



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران

۲۱۲۵۷

چاپ اول

۱۳۹۵

INSO
21257
1st.Edition
2017

Identical
with
ISO 16197:
2014

فناوری نانو - گردآوری و شرح روش‌های
غربالگری توکسیکولوژیک برای نانو مواد
ساخته شده

**Nanotechnologies — Compilation
and description of toxicological
screening methods for manufactured
nanomaterials**

ICS: 07.030

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران - ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.org.ir

وبگاه: <http://www.isiri.org>

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No.1294 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.org.ir

Website: <http://www.isiri.org>

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد. سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)^۱، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استانداردهای کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

¹ International Organization for Standardization

² International Electrotechnical Commission

³ International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)

⁴ Contact point

⁵ Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

« فناوری نانو - گردآوری و شرح روش‌های غربالگری توکسیکولوژیک برای نانو مواد ساخته شده »

رئیس:

قاضی خوانساری، محمود
(دکتری توکسیکولوژی)

سمت و/یا محل اشتغال:

عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران

دبیر:

حیدری، مهناز
(کارشناس ارشد توکسیکولوژی)

عضو هیات علمی پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم
زیستی - جهاد دانشگاهی ابن سینا

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

اسلامی پور، الهه
(کارشناسی ارشد زیست شناسی)

کارشناس کارگروه استاندارد و ایمنی - ستاد ویژه
توسعه فناوری نانو

پوی پوی، حسن
(کارشناسی ارشد شیمی)

دبیر کمیته استانداردسازی فناوری نانو ایران - ستاد
ویژه توسعه فناوری نانو

چوخاچی زاده مقدم، امین
(کارشناسی ارشد نانو فناوری)

کارشناس کارگروه استاندارد و ایمنی - ستاد ویژه
توسعه فناوری نانو

سیفی، مهوش
(کارشناس ارشد مدیریت دولتی)

کارشناس استاندارد - بازنشسته سازمان ملی
استاندارد ایران

کوهی، محمدکاظم
(دکترای توکسیکولوژی)

عضو هیئت علمی دانشگاه تهران

گلبابایی، فریده
(دکترای بهداشت حرفه ای)

عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران

ویراستار:

سیفی، مهوش
(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

کارشناس استاندارد - بازنشسته سازمان ملی
استاندارد ایران

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
و	پیش‌گفتار
ز	مقدمه
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۲	۳ اصطلاحات و تعاریف
۴	۴ نمادها و کوتاه نوشت‌ها
۵	۵ زمینه
۵	۵-۱ نقش و ارتباط غربالگری توکسیکولوژیک در ارزیابی ایمنی نانومواد ساخته‌شده
۶	۵-۲ غربالگری توکسیکولوژیک به عنوان بخشی از روش‌های ارزیابی توکسیکولوژیک نانومواد ساخته شده
۸	۵-۳ بحث در مورد دُرّ مربوط به غربالگری توکسیکولوژیک
۸	۵-۴ بحث در مورد رابطه بین این استاندارد و استاندارد ISO/TR 16196
۸	۵-۵ بحث در مورد رابطه ما بین استاندارد ارائه‌شده با استاندارد ایزو ISO/TR 13014
۱۰	۶ روش‌های برای غربالگری توکسیکولوژیک مربوط به سلامت انسان
۱۰	۶-۱ کلیات
۱۱	۶-۲ کنترل‌های مثبت و منفی بر روی آزمون‌های سمیت نانومواد
۱۱	۶-۳ روش‌های مرتبط برای غربالگری توکسیکولوژیک نانومواد ساخته‌شده در روش برون‌تنی
۱۳	۶-۳-۱ کلیات
۱۳	۶-۳-۲ روش‌های غربالگری سمیت سلولی
۱۴	۶-۳-۳ روش‌های غربالگری پاسخ‌های التهابی و ایمنی
۱۷	۶-۳-۴ روش‌های غربالگری پاسخ‌های استرس (شامل اکسیداتیو و تولید پروتئین)
۲۰	۶-۳-۵ روش‌های غربالگری اجزاء خونی (شامل فاکتورهای ایحاد لخته خون یا همولیز)
۲۲	۶-۳-۶ روش‌های غربالگری سمیت ژنی
۲۳	۶-۳-۷ آزمون برون‌تنی سد و سیستم‌های آزمون‌های مناسب برای سنجش سمیت
۲۶	۶-۳-۸ اندازه‌گیری‌های اومیکس
۲۶	۶-۳-۹ سمیت‌های دیگر
۲۷	۶-۴ روش‌های مرتبط آزمون درون‌تنی برای غربالگری سمیت نانومواد ساخته شده
۲۷	۶-۴-۱ کلیات

