษย์

จากองค์ความรู้ในแง่มุมต่าง ๆ เกี่ยวกับความเป็นพิษของ AgNP ซึ่งได้สกัดออกมาจากรายงานผลการวิจัยในเซลล์ของมนุษย์ที่ได้คัดเลือกไว้ และได้นำเสนอไปแล้วในบทที่ 3-8 ในบทนี้จะเป็นการสรุปและเชื่อมโยงองค์ความรู้เหล่านี้เข้าด้วยกัน เท่าที่สามารถทำได้ แม้ว่าจะมีการวิจัยเพียงเรื่องเดียวหรือเพียงสองสามเรื่องในประเด็นหนึ่ง ๆ ที่ทำในเซลล์ของมนุษย์

### 9.1. ความเป็นพิษของ AgNP มาจากการปลดปล่อย $Ag^+$ ลงไปในสารละลายหรือไม่

เรื่องนี้ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ในวงวิชาการ เนื่องจากมีผลการศึกษานับสนุนทั้งสองทางเลือก (Ahamed et al, 2010)

กลุ่มที่มองความเป็นพิษของ AgNP ว่ามาจากการปลดปล่อย  $Ag^+$  มีแบบจำลองว่า AgNP เป็น vehicle ที่พา  $Ag^+$  เข้ามาปลดปล่อยช้า ๆ ในเซลล์ และมองว่าความเป็นพิษของ AgNP มาจากผลรวมของความเป็นพิษจาก AgNP และจาก  $Ag^+$  (Kawata et al, 2009)

ส่วนกลุ่มที่มองว่าความเป็นพิษไม่เกี่ยวข้องกัน มองว่าทั้งคู่มีลักษณะทางพิษวิทยาที่แตกต่างกัน และมีระดับที่จะทำให้เกิดพิษแตกต่างกัน โดยที่  $Ag^+$  มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการอักเสบ (inflammation) มากกว่าจะทำให้เกิด oxidative stress แต่ AgNP มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิด oxidative stress, chromosome damage ไปจนถึงทำลาย membranes, mitochondria และกระตุ้นให้เกิด apoptosis (AshaRani et al, 2009a, AshaRani et al 2009b, Kim et al, 2010)

### 9.2. กลไกความเป็นพิษของ AgNP กับ lipid peroxidation

lipid peroxidation ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ oxidative damage น่าจะเป็นผลมาจาก oxidative stress ในขณะเดียวกัน lipid peroxidation ก็น่าเป็นขั้นตอนที่เชื่อมต่อไปถึง DNA damage และ apoptosis ซึ่งรวมกันส่งผลเป็น cytotoxicity

### 9.3. กลไกความเป็นพิษของ AgNP กับไมโทคอนเดรีย

ไมโทคอนเดรียเป็นเป้าหมายการโจมตีที่สำคัญของ AgNP เนื่องจากบทบาทของมันใน apoptosis โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อ mitochondrial membrane อาจลดความแข็งแรงลงเพราะเกิด lipid peroxidation

นอกจากนี้ ดังกล่าวไว้ในบทก่อนๆ ว่า AgNP ไปกระตุ้น jun-N terminal kinase (JNK) pathway ซึ่งจะลด membrane potential ของไมโทคอนเดรีย พร้อมเริ่มกระบวนการ caspase activation เพื่อทำลายเซลล์อย่างเป็นระบบ (apoptosis) ซึ่งเป็นกลไกตามธรรมชาติ สำหรับกำจัดเซลล์ที่มีการทำงานผิดปกติ (Hsin et al, 2000; Piao et al, 2000)

### 9.4. กลไกความเป็นพิษของ AgNP กับความเครียดออกซิเดชัน

ความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นสภาวะความเครียดในระดับเซลล์ เมื่อระบบปกติของเซลล์ ไม่สามารถกำจัดสารพวก reactive oxygen species (ROS) ได้หมด ในกรณีนี้ น่าจะเป็นผลมาจากการที่ AgNP ไปเปลี่ยนแปลง activity ของ antioxidant enzymes และ GSH ทำให้ระดับของ ROS เพิ่มขึ้น ความเสียหายซึ่ง ROS ก่อขึ้นในเซลล์ จะส่งผลกระทบไปถึง metabolism ของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผ่านทาง JNK activation pathway ไปลด membrane potential ที่ไมโทคอนเดรีย เริ่มกระบวนการ caspase activation และ apoptosis ดังกล่าวแล้วข้างต้น

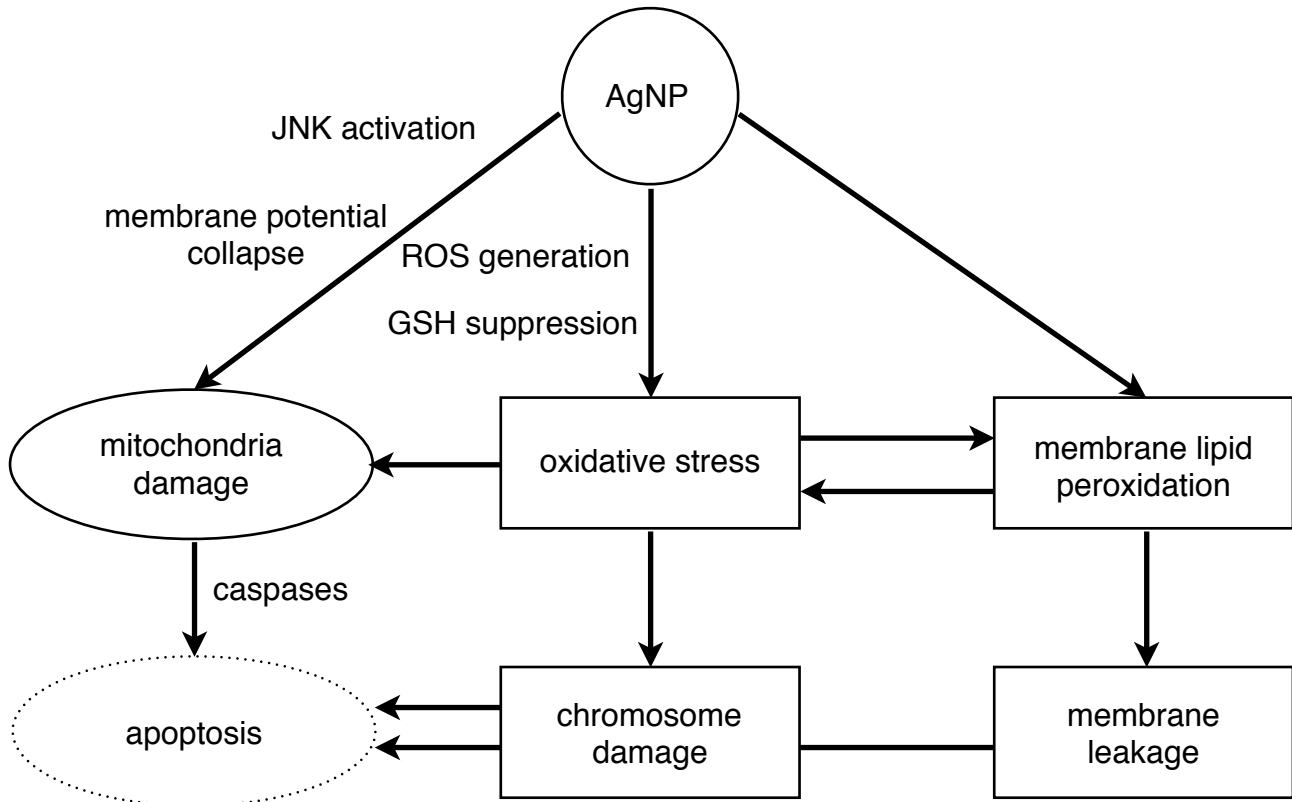
### 9.5. กลไกความเป็นพิษของ AgNP กับดีเอ็นเอและโครโมโซม

ความเสียหายต่อ DNA และต่อโครโมโซม น่าจะเป็นผลมาจาก ROS activity ที่เพิ่มขึ้น และระดับความเข้มข้นของ ATP ที่ลดลง (Asharani et al, 2009b)

ความเสียหายของโครโมโซม จะส่งผลต่อไปถึง cell cycle arrest อันเป็นกลไกตามธรรมชาติ ที่ยับยั้งเซลล์ที่ผิดปกติ ไม่ให้สามารถแบ่งตัวได้

## 9.6. ความเชื่อมโยงของกลไกความเป็นพิษของ AgNP

จากข้อมูลที่รวบรวมได้ เราสามารถสรุปความเชื่อมโยงระหว่างกลไกความเป็นพิษของ AgNP เป็นแผนภูมิ หรือแผนผังได้ดังนี้ (ดัดแปลงจาก Ahamed et al, 2010)



รูปที่ 9.1: แผนที่ย่อยความรู้ เชื่อมโยงกลไกความเป็นพิษของ AgNP

## 9.7. ระดับมาตรฐานความปลอดภัยของ AgNP ในมนุษย์

เท่าที่ผ่านมา เนื่องจากความขาดแคลนของข้อมูล มีผู้ที่พยายามนำข้อมูลจากการทดลองในสัตว์ทดลอง (หนู) มาทำการคำนวณตามระบบของสหภาพยุโรป (REACH Guidance) แต่ต้องถือว่าการคำนวณต่างๆ เป็นการทดลองเล่นกับตัวเลข ไม่สามารถนำมาใช้ในทางกฎหมายได้ (Christensen et al, 2010)

จากการศึกษาในครั้งนี้ ยืนยันได้ว่า ในปัจจุบันข้อมูลจากการศึกษาความเป็นพิษของ AgNP ในเซลล์ของมนุษย์ มีไม่ครบถ้วนพอที่จะกำหนดระดับมาตรฐานความปลอดภัยของ AgNP ในมนุษย์ได้ ไม่ว่าจะเป็นค่ามาตรฐานค่าใด และข้อมูลการศึกษาในสัตว์ทดลอง ก็ยังไม่มากพอที่จะยืนยันให้สามารถทำการกำหนดค่ามาตรฐาน ที่ใช้สำหรับงานพิษวิทยา หรืองานอาชีวอนามัยได้

อย่างไรก็ตาม ผู้ทำการศึกษานี้มีความเห็นจากประสบการณ์ว่า เนื่องจากยังมีงานวิจัยทั้งในญี่ปุ่นและในสหภาพยุโรปอีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่ได้มีการเผยแพร่ผลงาน รวมทั้งงานวิจัยที่ทำในโครงการระดับโลกขององค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (OECD) ทำให้ผู้ทำการศึกษานี้เชื่อว่า ภายใน พ.ศ. 2558 คือ 3 ปีหลังจากจบโครงการนี้ น่าจะมีร่างมาตรฐาน เข้าพิจารณากันในเวทีของสหภาพยุโรป ในองค์การระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรฐาน (ISO) และใน OECD ด้วย

## 9.8. ข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย

เพื่อให้การประเมินด้านความปลอดภัยนาโนเป็นไปได้อย่างต่อเนื่อง และให้บรรลุผลที่จะนำมาใช้ได้จริงในสังคมไทย ไม่ว่าจะเป็นในเชิงองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ หรือในเชิงการสาธารณสุข ซึ่งในที่สุดก็จะโยงไปถึงการควบคุม (regulation) ซึ่งมีผลต่อภาคธุรกิจ ผู้ดำเนินการศึกษาวิจัย จึงมีข้อเสนอแนะต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

### 1. ให้มีการศึกษาต่อเนื่อง

ถือว่าการศึกษานี้ เป็นการศึกษาเบื้องต้น (pilot study) ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไป อันเป็นการติดตามผลการวิจัยใหม่ๆ ทั่วโลก ไม่ว่าจะเป็นโดยทุนของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติเอง หรือโดยทุนของหน่วยงานอื่น เพื่อให้ไทยสามารถมีข้อสรุปของเราเอง เกี่ยวกับความปลอดภัยของวัสดุนาโนแต่ละชนิดได้

## 2. ขยายขอบเขตของการศึกษา

การศึกษาครั้งต่อๆ ไป นอกจากจะเป็นการรวบรวมข้อมูลให้สมบูรณ์ขึ้น (เช่น เพิ่มผลการทดสอบขององค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (OECD) ซึ่งมีกำหนดการตีพิมพ์ในช่วง ค.ศ. 2012-2013) แล้ว ยังสามารถขยายขอบเขตการศึกษาได้ในหลายมิติ เช่น ขยายไปถึงการทดลองในสัตว์และพืช หรือขยายไปยังอนุภาคโลหะนาโน และโลหะนาโน หรือขยายจากความเป็นพิษในเซลล์ เป็นความเป็นพิษเมื่อหายใจเข้าไป ความเป็นพิษเมื่อสัมผัสทางผิวหนัง ฯลฯ หรือขยายจากการศึกษาเอกสารรายงานการวิจัยเกี่ยวกับความเป็นพิษ ไปยังการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคนาโนเมื่อหลุดออกจากแหล่งกำเนิดไปแล้ว (fate) เพื่อจะได้ภาพชัดขึ้นว่า ความเป็นพิษของมันจะเปลี่ยนไปอย่างไรบ้าง เมื่อตกไปอยู่ในสภาพแวดล้อมหนึ่งๆ

## 3. ทดลองคำนวณค่ามาตรฐานเพื่อสร้างองค์ความรู้และประเมินผลกระทบ

เมื่อขยายขอบเขตการรวบรวมข้อมูลไปถึงสัตว์ทดลองแล้ว ก็ควรจะสนับสนุนให้ทดลองคำนวณค่ามาตรฐานของวัสดุนาโนต่างๆ ชนิดกัน<sup>4</sup> ขึ้นตามวิธีการของหน่วยงานในต่างประเทศ (ถึงแม้จะยังนำไปใช้จริงไม่ได้ เนื่องจากความไม่สมบูรณ์ของข้อมูล ฯลฯ) เพื่อให้มีการวิจารณ์กันว่า ในทางวิชาการจะยอมรับวิธีการคำนวณได้หรือไม่ และหากยอมรับ น่าจะเกิดผลกระทบอย่างไรต่อการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และอุตสาหกรรมนาโนในประเทศไทย หรือถ้าองค์การระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรฐาน (ISO) จะรับตัวเลขดังกล่าว (ที่ต่างประเทศคำนวณด้วยวิธีเดียวกัน) ไปพัฒนาเป็นมาตรฐานสากล ไทยควรจะปรับตัวอย่างไร จึงจะเดือดร้อนน้อยที่สุด

## 4. เพิ่มการสร้างองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์และพิษวิทยา

แทนที่จะใช้วิธีรวบรวมข้อมูลจากเอกสารผลการวิจัยที่มีผู้ศึกษาไว้แล้วในประเทศอื่น หน่วยงานสาธารณะที่เกี่ยวข้อง ควรจัดสรรงบประมาณ สำหรับการวิจัยภายนอกหรือภายในหน่วยงานเอง ที่จะเพิ่มองค์ความรู้ ไม่ว่าจะเป็นด้าน toxicology หรือด้าน fate สำหรับวัสดุนาโนที่มีการใช้งาน

<sup>4</sup> ค่ามาตรฐานที่พบในเอกสารข้อมูลความปลอดภัยสารเคมีมีตัวอย่างดังนี้ **Occupational Exposure Limit (OEL)** เป็นค่ามาตรฐานการสัมผัสสารเคมีชนิดหนึ่งๆ จากการทำงาน ที่เชื่อว่าจะไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพในผู้ปฏิบัติงานส่วนใหญ่, **Permissible Exposure Limit (PEL)** เป็นค่ามาตรฐานบังคับ (ค่าระดับการสัมผัสที่อนุญาตให้มีได้) ซึ่งกำหนดโดย Occupational Safety and Health Administration (OSHA) ของประเทศสหรัฐอเมริกา, **Recommended Exposure Limit (REL)** เป็นค่ามาตรฐานแนะนำ ที่กำหนดโดย National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) ของประเทศสหรัฐอเมริกา, และ **Threshold Limit Value (TLV)** เป็นค่ามาตรฐานแนะนำ ที่กำหนดโดย American Conference of the Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) ของประเทศสหรัฐอเมริกา อย่างไรก็ตาม วัสดุนาโนแทบทุกชนิดยังไม่ได้รับการกำหนดค่ามาตรฐานแบบใดแบบหนึ่งไว้อย่างเป็นทางการ แต่ NIOSH ก็ได้ให้ความสำคัญเกี่ยวกับความปลอดภัยนาโน และได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่องนี้อย่างจริงจังในเวลาลหลายปีที่ผ่านมา โดยขณะนี้อยู่ระหว่างเตรียมการประกาศใช้ค่ามาตรฐานแนะนำ (REL) สำหรับท่อคาร์บอนนาโน (carbon nanotubes) นอกจากนั้น ในสหภาพยุโรปก็มีค่ามาตรฐานต่างๆ ที่กำหนดโดยกฎหมาย REACH โดยกฎหมายได้ให้วิธีคำนวณเพื่อกำหนดค่ามาตรฐานเอาไว้ด้วย เป็นต้น

มากในประเทศไทย ซึ่งได้แก่ อนุภาคโลหะเงินนาโน (AgNP) อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์นาโน อนุภาคสังกะสีออกไซด์นาโน คาร์บอนแบล็ค และในอนาคตก็จะมีวัสดุนาโนอื่นเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ เช่น อนุภาคโลหะทองนาโน (ในยารักษาโรค ชุดตรวจโรค อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ ฯลฯ) เป็นต้น ซึ่งนอกจากจะเป็นการสร้างองค์ความรู้ที่เหมาะสมต่อประเทศแล้ว ยังจะเป็นการพัฒนาบุคลากร ทั้งระดับอาจารย์ และระดับบัณฑิต ให้มีขีดความสามารถด้านความปลอดภัยนาโน ในเชิงลึกอีกด้วย

## เอกสารอ้างอิง

- Ahamed, M., M.S. AlSalhi, and M.K.J. Siddiqui. 2010. Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta*. **411**:1841-1848.
- AshaRani, P.V., M.P. Hande, and S. Valiyaveetil. 2009. "Anti-proliferative activity of silver nanoparticles." *BMC Cell Biology* **10**:65-79.
- Asharani, P. V., G. Low Kah Mun, et al. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* **3**(2): 279-290.
- Christensen, F.M., H.J. Johnston, V. Stone, R.J. Aitken, S. Hankin, S. Peter, and K. Aschberger. 2010. Nano-silver - feasibility and challenges for human health risk assessment based on open literature. *Nanotoxicology*. **4**(3):284-295.
- Hsin, Y., C. Chen, S. Huang, T. Shih, P. Lai, and P.J. Chueh. 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK- dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters*. **179**:130-139.
- Kawata, K., M. Osawa, and S. Okabe (2009). "In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells." *Environmental Science & Technology* **43**(15): 6046-6051.
- Kim, Y., S.I. Yang, and J. Ryu. 2010. Cytotoxicity and genotoxicity of nano-silver in mammalian cell lines. *Mol. Cell Toxicol.* **6**:119-125.
- Piao, M.J., K.A. Kang, I.K. Lee, H.S. Kim, S. Kim, J.Y. Choi, J. Choi, and J.W.Hyun. 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letter*. **201**:92-100.

# ภาคผนวกที่ 1: ผลจากการคัดกรองเอกสารชั้นที่ 3

## (ทูลรายการเป็นเอกสารฉบับเต็ม)

- Ahamed, M., Alsalhi, M.S. & Siddiqui, M.K.J., 2010. Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 411(23-24), pp. 1841-1848.
- Ahamed, M. et al., 2008. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 233(3), pp.404-410.
- Ahamed, M., Posgai, R., et al., 2010. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(3), pp.263-269.
- Allen, H.J. et al., 2010. Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 29(12), pp.2742-2750.
- Amin, R.M. et al., 2009. Rapid and sensitive microplate assay for screening the effect of silver and gold nanoparticles on bacteria. *Nanomedicine (London, England)*, 4(6), pp.637-643.
- Anon, 2008. Abstracts of ICONTX 2008, Lucknow, India, February 5-7 2008. *Nanotoxicology*, 2(s1), p.S2-S88.
- Anon, 2009. BfR recommends that nano-silver is not used in foods and everyday products. Available at: [http://www.bfr.bund.de/cm/216/bfr\\_raet\\_von\\_nanosilber\\_in\\_lebensmitteln\\_und\\_produkten\\_d\\_es\\_taeeglichen\\_bedarfs\\_ab.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/216/bfr_raet_von_nanosilber_in_lebensmitteln_und_produkten_d_es_taeeglichen_bedarfs_ab.pdf).
- Arora, S. et al., 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters*, 179(2), pp.93-100.
- Arora, S. et al., 2009. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236(3), pp.310-318.
- Asharani, P.V., Hande, M Prakash & Valiyaveetil, S., 2009. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology*, 10, p.65.
- AshaRani, P.V. et al., 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 3(2), pp.279-290.
- Asharani, P.V. et al., 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 19(25), p.255102.
- Asharani, P.V. et al., 2011. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology*, 5, pp.43-54.
- Asz, J. et al., 2006. Treatment of toxic epidermal necrolysis in a pediatric patient with a nanocrystalline silver dressing. *Journal of Pediatric Surgery*, 41(12), pp.e9-12.
- Banerjee, M. et al., 2010. Heightened reactive oxygen species generation in the antimicrobial activity of a three component iodinated chitosan-silver nanoparticle composite. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 26(8), pp.5901-5908.
- Bar-Ilan, O. et al., 2009. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 5(16), pp.1897-1910.
- Baram-Pinto, D. et al., 2009. Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate. *Bioconjugate Chemistry*, 20(8), pp. 1497-1502.
- Barrena, R. et al., 2009. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, 75(7), pp.850-857.
- Benn, T.M. & Westerhoff, P., 2008. Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. *Environmental Science & Technology*, 42(11), pp.4133-4139.
- Bilberg, K. et al., 2010. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 96(2), pp. 159-165.
- Blaser, S.A. et al., 2008. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *The Science of the Total Environment*, 390(2-3), pp.396-409.
- Boucher, W. et al., 2008. Intravesical nanocrystalline silver decreases experimental bladder inflammation. *The Journal of Urology*, 179(4), pp.1598-1602.
- Bouwmeester, H. et al., 2011. Characterization of Translocation of Silver Nanoparticles and Effects on Whole-Genome Gene Expression Using an In Vitro Intestinal Epithelium Co-Culture Model. *ACS Nano*, p.110411135720084.
- Braydich-Stolle, Laura K et al., 2010. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 116(2), pp.577-589.
- Braydich-Stolle, L. et al., 2005. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 88(2), pp.412-419.
- Busolo, M.A. et al., 2010. Novel silver-based nanoclay as an antimicrobial in polylactic acid food packaging coatings. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 27(11), pp.1617-1626.
- Carja, G. et al., 2009. Nanosized silver-anionic clay matrix as nanostructured ensembles with antimicrobial activity. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(6), pp.534-539.
- Carlson, C. et al., 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 112(43), pp. 13608-13619.