صفحه	عنوان
۲۷	۶-۴-۲ مدل‌های غربالگری کل حیوان (شامل اندازه‌گیری متابولیسم ها،)
۲۸	۶-۴-۳ سایرآزمون‌های غربالگری مرتبط با آزمون درون تنی
۲۹	۷ روش‌هایی برای غربالگری توکسیکولوژیک مرتبط با محیط‌زیست
۲۹	۷-۱ مقدمه
۳۰	۷-۲ سرنوشت محیط و توزیع
۳۰	۷-۳ تجزیه‌پذیری و تبدیل محیط‌زیست
۳۰	۷-۴ بقا و تجمع زیست‌محیطی
۳۲	کتاب‌نامه

پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو-گردآوری و شرح روش‌های غربالگری توکسیکولوژیکی برای نانومواد ساخته‌شده» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی شماره ۵ تهیه و تدوین شده، در سی و هفتمین اجلاس هیئت کمیته ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۹۵/۱۰/۲۸ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوه نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط، مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد. این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی/منطقه‌ای زیر به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می‌باشد و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی/منطقه‌ای مزبور است:

ISO/TR 16197:2014, Nanotechnologies — Compilation and description of toxicological Screening methods for manufactured nanomaterials

با توجه به روند رو به رشد فناوری نانو آزمون‌های غربالگری توکسیکولوژیک نانومواد مهندسی‌شده و ساخته‌شده مقدم بر آزمون‌های گسترده توکسیکولوژیک، آنالیز و ارزیابی ریسک می‌باشد، روش‌های غربالگری توکسیکولوژیک بر تامین اطلاعات و تجهیزات لازم برای استفاده در فرآیندهای تصمیم‌گیری تمرکز دارند. به‌عنوان مثال، تدوین این استاندارد روشی را که می‌تواند در غربالگری نانومواد استفاده شود ارائه می‌کند، همچنین مشخص می‌کند که این امر در ارتقاء و ساخت این مواد یا تولید محصولاتی که از این مواد تشکیل شده به‌صرفه می‌باشد یا خیر. به‌علاوه، اطلاعات ارائه‌شده در این مورد می‌تواند برای تشخیص این امر که آیا صرف هزینه در انجام آزمون‌ها و یا تشخیص مفید بوده و آیا کنترل‌های مناسبی در ادامه پژوهش نانومواد در آزمایشگاه‌ها به‌کار گرفته‌شده یا خیر، نیز بسیار مفید باشد.

این استاندارد نقش مکمل یا مقایسه‌ای برای هیچ یک از روش‌های آزمون‌های فعلی مورداستفاده در دفع نانومواد نداشته و فهرست معتبری از آزمون‌ها در این خصوص ارائه نمی‌کند.

اطلاعات ارائه‌شده در این استاندارد صرفاً مطابق با استانداردهای جهانی مشابه مانند: «گردآوری و شرح آماده‌سازی نمونه‌ها و روش‌های دفع نانومواد ساخته‌شده» و در ارتباط با پژوهش‌های توکسیکولوژیک ارائه شده می‌باشد. استاندارد ISO 10993-18 به‌طور خاص ارزیابی خصوصیات شیمیایی مواد اولیه استفاده شده در ابزارهای پزشکی را موردتوجه قرار می‌دهد [1]، استاندارد ISO 1497 دلالت بر آن دارد که خصوصیات شیمیایی مواد باید در آنالیز ریسک‌های توکسیکولوژیک موردتوجه قرار گیرد [2]، استاندارد ISO/TR 13014 نیز به مسائل مربوط به خود مواد اولیه می‌پردازد [3]. استاندارد ISO/TR 13121 در نهایت به شرح و تفسیر فرآیند شناسایی، ارزشیابی و ارتباطات ریسک احتمالی تولید نانومواد پرداخته و راهنمایی‌هایی در رابطه با انجام آزمون‌ها و میزان سمیت نانو مواد ارائه می‌دهد [4].