- Castillo, P.M. et al., 2008. Tiopronin monolayer-protected silver nanoparticles modulate IL-6 secretion mediated by Toll-like receptor ligands. *Nanomedicine (London, England)*, 3(5), pp. 627-635.
- Castle, A.B. et al., 2011. Hydroxyl-Functionalized and N-Doped Multiwalled Carbon Nanotubes Decorated with Silver Nanoparticles Preserve Cellular Function. *ACS Nano*, 5(4), pp. 2458-2466.
- Chae, Y.J. et al., 2009. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 94(4), pp.320-327.
- Chai, J.S., 2008. Modeling the Toxic Effects of Silver Nanoparticles under Varying Environmental Conditions. *Journal of the U.S. Stockholm Junior Water Prize*, pp.1-15.
- Chen, X. & Schluesener, H.J., 2008. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*, 176(1), pp.1-12.
- Choi, J.E. et al., 2010. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 100(2), pp. 151-159.
- Choi, O. et al., 2009. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Research*, 43(7), pp.1879-1886.
- Christensen, F.M. et al., 2010. Nano-silver - feasibility and challenges for human health risk assessment based on open literature. *Nanotoxicology*, 4(3), pp.284-295.
- Chun, J.Y. et al., 2010. Epidermal cellular response to poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 78(2), pp.334-342.
- Chwalibog, A. et al., 2010. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. *International Journal of Nanomedicine*, 5, pp.1085-1094.
- Cumberland, S.A. & Lead, J.R., 2009. Particle size distributions of silver nanoparticles at environmentally relevant conditions. *Journal of Chromatography. A*, 1216(52), pp.9099-9105.
- Dalli, R.L. et al., 2007. Toxic epidermal necrolysis/Stevens-Johnson syndrome: current trends in management. *ANZ Journal of Surgery*, 77(8), pp.671-676.
- Demir, E. et al., 2010. Genotoxic analysis of silver nanoparticles in *Drosophila*. *Nanotoxicology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21039182> [Accessed May 1, 2011].
- Deng, F. et al., 2010. Silver nanoparticles up-regulate Connexin43 expression and increase gap junctional intercellular communication in human lung adenocarcinoma cell line A549. *Nanotoxicology*, 4, pp.186-195.
- Dong, Q., Su, H. & Zhang, D., 2005. In situ depositing silver nanoclusters on silk fibroin fibers supports by a novel biotemplate redox technique at room temperature. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 109(37), pp.17429-17434.
- El Badawy, A.M. et al., 2010. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environmental Science & Technology*, 44(4), pp.1260-1266.
- El Badawy, A.M. et al., 2011. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 45(1), pp.283-287.
- El-Temsah, Y.S. & Joner, Erik J., 2010. Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. *Environmental Toxicology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20549639> [Accessed May 1, 2011].
- Ema, M. et al., 2010. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 30(3), pp.343-352.
- Eom, H.-J. & Choi, J., 2010. p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environmental Science & Technology*, 44(21), pp.8337-8342.
- Fabrega, J. et al., 2011. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International*, 37(2), pp.517-531.
- Fabrega, J., Renshaw, J.C. & Lead, J.R., 2009. Interactions of silver nanoparticles with *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Science & Technology*, 43(23), pp.9004-9009.
- Farkas, J., Christian, P., et al., 2011. Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 101(1), pp.117-125.
- Farkas, J. et al., 2010. Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 96(1), pp.44-52.
- Farkas, J., Peter, H., et al., 2011. Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine. *Environment International*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21470683> [Accessed May 1, 2011].
- Fernández, A., Picouet, P. & Lloret, E., 2010. Reduction of the spoilage-related microflora in absorbent pads by silver nanotechnology during modified atmosphere packaging of beef meat. *Journal of Food Protection*, 73(12), pp.2263-2269.
- Foldbjerg, R., Dang, D.A. & Autrup, H., 2010. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of Toxicology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428844> [Accessed May 1, 2011].
- Foldbjerg, R. et al., 2009. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology Letters*, 190(2), pp. 156-162.
- Foss Hansen, S. et al., 2007. Categorization framework to aid hazard identification of nanomaterials. *Nanotoxicology*, 1(3), pp.243-250.
- Funfak, A. et al., 2011. Synergistic effects of metal nanoparticles and a phenolic uncoupler using microdroplet-based two-dimensional approach. *Journal of Environmental Monitoring: JEM*, 13(2), pp.410-415.

- Gan, X. et al., 2004. Effect of silver nanoparticles on the electron transfer reactivity and the catalytic activity of myoglobin. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 5(12), pp.1686-1691.
- Garza-Ocañas, L. et al., 2010. In vitro toxicity assessment of silver nanoparticles in Chang liver cells and J-774 macrophages. *Toxicology Letters*, 196, p.S284-S284.
- Geranio, L., Heuberger, M. & Nowack, B., 2009. The behavior of silver nanotextiles during washing. *Environmental Science & Technology*, 43(21), pp.8113-8118.
- Gomes-Filho, J.E. et al., 2010. Tissue reaction to silver nanoparticles dispersion as an alternative irrigating solution. *Journal of Endodontics*, 36(10), pp.1698-1702.
- Gopinath, P. et al., 2010. Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. *Colloids and Surfaces. B. Biointerfaces*, 77(2), pp.240-245.
- Goping, I.S. et al., 1998. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 143(1), pp.207-215.
- Gorth, D.J., Rand, D.M. & Webster, T.J., 2011. Silver nanoparticle toxicity in *Drosophila*: size does matter. *International Journal of Nanomedicine*, 6, pp.343-350.
- Gou, N., Onnis-Hayden, A. & Gu, A.Z., 2010. Mechanistic toxicity assessment of nanomaterials by whole-cell-array stress genes expression analysis. *Environmental Science & Technology*, 44(15), pp.5964-5970.
- Gravante, G. et al., 2009. Nanocrystalline silver: a systematic review of randomized trials conducted on burned patients and an evidence-based assessment of potential advantages over older silver formulations. *Annals of Plastic Surgery*, 63(2), pp.201-205.
- Griffitt, R.J. et al., 2009. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 107(2), pp.404-415.
- Griffitt, R.J. et al., 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 27(9), pp.1972-1978.
- Gubbins, E.J., Batty, L.C. & Lead, J.R., 2011. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 159(6), pp.1551-1559.
- Hackenberg, S. et al., 2011. Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters*, 201(1), pp. 27-33.
- Hagju, B.A. et al., 2009. Biocompatibility and effects of a composite nanomaterial containing silver. *Therapeutics, Pharmacology & Clinical Toxicology*, 13(3), pp.266 - 269.
- Heckmann, L.-H. et al., 2011. Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology (London, England)*, 20(1), pp.226-233.
- Hegde, S. et al., 2006. Possible binding sites for biotin stabilized water soluble Ag nanoparticles: an experimental and theoretical study. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(8), pp.2547-2553.
- Hinther, A. et al., 2010. Nanometals induce stress and alter thyroid hormone action in amphibia at or below North American water quality guidelines. *Environmental Science & Technology*, 44(21), pp.8314-8321.
- Hsin, Y. et al., 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters*, 179(3), pp.130-139.
- Hussain, S M et al., 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 19(7), pp. 975-983.
- Hyun, J. et al., 2008. Effects of repeated silver nanoparticles exposure on the histological structure and mucins of nasal respiratory mucosa in rats. *Toxicology Letters*, 182(1-3), pp. 24-28.
- Ivask, A. et al., 2010. Profiling of the reactive oxygen species-related ecotoxicity of CuO, ZnO, TiO<sub>2</sub>, silver and fullerene nanoparticles using a set of recombinant luminescent *Escherichia coli* strains: differentiating the impact of particles and solubilised metals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), pp.701-716.
- Jeong, G.N. et al., 2009. Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Archives of Toxicology*, 84(1), pp.63-69.
- Ji, J.H., Jung, J.H., Kim, S.S., et al., 2007. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation Toxicology*, 19(10), pp.857-871.
- Ji, J.H., Jung, J.H., Yu, I.J., et al., 2007. Long-term stability characteristics of metal nanoparticle generator using small ceramic heater for inhalation toxicity studies. *Inhalation Toxicology*, 19(9), pp.745-751.
- Jun, E.-A. et al., 2011. Silver nanoparticles enhance thrombus formation through increased platelet aggregation and procoagulant activity. *Nanotoxicology*, 0(0), pp.158-168.
- Kaegi, R. et al., 2010. Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environmental Pollution*, 158(9), pp.2900-2905.
- Kalishwaralal, K. et al., 2010. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids and Surfaces. B. Biointerfaces*, 77(2), pp.257-262.
- Kawata, K., Osawa, M. & Okabe, S., 2009. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental Science & Technology*, 43(15), pp.6046-6051.
- Kennedy, A.J. et al., 2010. Fractionating nanosilver: importance for determining toxicity to aquatic test organisms. *Environmental Science & Technology*, 44(24), pp.9571-9577.
- Kim, B. et al., 2010. Discovery and characterization of silver sulfide nanoparticles in final sewage sludge products. *Environmental Science & Technology*, 44(19), pp.7509-7514.

- Kim, Jeonghwan & Van der Bruggen, B., 2010. The use of nanoparticles in polymeric and ceramic membrane structures: review of manufacturing procedures and performance improvement for water treatment. *Environmental Pollution* (Barking, Essex: 1987), 158(7), pp.2335-2349.
- Kim, Jiwon, Kim, Sooyeon & Lee, Sungkyu, 2010. Differentiation of the toxicities of silver nanoparticles and silver ions to the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and the cladoceran *Daphnia magna*. *Nanotoxicology*, 0(0), pp.1-8.
- Kim, Soohee, Choi, J.E., et al., 2009. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 23(6), pp.1076-1084.
- Kim, W.-Y., Kim, Jin, et al., 2009. Histological Study of Gender Differences in Accumulation of Silver Nanoparticles in Kidneys of Fischer 344 Rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72(21), pp.1279-1284.
- Kim, Yong Soon et al., 2008. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation Toxicology*, 20(6), pp.575-583.
- Kim, Yong Soon, Song, M.Y., et al., 2010. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 7, p.20.
- Kim, Y.-J., Yang, S.I. & Ryu, J.-C., 2010. Cytotoxicity and genotoxicity of nano-silver in mammalian cell lines. *Molecular & Cellular Toxicology*, 6(2), pp.119-125.
- Kiser, M.A. et al., 2010. Biosorption of nanoparticles to heterotrophic wastewater biomass. *Water Research*, 44(14), pp.4105-4114.
- Kokura, S. et al., 2010. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(4), pp.570-574.
- Kulthong, K. et al., 2010. Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat. *Particle and Fibre Toxicology*, 7, p.8.
- Kumari, M., Mukherjee, A. & Chandrasekaran, N., 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *The Science of the Total Environment*, 407(19), pp.5243-5246.
- Laban, G. et al., 2010. The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology* (London, England), 19(1), pp.185-195.
- Lamb, J.G. et al., 2010. Nanosilver particle effects on drug metabolism in vitro. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 38(12), pp.2246-2251.
- Lankveld, D.P.K. et al., 2010. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials*, 31(32), pp.8350-8361.
- Lonane, S. et al., 2009. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(1), p.14.
- Laped, E. et al., 2010. Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Nanomedicine* (London, England), 5(6), pp. 975-984.
- Lara, H.H. et al., 2010. PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. *Journal of Nanobiotechnology*, 8, p.15.
- Larese, F. et al., 2009. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology*, 255(1-2), pp.33-37.
- Li, P.-W., Kuo, T.-H., et al., 2010. Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles. *Toxicology Letters*, 197(2), pp.82-87.
- Li, T., Albee, B., et al., 2010. Comparative toxicity study of Ag, Au, and Ag-Au bimetallic nanoparticles on *Daphnia magna*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), pp.689-700.
- Liu, Jingyu & Hurt, R.H., 2010. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental Science & Technology*, 44(6), pp.2169-2175.
- Liu, R., Sun, F., et al., 2009. Evaluation on the toxicity of nanoAg to bovine serum albumin. *The Science of the Total Environment*, 407(13), pp.4184-4188.
- Liu, W. et al., 2010. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology*, 4(3), pp.319-330.
- Liu, Z., Ren, Guogang, et al., 2009. Action potential changes associated with the inhibitory effects on voltage-gated sodium current of hippocampal CA1 neurons by silver nanoparticles. *Toxicology*, 264(3), pp.179-184.
- Locht, L.J. et al., 2009. Cultured macrophages cause dissolutocytosis of metallic silver. *Histology and Histopathology*, 24(2), pp.167-173.
- Lu, S., Gao, W. & Gu, H.Y., 2008. Construction, application and biosafety of silver nanocrystalline chitosan wound dressing. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, 34(5), pp.623-628.
- Lu, S. et al., 2010. Concentration effect of gold nanoparticles on proliferation of keratinocytes. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 81(2), pp.406-411.
- Maass, G.J., 2008. Silver Nanoparticles: No Threat to the Environment.
- MacCuspie, R.I., Allen, A.J. & Hackley, V.A., 2010. Dispersion stabilization of silver nanoparticles in synthetic lung fluid studied under in situ conditions. *Nanotoxicology*, 0(0), pp.1-17.
- Matveeva, N.B. et al., 2006. [Chemotaxis as a method for testing of the biological effects of silver nanoparticles]. *Biofizika*, 51(5), pp.859-865.
- Meyer, J.N. et al., 2010. Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Aquatic Toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 100(2), pp. 140-150.
- Miao, A.-J. et al., 2010. Intracellular uptake: a possible mechanism for silver engineered nanoparticle toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica*. *PloS One*, 5(12), p.e15196.
- Miao, A.-J. et al., 2009. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environmental Pollution* (Barking, Essex: 1987), 157(11), pp.3034-3041.
- Miller, A. et al., 2010. Characterizing exposures to airborne metals and nanoparticle emissions in a refinery. *The Annals of Occupational Hygiene*, 54(5), pp.504-513.

- Miura, N. & Shinohara, Y., 2009. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(3), pp. 733-737.
- Mueller, N.C. & Nowack, Bernd, 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology*, 42(12), pp.4447-4453.
- Mukherjee, B. & Weaver, J.W., 2010. Aggregation and charge behavior of metallic and nonmetallic nanoparticles in the presence of competing similarly-charged inorganic ions. *Environmental Science & Technology*, 44(9), pp.3332-3338.
- Musante, C. & White, J.C., 2010. Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: Differential effects of nano and bulk-size particles. *Environmental Toxicology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21117135> [Accessed May 1, 2011].
- Musee, N., 2010. Simulated environmental risk estimation of engineered nanomaterials: A case of cosmetics in Johannesburg City. *Human & Experimental Toxicology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148195> [Accessed May 1, 2011].
- Naddy, R. et al., 2007. Chronic toxicity of silver nitrate to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*, and potential mitigating factors. *Aquatic Toxicology*, 84(1), pp.1-10.
- Nadworny, P.L. et al., 2010. Does nanocrystalline silver have a transferable effect? *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 18(2), pp.254-265.
- Nair, P.M.G. et al., 2011. Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotrophin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 101(1), pp.31-37.
- Nair, P.M.G. & Choi, J., 2011. Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure. *Aquatic Toxicology*, 101(3-4), pp.550-560.
- Nallathambi, P.D. & Xu, X.-H.N., 2010. Study of cytotoxic and therapeutic effects of stable and purified silver nanoparticles on tumor cells. *Nanoscale*, 2(6), pp.942-952.
- Navarro, E. et al., 2008. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*, 42(23), pp.8959-8964.
- Niazi, J.H. et al., 2011. Global Gene Response in *Saccharomyces cerevisiae* Exposed to Silver Nanoparticles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21409410> [Accessed May 1, 2011].
- Nishanth, R.P. et al., 2011. Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: Role of ROS-NF $\kappa$ B signaling pathway. *Nanotoxicology*, pp.1-15.
- O'Brien, N. & Cummins, E., 2010. Ranking initial environmental and human health risk resulting from environmentally relevant nanomaterials. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 45(8), pp.992-1007.
- Oberdörster, G., Stone, V. & Donaldson, K., 2007. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, 1(1), pp.2-25.
- Oughton, D.H. et al., 2008. Neutron activation of engineered nanoparticles as a tool for tracing their environmental fate and uptake in organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 27(9), pp.1883-1887.
- Panda, K.K. et al., 2011. In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21419840> [Accessed May 1, 2011].
- Park, E.-J., Bae, E., et al., 2010. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30(2), pp.162-168.
- Park, E.-J., Choi, K. & Park, K., 2011. Induction of inflammatory responses and gene expression by intratracheal instillation of silver nanoparticles in mice. *Archives of Pharmacological Research*, 34(2), pp.299-307.
- Park, E.-J., Yi, J., et al., 2010. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 24(3), pp.872-878.
- Park, S. et al., 2007. Cellular Toxicity of Various Inhalable Metal Nanoparticles on Human Alveolar Epithelial Cells. *Inhalation Toxicology*, 19(s1), pp.59-65.
- Park, S.-H. et al., 2005. Effects of silver nanoparticles on the fluidity of bilayer in phospholipid liposome. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 44(2-3), pp.117-122.
- Piao, M.J. et al., 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters*, 201(1), pp.92-100.
- Posgai, R. et al., 2009. Inhalation method for delivery of nanoparticles to the *Drosophila* respiratory system for toxicity testing. *The Science of the Total Environment*, 408(2), pp. 439-443.
- Powers, C.M., Badireddy, A.R., et al., 2011. Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition. *Environmental Health Perspectives*, 119(1), pp.37-44.
- Powers, C.M., Levin, E.D., et al., 2011. Silver exposure in developing zebrafish produces persistent synaptic and behavioral changes. *Neurotoxicology and Teratology*, 33(2), pp. 329-332.

- Pozdniak, L.V. et al., 2009. Proliferation and survival of rat C6 glioma culture in the presence of implants coated with modified carbon-based films. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 148(2), pp.253-256.
- Quadros, M.E. & Marr, L.C., 2010. Environmental and human health risks of aerosolized silver nanoparticles. *Journal of the Air & Waste Management Association* (1995), 60(7), pp. 770-781.
- Rahman, M.F. et al., 2009. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles☆. *Toxicology Letters*, 187(1), pp.15-21.
- Rengasamy, S., Eimer, B.C. & Shaffer, R.E., 2009. Comparison of nanoparticle filtration performance of NIOSH-approved and CE-marked particulate filtering facepiece respirators. *The Annals of Occupational Hygiene*, 53(2), pp.117-128.
- Rengasamy, S. et al., 2008. Filtration performance of NIOSH-approved N95 and P100 filtering facepiece respirators against 4 to 30 nanometer-size nanoparticles. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 5(9), pp.556-564.
- Ringwood, A.H. et al., 2010. The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. *Marine Environmental Research*, 69 Suppl, pp.S49-51.
- Roh, J.-Y. et al., 2009. Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics. *Environmental Science & Technology*, 43(10), pp.3933-3940.
- Rosas-Hernández, H. et al., 2009. Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicology Letters*, 191(2-3), pp.305-313.
- Samberg, M.E., Oldenburg, S.J. & Monteiro-Riviere, N.A., 2010. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro. *Environmental Health Perspectives*, 118(3), pp.407-413.
- Santoro, C.M., Duchsherer, N.L. & Grainger, D.W., 2007. Minimal In Vitro Antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles. *Nanobiotechnology: The Journal at the Intersection of Nanotechnology, Molecular Biology, and Biomedical Sciences*, 3(2), pp.55-65.
- Sathish Kumar, P.S., Manivel, A. & Anandan, S., 2009. Synthesis of Ag-ZnO nanoparticles for enhanced photocatalytic degradation of acid red 88 in aqueous environment. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 59(7), pp.1423-1430.
- Scheckel, K.G. et al., 2010. Synchrotron speciation of silver and zinc oxide nanoparticles aged in a kaolin suspension. *Environmental Science & Technology*, 44(4), pp.1307-1312.
- Selvakumar, R. et al., 2011. As(V) removal using carbonized yeast cells containing silver nanoparticles. *Water Research*, 45(2), pp.583-592.
- Senjen, R., 2007. Nanosilver – a threat to soil, water and human health?, *Friends of the Earth*.
- Shang, L. et al., 2010. Heteronanostructure of Ag particle on titanate nanowire membrane with enhanced photocatalytic properties and bactericidal activities. *Journal of Hazardous Materials*, 178(1-3), pp.1109-1114.
- Sharma, H.S., Hussain, S., et al., 2010. Influence of nanoparticles on blood-brain barrier permeability and brain edema formation in rats (no PDF). *Acta Neurochirurgica. Supplement*, 106, pp.359-364.
- Sharma, H.S., Patnaik, R. & Sharma, A., 2010. Diabetes aggravates nanoparticles induced breakdown of the blood-brain barrier permeability, brain edema formation, alterations in cerebral blood flow and neuronal injury. An experimental study using physiological and morphological investigations in the rat. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(12), pp.7931-7945.
- Shavandi, Z., Ghazanfari, T. & Moghaddam, kiumarz N., 2011. In vitro toxicity of silver nanoparticles on murine peritoneal macrophages. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33(1), pp.135-140.
- Shin, S.-H. et al., 2007. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*, 7(13), pp. 1813-1818.
- Shoultz-Wilson, W A et al., 2011. Evidence for avoidance of Ag nanoparticles by earthworms (*Eisenia fetida*). *Ecotoxicology* (London, England), 20(2), pp.385-396.
- Shoultz-Wilson, William A. et al., 2010. Effect of silver nanoparticle surface coating on bioaccumulation and reproductive toxicity in earthworms ( *Eisenia fetida* ). *Nanotoxicology*, pp.1-13.
- Shrivastava, S. et al., 2009. Characterization of antiplatelet properties of silver nanoparticles. *ACS Nano*, 3(6), pp.1357-1364.
- Sibbald, R.G. et al., 2007. Bacteriology, inflammation, and healing: a study of nanocrystalline silver dressings in chronic venous leg ulcers. *Advances in Skin & Wound Care*, 20(10), pp.549-558.
- Skebo, J. et al., 2007. Assessment of Metal Nanoparticle Agglomeration, Uptake, and Interaction Using High-Illuminating System. *International Journal of Toxicology*, 26(2), pp. 135-141.
- Skirtach, A.G. et al., 2006. Laser-induced release of encapsulated materials inside living cells. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 45(28), pp.4612-4617.
- Song, C.W. et al., 2010. Silver nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis by a mechanism involving PKCα down-regulation in human lung carcinoma cells. *Toxicology Letters*, 196, p.S279-S279.
- Sopova, E.A. et al., 2010. [Effects of silver and silicon dioxide nanopowders on the development of herpesvirus infection in vitro]. *Gigiena I Sanitariia*, (4), pp.89-91.

- Speshock, J.L. et al., 2010. Interaction of silver nanoparticles with Tacaribe virus. *Journal of Nanobiotechnology*, 8, p.19.
- Sriwichai, P. et al., 2010. An investigation of the toxicity of silver nanoparticles to HL60 and Jurkat cells in vitro. *Toxicology*, 278(3), pp.363-363.
- Stampoulis, D., Sinha, S.K. & White, J.C., 2009. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science & Technology*, 43(24), pp.9473-9479.
- Stebounova, L.V. et al., 2011. Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model. *Particle and Fibre Toxicology*, 8(1), p.5.
- Stone, V. et al., 2010. Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *The Science of the Total Environment*, 408(7), pp.1745-1754.
- Sung, J.H. et al., 2009. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 108(2), pp.452-461.
- Sung, J.H. et al., 2008. Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhalation Toxicology*, 20(6), pp.567-574.
- Suzuki, H., Toyooka, T. & Ibuki, Y., 2007. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environmental Science & Technology*, 41(8), pp.3018-3024.
- Tang, J. & Xi, T., 2008. [Status of biological evaluation on silver nanoparticles]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi = Journal of Biomedical Engineering = Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi*, 25(4), pp.958-961.
- Tappin, A.D. et al., 2010. Dissolved silver in European estuarine and coastal waters. *Water Research*, 44(14), pp.4204-4216.
- Teow, Y. et al., 2011. Health impact and safety of engineered nanomaterials. *Chemical Communications (Cambridge, England)*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479319> [Accessed May 1, 2011].
- Tiwari, D.K., Jin, T. & Behari, J., 2011. Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 21(1), pp.13-24.
- Torres-Torres, C. et al., 2010. Ablation and optical third-order nonlinearities in Ag nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 5, pp.925-932.
- Vernikov, V.M., Gmoshinskiĭ I V & Khotimchenko, S.A., 2009. [Silver nanopacticles in industry, environment and food packaging material: probable risk characterization]. *Voprosy Pitaniia*, 78(6), pp.13-20.
- Vijayakumar, P.S. & Prasad, B.L.V., 2009. Intracellular biogenic silver nanoparticles for the generation of carbon supported antiviral and sustained bactericidal agents. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 25(19), pp.11741-11747.
- Wang, Hongyuan et al., 2008. Sonophotocatalytic degradation of methyl orange by nano-sized Ag/TiO<sub>2</sub> particles in aqueous solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(4), pp.386-392.
- Wang, Hui et al., 2010. Impact of silver(I) on the metabolism of *Shewanella oneidensis*. *Journal of Bacteriology*, 192(4), pp.1143-1150.
- Wiegand, C., Heinze, T. & Hipler, U.-C., 2009. Comparative in vitro study on cytotoxicity, antimicrobial activity, and binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds of alginate and silver-containing alginate. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 17(4), pp. 511-521.
- Wijnhoven, S.W.P. et al., 2009. Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3(2), pp.109-138.
- Wise, J.P., Sr et al., 2010. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 97(1), pp.34-41.
- Wong, K.K.Y. et al., 2009. Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles. *ChemMedChem*, 4(7), pp.1129-1135.
- Wu, Y. et al., 2010. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 100(2), pp.160-167.
- Yang, Z et al., 2010. A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 7 Suppl 4, pp.S411-422.
- Yin, L. et al., 2011. More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science & Technology*, 45(6), pp.2360-2367.
- Zhao, C.-M. & Wang, W.-X., 2011. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 30(4), pp.885-892.