فناوری نانو-گردآوری و شرح روش‌های غربالگری توکسیکولوژیک برای نانومواد ساخته‌شده

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین دو روش برون‌تنی^۱ و درون‌تنی^۲ است که در آزمون‌های توکسیکولوژیک از جمله غربالگری بوم توکسیکولوژی^۳ نانومواد مهندسی ساخته‌شده کاربرد دارد. آزمون‌های غربالگری توکسیکولوژیک که در این استاندارد ارائه‌شده در موارد: تصمیم‌گیری سریع در تحقیقات، توسعه محصول، بازخورد سریع نگرانی‌های ایمنی و توکسیکولوژیک یا برای ارزیابی اولیه نانومواد ساخته‌شده بین روش سنجش‌های غربالگری مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاربرد آزمون غربالگری نسبتاً ساده، ارزان و راحت است و نمایانگر پیامدهای بالقوه مضر برای سلامت محیط و انسان است. این استاندارد در راستای تکمیل دیگر تلاش‌های بین‌المللی در مورد توکسیکولوژی نانومواد با تمرکز بر روش‌های غربالگری مناسب برای ارزیابی اولیه توصیه می‌شود و قصد الگوبرداری از تلاش‌های سازمان‌های دیگر مانند سازمان توسعه و همکاری اقتصادی (OECD)^۴ را ندارد. اگر غربالگری موجب شناسایی زود هنگام مخاطرات شود، راهنمایی‌های ارائه‌شده از سایر سازمان‌ها می‌تواند در کنار تلاش‌های دیگر سازمان‌ها برای ارزیابی توکسیکولوژیک در مقیاس کلی به کار گرفته شود.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به آنها اشاره شده است. بدین ترتیب، آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می‌گردد. در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آنها ارجاع داده شده است. همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام آور است:

۱-۲ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۸۰۰۰۴-۱: فناوری نانو- واژه‌نامه - اصطلاحات اصلی

۲-۲ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۸۰۰۰۴-۲: فناوری نانو- واژه‌نامه - نانواشیاء

2-1 ISO/TS 27687:2008, Nanotechnologies — Terminology and definitions for nano-objects — Nanoparticle

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد علاوه بر اصطلاحات و تعاریف ارائه شده در استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۸۰۰۰۴-۱ و ISO/TS 27687، اصطلاحات و تعاریف زیر نیز به کار می‌رود:

۱-۳

کلوخه

agglomerate

1- In vitro

2- In vivo

3- Ecotoxicological

4- Economic Cooperation and Development

مجموعه‌ای از ذرات که به شکلی ضعیف یا نسبتاً قوی به یکدیگر متصل شده‌اند، به طوری که مساحت سطح خارجی منتجاً آنها مشابه مجموع مساحت سطوح تک‌تک اجزای تشکیل‌دهنده باشد.

یادآوری ۱- نیروهایی که کلوخه را نزدیک به یکدیگر نگه می‌دارد نیروهای ضعیفی هستند، مثلاً نیروهای وان‌دروالس یا درهم‌تافتگی‌های فیزیکی ساده.

یادآوری ۲- کلوخه‌ها به عنوان ذرات ثانویه نیز در نظر گرفته می‌شوند و ذرات اصلی منشأ، ذرات نوع اول نامیده می‌شوند.

[منبع: بند ۳-۴، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴]

۲-۳

انبوهه

aggregate

ذره متشکل از ذراتی با پیوندهای قوی یا جوش خورده که مساحت سطح خارجی منتجاً آنها به‌طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از مجموع مساحت سطوح تک‌تک اجزای تشکیل‌دهنده باشد.

یادآوری ۱- نیروهایی که انبوهه را کنار یکدیگر نگه می‌دارد، نیروهای قوی هستند، مثلاً پیوندهای کووالانسی یا یونی و یا نتیجه جوش خوردن و گره‌خوردگی فیزیکی پیچیده یا درغیراین‌صورت، ذرات اولیه به‌هم‌چسبیده قبلی.

یادآوری ۲- انبوهه‌ها به عنوان ذرات ثانویه نیز در نظر گرفته می‌شوند و ذرات اصلی منشأ، ذرات اولیه نامیده می‌شوند.

[منبع: بند ۳-۵، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴]

۳-۳

نانوماده ساخته‌شده

manufactured nanomaterial

نانوماده‌ای که برای داشتن خواص و یا ترکیبی خاص به‌طور هدفمند تهیه شده است.

[منبع: زیربند ۲-۹، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴]

۴-۳

نانولیف

nanofibre

نانوشیئی با دو بعد خارجی در مقیاس نانو و بعد سوم که به‌طور قابل ملاحظه‌ای بزرگتر است.

یادآوری ۱- بزرگترین بعد خارجی لزوماً در مقیاس نانو نیست.

یادآوری ۲- اصطلاحات نانولیفچه و نانورشته (هر دو زیرنویس شوند) نیز می‌تواند استفاده شود.

یادآوری ۳- به یادآوری ۱ در زیربند ۴-۴ مراجعه شود

[منبع: زیربند ۳-۵، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴]

۵-۳

نانوماده

nanomaterial

ماده‌ای که هر بعد خارجی آن نانومقیاس است یا ساختار داخلی یا ساختار سطحی آن نانومقیاس است. **یادآوری ۱-** این اصطلاح عمومی شامل نانوشیء و ماده نانو ساختار است. **یادآوری ۲-** نانوماده مهندسی شده، نانوماده ساخته شده و نانوماده تصادفی نیز مشاهده شوند.