## ภาคผนวกที่ 2: รายละเอียดการจัดกลุ่มเอกสารจากการคัดกรองรอบที่ 3

### Group 1000: Microbes

Diatoms [*Thalassiosira weissflogii*]

Bacteria [*Escherichia coli*, *E. coli* recombinants, *Salmonella* spp., *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Brevibacterium casei*]

Fungi [*Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium citrium*, *Aureobasidium pullulans*, Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)]

### Group 2000: Green Plants

Algae [green algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlamydomonas reinhardtii*), chrysophyte: freshwater golden algae (*Ochromonas danica*)]

Plants [cucumber & lettuce germination, common grass (*Lolium multiflorum*), ryegrass (*Lolium perenne* L.), two-rowed barley (*Hordeum vulgare* L.), flax (*Linum usitatissimum* L.), Duckweed (*Lemna minor* L.), Yellow squash or zucchini (*Cucurbita pepo*)]

Plant cells [Onion (*Allium cepa*) root tip cells]

### Group 3000: Invertebrates

Nematode [*Caenorhabditis elegans*]

Annelids [adult earthworm *Eisenia fetida*; *Oligochaeta*, *Lumbricidae*]

Mollusks [oyster embryo]

Arthropods: Crustaceans [*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*] Insects [Chironomus riparius] Fruit fly [*Drosophila melanogaster*]

### Group 4000: Fish and amphibians

Freshwater fish [fathead minnow (*Pimephales promelas*), zebrafish (*Danio rerio*), Eurasian perch (*Perca*), Japanese Medaka (*Oryzias latipes*)]

Seawater fish [rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells and hepatocytes]

Amphibians [premetamorphic *Rana catesbeii*]

### Group 5000: Mammals

**5100: General mammals:** Swine, Rodents [mouse, ICR mouse, mouse embryo, rats, Sprague-Dawley rats, Fischer 344 rats, Wistar rats, C57BL/6N mice, rat BBB]

**5200: Mammalian cells and tissues** [coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings, murine peritoneal macrophages], Primates [Vero African green monkey kidney epithelial cell line]

**5300: Rodent cell lines** [spermatogonia cell line, 3T3 mouse fibroblasts, mouse macrophage cell line, L5178Y: mouse lymphoma cell line, RAW 264.7 mouse leukemic monocyte macrophage cell line, J-774: cell line from a tumor in a female BALB/c mouse, A10: rat vascular smooth muscle, BRL 3A: immortalized rat liver cells, PC 12: cell line derived from a pheochromocytoma of the rat adrenal medulla that differentiates when treated with NGF, BHK-21: baby hamster kidney cell line,]

## **Group 6000: Human**

**6100: Human** [pulmonary exposure, dermal exposure, oral exposure, intraperitoneal injection]

**6200: Human normal cells and tissues** [human skin, human abdominal full thickness skin, human fibroblasts, human keratinocytes, human lung fibroblasts, liver cells and Chang liver cells, macrophage culture, NHEK: human epidermal keratinocytes culture, J-774: macrophage, human mesenchymal stem cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMC), human washed platelets, human ecto-cervical tissue]

**6300: Human transformed cell lines** [BEAS-2B: human bronchial epithelial cell line, HaCaT: human keratinocyte immortal cells, Jurkat: immortalized T lymphocyte cells cells, HCE-T human corneal epithelial cell line]

**6400: Human cancer cell lines** [fibrosarcoma, skin carcinoma, glioblastoma, A549: human lung adenocarcinoma cell line, HepG2: human hepatoma cells, HT29: human colon adenocarcinoma cell line, Caco-2: heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cells, THP-1: human monocytic cell line, SGC7901: gastric cancer cells, MCF-7: breast cancer cells, HeLa cells, HL60: Human promyelocytic leukemia cell line]



# ภาคผนวก 3 : ตารางการคัดกรองเอกสารชั้นที่ 4

การคัดกรองบทความเกี่ยวกับความปลอดภัยของนาโนซิลเวอร์ เฉพาะกลุ่ม human เรียงตามปีที่พิมพ์เผยแพร่

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----------|
| <b>Group 6000: Human</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | ..... | <b>32</b> |
| <b>6100 Human reviews</b> [pulmonary exposure, dermal exposure, oral exposure, intraperitoneal injection]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | ..... | <b>3</b>  |
| <b>6200 Human normal cells and tissues</b> [human skin, human abdominal full thickness skin, human fibroblasts, human keratinocytes, human lung fibroblasts, liver cells and Chang liver cells, macrophage culture, NHEK: human epidermal keratinocytes culture, J-774: macrophage, human mesenchymal stem cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMC), human washed platelets, human ecto-cervical tissue]                    | ..... | <b>14</b> |
| <b>6300 Human transformed cell lines</b> [BEAS-2B: human bronchial epithelial cell line, HaCaT: human keratinocyte immortal cells, Jurkat: immortalized T lymphocyte cells, HCE-T human corneal epithelial cell line]                                                                                                                                                                                                               | ..... | <b>4</b>  |
| <b>6400 Human cancer cell lines</b> [fibrosarcoma, skin carcinoma, glioblastoma, A549: human lung adenocarcinoma cell line, HepG2: human hepatoma cells, HT29: human colon adenocarcinoma cell line, Caco-2: heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cells, THP-1: human monocytic cell line, SGC7901: gastric cancer cells, MCF-7: breast cancer cells, HeLa cells, HL60: Human promyelocytic leukemia cell line] | ..... | <b>11</b> |

## Code of Reliability

| CoR      | Category of Reliability                                                                                   | Remarks |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>1</b> | <b>reliable without restriction</b>                                                                       |         |
| 1a       | good laboratory practice study                                                                            |         |
| 1b       | comparable to [other studies]                                                                             |         |
| 1c       | test procedure in accordance with national standard methods (AFNOR, DIN, etc.)                            |         |
| 1d       | test procedure in accordance with general accepted scientific standards and describe in sufficient detail |         |
| <b>2</b> | <b>reliable with restriction</b>                                                                          |         |
| 2a       | study without detailed documentation                                                                      |         |
| 2b       | study with acceptable version                                                                             |         |
| 2c       | comparable to [other studies] with acceptable restrictions                                                |         |
| 2d       | test procedure in accordance with national standard methods with acceptable restrictions                  |         |
| 2e       | study well document, meets generally accepted scientific principles, acceptable for assessment            |         |
| 2f       | acceptable calculation method                                                                             |         |
| 2g       | data from handbook or collection data                                                                     |         |
| <b>3</b> | <b>not reliable</b>                                                                                       |         |
| 3a       | documentation insufficient for assessment                                                                 |         |
| 3b       | significant methodological deficiencies                                                                   |         |
| 3c       | unsuitable test system                                                                                    |         |
| <b>4</b> | <b>not assignable</b>                                                                                     |         |
| 4a       | abstract                                                                                                  |         |
| 4b       | secondary literature                                                                                      |         |
| 4c       | original referenced not yet available                                                                     |         |
| 4d       | original referenced not yet translated                                                                    |         |
| 4e       | documentation insufficient for assessment                                                                 |         |

**References:** (เปลี่ยนคำว่า guideline study เป็นคำว่า study เพื่อให้สอดคล้องกับ context ของการศึกษา)

ECETOC. 2006 Synthetic Amorphous Silica. ECETOC JAOC No. 51. (ISSN 0773-6339-51) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. p. 3.  
Klimisch HJ, Andreae M, Tillmann U. 1997. A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. Regulatory Toxicology and Pharmacology 25:1-5.



| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Type                         | AgNP Size             | Surface Coating | Organism       | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                     | CoR | Remarks |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| <b>6101</b><br>Ahamed, M., M. S. Alsalmi, et al. (2010). "Silver nanoparticle applications and human health." Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry 411(23-24): 1841-1848 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20719239">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20719239</a> .<br>King Abdullah Institute for Nanotechnology, King Saud University, Riyadh-11451, Saudi Arabia<br>Council of Science and Technology-Uttar Pradesh, Lucknow-227017, India | <b>Review</b><br><b>2010</b> | AgNP, Ag <sup>+</sup> |                 | mammals, human |      |                       | Reviews many in vitro (in human) and in vivo (in mammalian animal model - rats and mice) studies and suggests possible mechanism | 1   |         |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Type                         | AgNP Size | Surface Coating | Organism | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                            | CoR | Remarks |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------|-----------------|----------|------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| <b>6102</b><br>Christensen, F. M., H. J. Johnston, et al. (2010). "Nano-silver - feasibility and challenges for human health risk assessment based on open literature." Nanotoxicology 4(3): 284-295<br>%L 0003 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20795910">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20795910</a> .<br>Nanobiosciences unit, Institute for Health and Consumer Protection (IHCP), Joint Research Centre (JRC), European Commission, Ispra, Italy<br>Biomedicine and Sport and Exercise Science Research Group, School of Life Sciences, Edinburgh Napier University, Edinburgh<br>Institute of Occupational Medicine (IOM) and SAFENANO, Riccarton, Edinburgh, UK | <b>Review</b><br><b>2010</b> | AgNP      |                 | human    |      |                       | route and challenges in obtaining the risk of AgNP from literature data | 1   |         |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Type                         | AgNP Size    | Surface Coating | Organism                                                                                                         | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings | CoR | Remarks |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|--------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------|--------------|-----|---------|
| <b>6103</b><br>Johnston, H. J., G. Hutchison, et al. (2010). "A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity." Critical Reviews in Toxicology 40(4): 328-346 %L 0023 %JU<br><a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20128631">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20128631</a> .<br>Centre for Nano Safety, School of Life Sciences, Edinburgh Napier University, Edinburgh, UK.<br>¹Department for Environment, Food and Rural Affairs, London, UK. ²Nanobiosciences unit, European Commission–DG Joint Research Centre (JRC).<br>Institute for Health and Consumer Protection (IHCP), Ispra, Italy, and ³Institute for Occupational Medicine, Research Avenue North, Edinburgh, UK | <b>Review</b><br><b>2010</b> | AgNP<br>AuNP |                 | pulmonary exposure<br>dermal exposure<br>intraperitoneal injection<br>oral exposure<br><br>human<br>rats<br>mice |      |                       | Review       | 1   |         |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Type                         | AgNP Size | Surface Coating | Organism                                                                                           | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                     | CoR | Remarks |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------|------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| <b>6104 (formerly 6203)</b><br>Chen, X. and H. J. Schluesener (2008). "Nanosilver: a nano-product in medical application." Toxicology Letters 176(1): 1-12<br>%L 0131 %U<br><a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18022772">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18022772</a> .<br>Institute of Brain Research, University of Tuebingen Calwer Str. 3, D-72076 Tuebingen, Germany | <b>Review</b><br><b>2008</b> | AgNP      |                 | human cells and tissues in different organ systems such as skin, GI tract, and respiratory system. |      |                       | impact of AgNP on tissues<br>Possible mechanisms of cytotoxicity | 1   |         |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6200 Human normal cells and tissues</b> [human skin, human abdominal full thickness skin, human fibroblasts, human keratinocytes, human lung fibroblasts, liver cells and Chang liver cells, macrophage culture, NHEK: human epidermal keratinocytes culture, human mesenchymal stem cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMC), human washed platelets, human ecto-cervical tissue] (13 ฉบับ) | งานวิจัยในกลุ่มนี้ เป็นงานที่ทำในเซลล์ปกติ (fibroblast, keratinocytes, lung fibroblast, liver cells) หรือเนื้อเยื่อปกติ (skin, ecto-cervical tissue) ของมนุษย์ ไม่ว่าจะได้มาโดยทันที (washed platelets) หรือนำมาเลี้ยงไว้ก่อน (macrophage, NHEK, keratinocytes, mesenchymal stem cells, PBMC) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Type                               | AgNP Size                                                                                                                             | Surface Coating                                                                                                                                                                                            | Organism                                                                                                                                                                                                                                                  | Dose                        | Exposure Method/ Time   | Key Findings                                                                                                                                                                                                                   | CoR       | Remarks                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6201</b><br><br>Shin, S.-H., M.-K. Ye, et al. (2007). "The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells." International Immunopharmacology 7(13): 1813-1818 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17966693">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17966693</a> .<br><br>Department of Otolaryngology, School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu, South Korea<br><br>Cluster Instruments Co., Ltd., Daegu, South Korea | <b>in vitro</b><br><br><b>2007</b> | 1-2.5 nm (average 1.5 nm) nano-silver<br>colloidal solution (MedisilTM, Cluster Ins. Daegu, Korea) of concentration of 5000 ppm stock | not clearly stated in Material & Methods<br><br>In Discussion "stabilized with polymer capsule such as the surfactant of cleanser"<br><br>no aggregation in water - seems to indicate some form of coating | human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) which also contains lymphocytes, dendritic cells, & monocytes.<br><br>use CellTier 96 aqueous cell proliferation assay kit (Promega, Madison, WI) and CellTracker Green CMFDA (Invitrogen, San Diego, CA) | 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30 ppm | 72 hr<br>at 30 C 5% CO2 | At levels of over 15 ppm, nano-silver was found to have a significant cytotoxic effect on PBMCs, and PHA-induced cytokine productions were significantly inhibited by nano-silver (IL-5: at 10 ppm, INF-γ and TNF-α at 3 ppm). | <b>2a</b> | Investigators were from NP mfg company and asthma researchers<br><br>NP was prepared by chemical reduction of silver ion with aid of physical method, reducing agent and stabilizers.<br><br>NP protocol is NOT reproducible. |



| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Type                           | AgNP Size                                              | Surface Coating                                      | Organism                                                              | Dose                                                                                                                                                      | Exposure Method/ Time                        | Key Findings                                                                                                                                                                                                                                     | CoR | Remarks |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| <b>6204</b><br>Asharani, P. V., M. P. Hande, et al. (2009). "Anti-proliferative activity of silver nanoparticles." BMC Cell Biology 10: 65 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19761582">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19761582</a> .<br>Department of Chemistry, Faculty of Science, 3 Science Drive 3, National University of Singapore, 117543, Singapore<br>Department of Physiology, Yong Loo Lin School of Medicine, 2 Medical Drive, National University of Singapore, 117597, Singapore | <b>In vitro</b><br><b>2009</b> | 6-20 nm AgNP<br><br>1 mM AgNO3 reduced by 30 mg NaBH4. | stabilized with 280 mg soluble potato starch at 70 C | IMR-90 normal human lung fibroblasts<br>U251 human glioblastoma cells | 100, 200, 400 ug/ml AgNP for uptake studies<br>400 ug/ml AgNP for SEM<br>25 ug/ml AgNP for TEM<br>25, 50, 100, 200, 400 ug/ml AgNP for intracellular Ca++ | 2 hr 37 C<br>2 hr 4 C to inhibit endocytosis | Enter by endocytosis<br>Uniform distribution in cytoplasm & nucleus<br>Chromosome instability, mitotic arrest<br>Recovery in normal cells: cancer stops proliferate<br>Toxicity mediated through intracellular Ca++ transients<br>Decrease flamm | 1   |         |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Type                           | AgNP Size                        | Surface Coating | Organism                                                       | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                                      | CoR | Remarks                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------|------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------|
| <b>6205</b><br>Asharani, P. V., G. Low Kah Mun, et al. (2009). "Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells." ACS Nano 3(2): 279-290 %* 277.496 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236062">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236062</a> .<br>Department of Chemistry, Faculty of Science, 3 Science Drive 3, National University of Singapore, Singapore 117543<br>Department of Physiology, Yong Loo Lin School of Medicine, 2 Medical Drive, National University of Singapore, Singapore 117597 | <b>In vitro</b><br><b>2009</b> | 6-20 nm<br>AgNP<br>starch capped |                 | IMR-90 human lung fibroblasts<br>U251 human glioblastoma cells |      |                       | AgNP in mitochondria & nucleus<br>Mitochondria damage, reduce ATP contents, increase ROS - dose dependent<br>Dose-dependent DNA damage, prominent in cancer cells<br>Mitotic arrest in G2/M with no massive apoptosis or necrosis |     | Suggest exploring potential benefits in cancer therapy. |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Type                               | AgNP Size                                   | Surface Coating | Organism                                                                         | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                   | CoR | Remarks                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6206</b><br><br>Greulich, C., S. Kittler, et al. (2009). "Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs)." * Langenbeck's Archives of Surgery 394(3): 495-502 %L 0016 %U <a href="http://www.springerlink.com/index/0010.1007/s00423-00009-00472-00421">http://www.springerlink.com/index/0010.1007/s00423-00009-00472-00421</a> . | <b>In vitro</b><br><br><b>2009</b> | 100 nm<br>AgNP<br>(polyol process with PVP) |                 | Human mesenchymal stem cells<br>3rd to 7th passage bought from commercial source |      |                       | AgNP exert cytotoxic effects on hMSCs at high concentrations but also induce cell activation (as analyzed by the release of IL-8) at high but nontoxic concentrations of AgNP. |     | measuring of agglomeration<br><br>PREP POLYOL PROCESS<br><br>Ethylene glycol (5 mL) was heated in an oil bath to 160°C. After 1 h, a solution of silver nitrate in ethylene glycol (3 mL) and a solution of polyvinylpyrrolidone (PVP) in ethylene glycol (3 mL) were added simultaneously under vigorous stirring with a peristaltic pump to the hot ethylene glycol. The solution was stirred at 160°C for 1 h and then allowed to cool freely to room temperature. The silver nanoparticles were purified by ultracentrifugation (Sorvall WX Ultra Series, Thermo Fisher, Schwerte, Germany, 30 min at 30,000 rpm), followed by redispersion in acetone and water. |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Type                               | AgNP Size                                                        | Surface Coating | Organism                                                                                                                      | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | CoR | Remarks |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| <b>6207</b><br><br>Laresse, F., F. Dagostin, et al. (2009). "Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin." Toxicology 255(1-2): 33-37 %U <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X08004666">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X08004666</a> .<br><br>UCO Medicina del Lavoro, Dipartimento di Scienze di Medicina Pubblica, Università di Trieste, Via della Pietà 19, 34129 Trieste, Italy<br><br>Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Trieste, Via Giorgieri 1, 34100 Trieste, Italy<br>SC Chirurgia Plastica, Università di Trieste, Ospedale di Cattinara, 34100 Trieste, Italy<br>Laboratorio di Tossicologia Industriale, CTO, Università di Torino, Via Zuretti 29, Torino, Italy | <b>In vitro</b><br><br><b>2009</b> | 25±7.1 nm<br>polyvinylpyrrolidone coated AgNP (self-synthesized) |                 | Human abdominal full thickness skin obtained as surgical waste using static diffusion cells following the Franz Method (1975) |      |                       | silver nanoparticles absorption through intact and damaged skin was very low but detectable<br><br>in case of damaged skin it was possible an increasing permeation of silver applied as nanoparticles.<br><br>silver nanoparticles could be detected in the stratum corneum and the outermost surface of the epidermis by electron microscopy. |     |         |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Type                               | AgNP Size                                         | Surface Coating | Organism                         | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | CoR | Remarks                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------|------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6208</b><br>Shrivastava, S., T. Bera, et al.<br>(2009). "Characterization of antiplatelet properties of silver nanoparticles." ACS Nano 3(6): 1357-1364 %* 1357.1496 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19545167">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19545167</a> .<br>Department of Biochemistry, Institute of Medical Sciences, Banaras Hindu University, Varanasi-221005, India<br>Department of Metallurgy, Institute of Technology, Banaras Hindu University, Varanasi-221005, India<br>Department of Anatomy, Institute of Medical Sciences, Banaras Hindu University, Varanasi-221005, India<br>International Advanced Research Centre for Powder Metallurgy and New Materials, Balapur, Hyderabad-500 005, India | <b>in vitro</b><br><br><b>2009</b> | 30-35, 40-45 nm<br>AgNP<br><br>10-15 nm spherical |                 | platelets from fresh human blood |      |                       | Nanosilver has an innate anti-platelet property and effectively prevents integrin-mediated platelet responses, both <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> , in a concentration-dependent manner.<br>Ultrastructural studies show that nanosilver accumulates within platelet granules and reduces interplatelet proximity. |     | 0.017 g AgNO <sub>3</sub> dissolved in 0.01M NaOH and 2% liquid ammonia to form a 0.01 M solution. D-glucose and hydrazine (each at 0.01 M concentration) were added to ensure its complete reduction at a final concentration of 0.005 M. pH was adjusted to 7.4 with citric acid.<br>AUNP was also synthesized.<br><br>AgNPs do not confer any lytic effect on platelets and thus hold potential to be promoted as antiplatelet/antithrombotic agents after careful evaluation of toxic effects. |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Type                                      | AgNP Size                                                                     | Surface Coating | Organism                                                                                                  | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                      | CoR | Remarks |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| <p><b>6209</b></p> <p>Chun, J. Y., H. K. Kang, et al. (2010). "Epidermal cellular response to poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles." Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces 78(2): 334-342 %L 0001 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399628">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399628</a>.</p> <p>Department of Advance Organic Materials and Textile System Engineering, and BK21 FTIT, Chungnam National University, Daejeon 305-764, South Korea</p> <p>Department of Oral Biochemistry and Program of Craniofacialofacial Reconstruction Science, Dental Research Institute, BK21 CLS, and IBEC, Seoul National University School of Dentistry, Seoul 110-749, South Korea</p> <p>Department of Prosthodontics, Seoul National University School of Dentistry, Seoul 110-749, South Korea</p> | <p><b>In vitro</b></p> <p><b>2010</b></p> | <p>AgNP on heat-treated PVA nanofibrous matrix (approx. 50 nm from photo)</p> |                 | <p>normal human epidermal keratinocytes (NHEK) culture</p> <p>normal human fibroblasts (NHEF) culture</p> |      |                       | <p>There was no significant difference in cytotoxicity to NHEK and NHEF between Ag ions and Ag nanoparticles.</p> |     |         |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Type                           | AgNP Size                             | Surface Coating | Organism                                                                                      | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                        | CoR | Remarks                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------------|
| <b>6210</b><br>Kim, Y.-J., S. I. Yang, et al. (2010). "Cytotoxicity and genotoxicity of nano-silver in mammalian cell lines." Molecular & Cellular Toxicology 6(2): 119-125 %U <a href="http://www.springerlink.com/index/110.1007/s13273-13010-10018-13271">http://www.springerlink.com/index/110.1007/s13273-13010-10018-13271</a> .<br>Department of Applied Chemistry, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea<br>Cellular and Molecular Toxicology Laboratory, Korea Institute of Science & Technology P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea | <b>In vitro</b><br><b>2010</b> | <100 nm commercial AgNP (Aldrich USA) |                 | mouse lymphoma cell line L5178Y<br>human bronchial epithelial BEAS-2B cells (for comet assay) |      |                       | AgNP can cause primary DNA damage and cytotoxicity but not mutagenicity in cultured mammalian cells |     | description of the comet assay |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Type                           | AgNP Size                                                                                                                                    | Surface Coating | Organism           | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | CoR | Remarks |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------|------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| <b>6211</b><br>Sarnberg, M. E., S. J. Oldenburg, et al. (2010). "Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro." Environmental Health Perspectives 118(3): 407-413<br>%L 0015 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20064793">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20064793</a> .<br>Center for Chemical Toxicology Research and Pharmacokinetics, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA<br>Joint Department of Biomedical Engineering, University of North Carolina, Chapel Hill, and North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA; 3nanoComposix, San Diego, California, USA | <b>in vitro</b><br><b>2010</b> | 8 materials [unwashed/uncoated (20, 50, and 80 nm particle diameter), washed/uncoated (20, 50, and 80 nm), and carbon-coated (25 and 35 nm)] |                 | skin keratinocytes |      |                       | The effect of the unwashed Ag-nps on HEK viability after a 24-hr exposure indicated a significant dose-dependent decrease ( $p < 0.05$ ) at 0.34 $\mu\text{g/mL}$ with aB and 96AQ and at 1.7 $\mu\text{g/mL}$ with MTT. For each of the unwashed Ag-nps, we noted a significant increase ( $p < 0.05$ ) in IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ concentrations.<br><br>However, both the washed Ag-nps and carbon-coated Ag-nps showed no significant decrease in viability at any concentration assessed by any of the three assays. |     |         |



| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Type                           | AgNP Size                          | Surface Coating | Organism                                            | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                          | CoR | Remarks                                                                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------|------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6212</b><br>Hackenberg, S., A. Scherzed, et al. (2011). "Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells." Toxicology Letters 201(1): 27-33 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145381">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145381</a> .<br>Department of Oto-Rhino-Laryngology, Plastic, Aesthetic and Reconstructive Head and Neck Surgery, University of Wuerzburg, Josef-Schneider-Str. 11, D-97080 Wuerzburg, Germany | <b>In vitro</b><br><b>2011</b> | < 50 nm<br>AgNP<br>(Sigma Aldrich) |                 | human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells |      |                       | cyto- and genotoxic potential of Ag-NPs in hMSCs at significantly higher concentrations as compared to antimicrobial effective levels |     | Directly alkylating methyl methan sulphonate (MMS) at 100 uM for 24 h served as a positive control of genotoxicity without cytotoxic effects. |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Type                          | AgNP Size                                                                                     | Surface Coating | Organism               | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                       | CoR | Remarks |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------|------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| <b>6213</b><br>Jun, E.-A., K.-M. Lim, et al. (2011). "Silver nanoparticles enhance thrombus formation through increased platelet aggregation and procoagulant activity." <i>Nanotoxicology</i> 00: 158-168 %L 0000 %U <a href="http://informahealthcare.com/doi/abs/0010.3109/17435390.17432010.17506250">http://informahealthcare.com/doi/abs/0010.3109/17435390.17432010.17506250</a> .<br>College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul<br>Amore-Pacific Co., R&D Center, Gyeonggi-do<br>College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Gyeonggi-do, Korea | <b>In vivo</b><br><b>2011</b> | < 100 nm<br>AgNP<br>(Aldrich 576832)<br>5,000-8,000 nm micro<br>Ag powder<br>(Aldrich 327093) |                 | human washed platelets |      |                       | induction of platelet aggregation and procoagulant activation evident by increased phosphatidylserine exposure and thrombin generation<br>increase intracellular Ca++<br>P-selection expression, serotonin release |     |         |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Type                           | AgNP Size | Surface Coating | Organism                                                                       | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | CoR | Remarks                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6214</b><br>Piao, M. J., K. A. Kang, et al. (2011). "Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis." <i>Toxicology Letters</i> 201(1): 92-100 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21182908">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21182908</a> .<br>Jeju National University, Republic of Korea<br>School of Medicine, Seoul National University, Republic of Korea<br>Department of Chemistry and Chemistry Institute for Functional Materials, Pusan National University, Republic of Korea<br>Department of Pharmacology, School of Medicine, Ewha Womans University, Republic of Korea<br>Faculty of Environmental Engineering, University of Seoul, Republic of Korea | <b>in vitro</b><br><b>2011</b> | AgNP      |                 | Human Chang liver cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) |      |                       | cell viability decreased due to apoptosis. AgNPs induced a mitochondria-dependent apoptotic pathway via modulation of Bax and Bcl-2 expressions, resulting in the disruption of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ). Loss of $\Delta\Psi_m$ was followed by cytochrome c release from the mitochondria, resulting in the activation of caspases 9 and 3. |     | AgNPs- induced cytotoxicity was higher compared than that observed when AgNO <sub>3</sub> was used as a silver ion source.<br>AgNPs induced reactive oxygen species (ROS) generation and suppression of reduced glutathione (GSH) in human Chang liver cells. ROS generated by AgNPs resulted in damage to various cellular components, DNA breaks, lipid membrane peroxidation, and protein carbonylation =siRNA targeting JNK.<br>[0.017 g AgNO <sub>3</sub> dissolved in 0.01M NaOH and 2% liquid ammonia to form a 0.01 M solution. D-glucose and hydrazine (each at 0.01 M concentration) were added to ensure its complete reduction at a final concentration of 0.005 M. pH was adjusted to 7.4 with citric acid. AuNP was also synthesized.] |

|                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6300 Human transformed cell lines</b> [BEAS-2B: human bronchial epithelial cell line, HaCaT: human keratinocyte immortal cells, Jurkat: immortalized T lymphocyte cells, HCE-T human corneal epithelial cell line] (4 ฉบับ)                               |
| การวิจัยในกลุ่มนี้ ทำในเซลล์มนุษย์ที่ได้ถูก transform แล้ว 4 ชนิด ได้แก่<br>BEAS-2B: human bronchial epithelial cell line<br>HaCaT: human keratinocyte immortal cells<br>Jurkat: immortalized T lymphocyte cells<br>HCE-T human corneal epithelial cell line |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Type                           | AgNP Size             | Surface Coating | Organism                          | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                              | CoR | Remarks |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------------------|------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| <b>6301</b><br>Fodbjerg, R., P. Olesen, et al. (2009). "PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes." <i>Toxicology Letters</i> 190(2): 156-162 %L 0023 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19607894">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19607894</a> .<br>Department of Environmental and Occupational Medicine, Institute of Public Health, Aarhus University, Bartholins Allé 2, Bygn. 1260, 8000 Aarhus, Denmark<br>Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO), Aarhus University, Aarhus, Denmark<br>Department of Respiratory Medicine, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark | <b>In vitro</b><br><b>2009</b> | 69 nm PVP-coated AgNP |                 | human monocytic cell line (THP-1) |      |                       | A drastic increase in ROS levels could be detected after 6–24 h suggesting that oxidative stress is an important mediator of cytotoxicity |     |         |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Type                           | AgNP Size                               | Surface Coating | Organism       | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                              | CoR | Remarks |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|-----------------|----------------|------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| <b>6302</b><br>Eom, H.-J. and J. Choi (2010).<br>"p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells." Environmental Science & Technology 44(21): 8337-8342 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20932003">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20932003</a> .<br>School of Environmental Engineering, College of Urban Science, University of Seoul, 90 Jeonmong-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-743, Korea | <b>In vitro</b><br><b>2010</b> | <100 nm commercial AgNP (Sigma-Aldrich) |                 | Jurkat T cells |      |                       | AgNPs exposure activates p38 mitogen-activated protein kinase through nuclear factor-E2-related factor-2 and nuclear factor-kappaB signaling pathways, subsequently inducing DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis. |     |         |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Type                           | AgNP Size | Surface Coating | Organism                                               | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                            | CoR | Remarks                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------|-----------------|--------------------------------------------------------|------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------------------------------|
| <b>6303</b><br>Garza-Ocaras, L., M. Ramirez-Cabrera, et al. (2010). "In vitro toxicity assessment of silver nanoparticles in Chang liver cells and J-774 macrophages." Toxicology Letters 196: S284-S284 %U <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427410013007">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427410013007</a> .<br>Fac de Medicina Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Mexico<br>The University of Texas at Austin, USA, 3 The University of Texas at San Antonio, USA | <b>In vitro</b><br><b>2010</b> | 2 nm AgNP |                 | Chang liver cells<br>J-774 murine macrophage cell line |      |                       | AgNP induce a pro-oxidant environment in the cell suggesting that their cytotoxicity is likely to be mediated through oxidative stress. |     | This article is really an abstract. |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Type                           | AgNP Size                                           | Surface Coating | Organism                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                            | CoR | Remarks                                                                                                                                                                                                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6304</b><br>Kokura, S., O. Handa, et al.<br>(2010). "Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics." <i>Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine</i> 6(4): 570-574 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060498">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060498</a> . | <b>In vitro</b><br><b>2010</b> | Ag nanoparticles<br>(Johzen Co. Ltd., Kyoto, Japan) |                 | mixed bacterial suspension<br>( <i>Escherichia coli</i> , American Type Culture Collection [ATCC] 8739;<br>Pseudomonas aeruginosa, ATCC 9027; <i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 6538), a mixed fungal (yeasts and molds) suspension ( <i>Candida albicans</i> , ATCC 10231; <i>Aspergillus niger</i> , ATCC 16404; <i>Penicillium citrium</i> , ATCC 9849; <i>Aureobasidium pullulans</i> , IFO 6353), and a waste suspension (filtered kitchen drainage)<br><br>HaCaT keratinocytes |      |                       | Ag nanoparticles were found to be very stable, showed sufficient preservation efficacy against mixed bacteria and mixed fungi, and did not penetrate normal human skin. |     | skin permeability and the cytotoxicity in human keratinocytes under UVB-irradiation<br><br>Ag nanoparticles appear to be suitable for use as a preservative in cosmetics.<br><br>Zeta potential measurement |



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6400 Human cancer cell lines</b> [fibrosarcoma, skin carcinoma, glioblastoma, A549: human lung adenocarcinoma cell line, HepG2: human hepatoma cells, HT29: human colon adenocarcinoma cell line, Caco-2: heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cells, THP-1: human monocytic cell line, SGC7901: gastric cancer cells, MCF-7: breast cancer cells, HeLa cells, HL60: Human promyelocytic leukemia cell line] (11 ฉบับ)                                        |
| งานวิจัยในกลุ่มนี้ ทำใน human cancer cell lines หลายชนิด ได้แก่<br>fibrosarcoma<br>skin carcinoma<br>glioblastoma<br>A549: human lung adenocarcinoma cell line<br>HepG2: human hepatoma cells<br>HT29: human colon adenocarcinoma cell line<br>Caco-2: heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cells<br>THP-1: human monocytic cell line<br>SGC7901: gastric cancer cells<br>MCF-7: breast cancer cells<br>HeLa cells, HL60: Human promyelocytic leukemia cell line |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Type                           | AgNP Size                                                           | Surface Coating | Organism                                               | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                             | CoR | Remarks                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------|------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6401</b><br>Park, S., Y. K. Lee, et al. (2007).<br>"Cellular Toxicity of Various Inhalable Metal Nanoparticles on Human Alveolar Epithelial Cells." Inhalation Toxicology 19(s1): 59-65 %L 0033 %U <a href="http://www.informapharmascience.com/doi/abs/0010.1080/08958370701493282">http://www.informapharmascience.com/doi/abs/0010.1080/08958370701493282</a> .<br><i>Division of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, and Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea</i><br><i>Division of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul, Korea</i><br><i>Department of Occupational and Environmental Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea</i><br><i>Department of Pharmacology, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea</i> | <b>in vitro</b><br><b>2007</b> | 150 nm Ag<br>100 nm Al<br>100 nm Ni<br>100 nm Zn<br>30 nm nano TiO2 |                 | human alveolar epithelial cell line A549 (ATCC CCL185) |      |                       | The extent of morphological damage was in the order of m-TiO2> n-TiO2> m-silica ≧ n-Ni ≈ n-Zn ≈ n-Ag ≈ n-Al and was affected in a dose-dependent manner. |     | various inhalable metallic NPs (TiO2, Ag, Al, Zn, Ni) could cause cell damages directly or indirectly. |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Type                           | AgNP Size                                | Surface Coating | Organism                                               | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                          | CoR | Remarks                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------|------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>6402</b><br>Arora, S., J. Jain, et al. (2008).<br>"Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies." <i>Toxicology Letters</i> 179(2): 93-100 %U <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427408001197">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427408001197</a> .<br>Centre for Nanobioscience, Agharkar Research Institute, G.G. Agarkar Road, Pune 411004, India | <b>In vitro</b><br><b>2008</b> | 7-20 nm spherical AgNP, topical ointment |                 | HT-1080 human fibro-sarcoma, A431 human skin/carcinoma |      |                       | morphological change at conc. of AgNP > 6.25 ug/mL; increased oxidative stress; DNA fragmentation<br><br>apoptotic conc. threshold much lower than the necrotic conc. |     | establishing safe AgNP level for formulating bacteriocidal topical ointment |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Type                           | AgNP Size                                                                                                                                               | Surface Coating | Organism                    | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                                  | CoR | Remarks                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------|------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6403</b><br>Kawata, K., M. Osawa, et al.<br>(2009). "In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells." Environmental Science & Technology 43(15): 6046-6051 %L 0025 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19731716">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19731716</a> .<br>Department of Urban and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Hokkaido University, North-13, West-8, Kita-ku, Sapporo 060-8628, Japan | <b>In vitro</b><br><b>2009</b> | 7-10 nm<br>AgNP<br>stabilized with poly-ethyleneimine (Kyoto Nano Chemical Co., Ltd., Kyoto, Japan)<br>15 nm<br>polystyrene (micromer PS-NP)<br>control |                 | human hepatoma HepG2 cells, |      |                       | accelerated cell proliferation at low doses (<0.5 mg/L)<br>significant cytotoxicity at higher doses (>1.0 mg/L) and induced abnormal cellular morphology, displaying cellular shrinkage and acquisition of an irregular shape |     | increased the frequency of micronucleus formation up to 48% of binucleated cells<br>Cysteine, a strong ionic Ag+ ligand, only partially abolished the formation of micronuclei mediated by Ag-NPs and changed the gene expression |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Type                               | AgNP Size               | Surface Coating | Organism                    | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                                                                                                 | CoR | Remarks                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|-----------------|-----------------------------|------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6404</b><br>Kim, S., J. E. Choi, et al. (2009).<br>"Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells." Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA 23(6): 1076-1084<br>%L 0025 %U<br><a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19508889">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19508889</a> .<br>College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea<br>College of Urban Science, University of Seoul, Seoul 130-743, Republic of Korea<br>College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Republic of Korea<br>College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Republic of Korea<br>College of Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea | <b>In vitro</b><br><br><b>2009</b> | delonized AgNP solution |                 | human hepatoma HepG2 cells, |      |                       | AgNP-treated cells have limited exposure to Ag+ ions.<br><br>AgNPs agglomerated in the cytoplasm and nuclei of treated cells, and induced intracellular oxidative stress.<br><br>AgNPs exhibited cytotoxicity with a potency comparable to that of Ag+ ions in in vitro cytotoxicity assays. |     | Inductive coupled plasma (ICP) spectrometry<br><br>AgNO3 treatment induced oxidative stress-related glutathione peroxidase 1 (GPx1) and catalase expression to a greater extent than AgNP exposure, but treatment with AgNO3 and AgNPs induced comparable superoxide dismutase 1 (SOD1) expression levels.<br><br>Our findings suggest that AgNP cytotoxicity is primarily the result of oxidative stress and is independent of the toxicity of Ag+ ions.<br><br>The toxicity of AgNPs was prevented by use of the antioxidant N-acetylcysteine, and AgNP-induced DNA damage was also prevented by N-acetylcysteine. |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Type                           | AgNP Size                                                               | Surface Coating | Organism                                                                | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | CoR | Remarks                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6405</b><br>Lanone, S., F. o. Rogerieux, et al. (2009). "Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines." Particle and Fibre Toxicology 6(1): 14 %U <a href="http://www.particleandfibretoxicology.com/content/16/11/14">http://www.particleandfibretoxicology.com/content/16/11/14</a> .<br>INSERM, Paris, France; Université Paris, Paris, France<br>INERIS, France<br>Laboratory of Pneumology, Unit for Lung Toxicology, Belgium and<br>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France | <b>In vitro</b><br><b>2009</b> | from Qi-netiQ Nanomaterial, Ltd.<br>About 25 types of metals and oxides |                 | human alveolar epithelial (A549) monocyte/macrophage (THP-1) cell lines |      |                       | Copper- and Zinc-based nanoparticles appear to be the most toxic. Titania, Alumina, Ceria and Zirconia-based nanoparticles show moderate toxicity.<br>No toxicity was observed for Tungsten Carbide.<br>No correlation between cytotoxicity and equivalent spherical diameter or specific surface area was found |     | EU FP6 Nanosafe2 Project<br>The use of MTT assay on THP-1 cells exposed for 24 hours appears to be the most sensitive experimental design to assess the cytotoxic effect of one nanoparticle. |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Type                               | AgNP Size                                                | Surface Coating | Organism   | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                                          | CoR | Remarks |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------|------------|------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| <b>6406</b><br><br>Miura, N. and Y. Shinohara (2009). "Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells." Biochemical and Biophysical Research Communications 390(3): 733-737 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836347">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836347</a> .<br><br>National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH), Japan | <b>In vitro</b><br><br><b>2009</b> | 2-5 nm<br>AgNP<br>(Mitsuboshi Belting Ltd., Kobe, Japan) |                 | HeLa cells |      |                       | The nanoAg-induced cytotoxicity was lower than that of AgNO3 the expressions of hc-1 and mit-2A, well-known oxidative stress-related genes, were up-regulated by nanoAg treatment.<br>nanoAg possesses the potential for cytotoxicity |     |         |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Type                               | AgNP Size                                                                                                       | Surface Coating | Organism                                       | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                                           | CoR | Remarks                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------|------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6407</b><br><br>Deng, F., P. Olesen, et al.<br>(2010). "Silver nanoparticles up-regulate Connexin43 expression and increase gap junctional intercellular communication in human lung adenocarcinoma cell line A549." <i>Nanotoxicology</i> 4: 186-195<br><br>Peking University School of Public Health, Beijing, China<br><br>Department of Environmental and Occupational Medicine, Aarhus University Institute of Public Health, Aarhus, Denmark | <b>In vitro</b><br><br><b>2010</b> | commercial<br>30-50 nm<br>spherical<br>AgNP<br>coated with<br>0.2% PVP<br>(NanoAmor,<br>Houston,<br>Texas, USA) |                 | human lung<br>adenocarcinoma<br>cell line A549 |      |                       | significantly increased the expression of Cx43 protein<br><br>up-regulated expression of Cx43 mRNA in a dose-dependent manner<br><br>Ag+ increased Cx43 mRNA expression but failed to increase GJIC and the expression of Cx43 protein |     | Ag NPs induced the increase of GJIC activity in A549 cells through up-regulation of Cx43 protein, suggesting that Cx43 and GJIC may be one of the targets for Ag NPs biological effects |



| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Type                           | AgNP Size     | Surface Coating | Organism                                                                             | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                 | CoR | Remarks                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------|----------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6408</b><br>Gopinath, P., S. K. Gogoi, et al. (2010). "Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis." Colloids and Surfaces. B. Biointerfaces 77(2): 240-245 %L 0006 %U <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20197232">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20197232</a> .<br>Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology Guwahati, Guwahati 39, Assam, India<br>Department of Chemistry, Indian Institute of Technology Guwahati, Guwahati 39, Assam, India<br>Centre for Nanotechnology, Indian Institute of Technology Guwahati, Guwahati 39, Assam, India | <b>In vitro</b><br><b>2010</b> | 18 nm<br>AgNP |                 | baby hamster kidney (BHK21) cell line<br>human colon adenocarcinoma (HT29) cell line |      |                       | Ag NP induced p53-mediated apoptotic pathway |     | AgNP could be attributed as therapeutic agent for biomedical and pharmaceutical applications. |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Type                               | AgNP Size                                                                                                                                                                                                                                         | Surface Coating | Organism                                                         | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | CoR | Remarks                                                                                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------|------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6409</b><br><br>Liu, W., Y. Wu, et al. (2010).<br>"Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size." <i>Nanotoxicology</i> 4(3): 319-330 %U<br><a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20795913">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20795913</a> .<br><br>State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing<br><br>Yantai Institute of Coastal Zone Research for Sustainable Development, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong<br><br>School of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan, China<br><br>St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA | <b>In vitro</b><br><br><b>2010</b> | 5 nm and 20 nm<br>AgNP (Huzheng Nano Technology Co., Ltd., Shanghai, China<br><br>50 nm<br>AgNP (synthesized by themselves using sodium hypophosphite as the reducing agent, sodium hexametaphosphate as disperser, and PVP as protective agent.) |                 | Cell lines:<br><br>A549<br><br>HepG2<br><br>SGC7901<br><br>MCF-7 |      |                       | Observable deleterious effects on the cell morphologies and membrane integrity were induced by SNP-5 and SNP-20.<br><br>SNPs elevated the ROS levels in cells and arrested the cells at S phase.<br><br>Apoptosis occurred for 4–9% of the exposed cells.<br><br>All these cellular responses as well as EC50 values were found to be size-dependent for the tested SNPs. |     | comprehensive long paper<br><br>smaller nanoparticles enter cells more easily than larger ones, which may be the cause of higher toxic effects. |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Type                           | AgNP Size                         | Surface Coating | Organism                                                                                                                        | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                                                                                                | CoR | Remarks                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------|
| <b>6410</b><br>Srivichai, P., F. M. Williams, et al. (2010). "An investigation of the toxicity of silver nanoparticles to HL60 and Jurkat cells in vitro." Toxicology 278(3): 363-363 %L 0000 %U <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X10004518">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X10004518</a> .<br>Institute of Cellular Medicine, Newcastle University, NE1 7RU, UK<br>The Nanotechnology Centre, Newcastle University, NE1 7RU, UK | <b>in vitro</b><br><b>2010</b> | 100 nm<br>AgNP<br>(Sigma-Aldrich) |                 | HL60 (Human promyelocytic leukemia cells)<br><br>Jurkat cells (immortalized T lymphocyte cell line that produces interleukin 2) |      |                       | Exposure to silver NPs caused loss of cell viability and increased DNA damage in both Jurkat and HL60 cells (Figs. 1–3). Effects on cell viability were greater in HL60 compared to Jurkat cells, but DNA damage, which was dose related, was higher in the Jurkat cells by about two-fold. |     | only Poster Abstract is available |

| Title - Author                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Type                               | AgNP Size                  | Surface Coating | Organism                                                                            | Dose | Exposure Method/ Time | Key Findings                                                                                                                                                                                                                                                                               | CoR | Remarks |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| <b>6411</b><br>Bouwmeester, H., J. Poortman, et al. (2011). "Characterization of Translocation of Silver Nanoparticles and Effects on Whole-Genome Gene Expression Using an In Vitro Intestinal Epithelium Co-Culture Model." ACS Nano: 110411135720084 %U <a href="http://pubs.acs.org/dol/abs/110411135720010.110411135721021/n11041132007145">http://pubs.acs.org/dol/abs/110411135720010.110411135721021/n11041132007145</a> .<br><br>RIKILT, Institute of Food Safety, Wageningen University and Research Center, Akkermaalsbos 2, P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands | <b>In vitro</b><br><br><b>2011</b> | 20, 34, 61, 113 nm<br>AgNP |                 | in vitro model for the human intestinal epithelium consisting of Caco-2 and M-cells |      |                       | AgNP induced clear changes in gene expression in a range of stress responses. The gene expression response to silver nanoparticles was very similar to that of AgNO3. Therefore, the observed effects of AgNP are likely exerted by the Ag+ ions that are released from the nanoparticles. |     |         |

## สรุปภาพรวมของแผนงาน

เนื่องจากคณะผู้ตรวจสอบทางวิชาการ ได้อนุมัติทุนวิจัยให้เฉพาะโครงการย่อยที่ 1 ดังนั้นแผนงานวิจัยนี้ จึงเป็นการสืบค้น ประมวล และวิเคราะห์องค์ความรู้เกี่ยวกับความปลอดภัยของอนุภาคโลหะนาโน เพื่อสร้างเป็นแผนที่องค์ความรู้ขึ้น โดยใช้กรณีศึกษา เฉพาะเรื่องความปลอดภัยของอนุภาคโลหะเงินนาโน ในเซลล์มนุษย์ (โปรดดูเพิ่มเติมในบทนำรวม หน้า XIX)

## ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

ผู้ดำเนินการวิจัย มีข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย 4 ข้อ ซึ่งได้นำเสนอไว้แล้วในหัวข้อ 9.8 หน้า 62 ซึ่งคณะผู้ตรวจสอบทางวิชาการ ได้มีความเห็นสอดคล้องกับผู้ดำเนินการวิจัย ดังต่อไปนี้ “[เห็นด้วย] ตามที่ผู้วิจัยเรื่องนี้ได้นำเสนอคือ เพิ่มเติมการรวบรวมข้อมูลของ nanoparticle อื่นๆ เช่น ของ  $\text{TiO}_2$   $\text{ZnO}$  ฯลฯ เพื่อเมืองไทยจะได้มีแหล่งข้อมูลที่ง่ายต่อการค้นคว้า [นอกจากนั้นควรมีการศึกษา] การวิจัยพิษหรือความปลอดภัยของ nanoparticle ต่างๆ ที่มีการใช้ในประเทศไทย เพื่อจะได้นำมาพิจารณาการใช้หรือเป็นข้อมูลระวังการใช้หรือสามารถใช้วัดในระดับขนาดไหน และปริมาณเท่าใด เป็นต้น

## ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

ได้นำเสนอแล้วในบทนำรวม หน้า XX ถึง XXI

แผนงานวิจัยองค์ความรู้ด้านความปลอดภัยนาโนโลหะ

โครงการวิเคราะห์ประเมินองค์ความรู้ด้านความปลอดภัยนาโนโลหะ

กรณีความเป็นพิษของอนุภาคโลหะเงินนาโนในเซลล์มนุษย์

Zero Valent Metal Nanosafety Knowledge Analysis and Assessment:

The case of nanosilver toxicity in human cells

หัวหน้าโครงการและนักวิจัย

ดร. เลอสรร ธนสุกาญจน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 0-2218-5424 โทรสาร 0-2218-5418

Email: [lerson@lerson.org](mailto:lerson@lerson.org)