[منبع: زیربند ۲-۴، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴]

۶-۳

نانوشیء

nano-object

هر قطعه مجزا از ماده با یک، دو و یا سه بعد خارجی در نانومقیاس (۱-۲) است. **یادآوری -** ابعاد خارجی دوم و سوم عمود بر بعد اول و همچنین عمود بر یکدیگر هستند.

[منبع: زیربند ۲-۲، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴]

۷-۳

نانوذره

nanoparticle

نانوشیئی با تمام ابعاد خارجی در مقیاس نانو که در آن طول بلندترین و کوتاهترین محورهای نانوشیء به‌طور قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت نداشته باشد. **یادآوری -** چنانچه ابعاد به‌طور قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت داشته باشند (معمولاً بیشتر از سه برابر)، ممکن است اصطلاحاتی مانند نانولیف یا نانوصفحه بر نانوذره ترجیح داده شود.

[منبع: زیربند ۴-۴، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴]

۸-۳

نانومقیاس

nanoscale

گستره اندازه بین تقریباً یک نانومتر تا صد نانومتر است. **یادآوری -** خواصی که از اندازه‌های بزرگتر برون‌یابی نمی‌شوند غالباً در این گستره اندازه نشان داده می‌شوند. [منبع: بند ۲-۱ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴]

۹-۳

نانولوله

nanotube

نانولیف توخالی است.

[منبع: زیربند ۴-۸، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴]

particle

قطعه کوچکی از ماده با مرزهای فیزیکی معین است.
 یادآوری ۱ - مرز فیزیکی را می‌توان به‌عنوان سطح مشترک نیز توصیف کرد.
 یادآوری ۲ - ذره می‌تواند به‌عنوان یک واحد جابه‌جا شود.
 یادآوری ۳ - این تعریف کلی از ذره برای نانوآشیاء (۲-۲) به‌کار گرفته می‌شود.
 [منبع: بند ۳-۱، استاندارد ملی ایران - ایزو شماره ۲-۸۰۰۴]

۴ نمادها (و کوتاه‌نوشت‌ها)

ASTM	American Society for Testing and Materials	انجمن آزمون و مواد امریکا
ESR	Electron Spin Resonance	تشدید چرخش الکترون
ITS	Integrated Testing Strategies (or in some cases, Intelligent Testing Strategies)	راهبردهای تلفیقی آزمون (راهبردهای آزمون هوشمند)
LTE	Lymphoid Tissue Equivalent Module	پودمان معادل بافت لنفاوی
NM	Nanomaterials	نانو مواد
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	سازمان توسعه و همکاری اقتصادی
PBS	Phosphate Buffer Saline	بافر فسفات سالین
PTE	Peripheral Tissue Equivalent	معادل بافت‌های محیطی
ROS	Reactive Oxygen Species	گونه‌های فعال اکسیژن
STS	Standard Toxicity Studies	مطالعات استاندارد سمیت

۵ زمینه

۵-۱ نقش و ارتباط غربالگری توکسیکولوژیک در ارزیابی ایمنی نانو مواد ساخته‌شده

امروزه همگام شدن با سرعت پیدایش نانومواد نوظهور با خواص جدید و بررسی آنها از نظر توکسیکولوژیک در مواجهه انسانی، مواجهه شغلی و محیطی یک چالش به‌شمار می‌آید. از آنجا که عناصر موجود در جدول تناوبی می‌تواند به‌صورت نانو درآید، این تنوع بالقوه سبب می‌شود تا آزمون‌های معمولی و الگوهای موجود را نتوان برای ارزیابی نانومواد جدید به‌کار برد. ظرفیت بالای غربالگری توکسیکولوژیک برای همگام شدن با تولید روزافزون محصولات حاوی نانومواد امری ضروری به‌شمار می‌رود. آزمون‌های غربالگری هم‌اکنون به‌وسیله روش‌های کشت سلولی و یا دیگر روش‌های آزمایشگاهی براساس هزینه، زیرساخت‌ها و محدودیت‌های زمانی انجام می‌شوند. با در نظر گرفتن چنین ملاحظاتی از انجام آزمون‌های حیوانی نیز اجتناب می‌شود. علاوه بر این‌ها، هم‌اکنون تلاش‌هایی در سراسر جهان برای کاهش استفاده از آزمون‌های حیوانی در پژوهش‌های درون تنی بر پایه قانون 3R متشکل از (جایگزینی، کاهش، اصلاح)^۱ انجام شده است [5]. آزمون‌های غربالگری،

1- Replacement, Reduction, Refinement

ارائه یک شناساگر از نتایج گوناگون احتمالی و پیامدهای مضر و اثرات آن روی سلامت انسان و محیط زیست می باشد. اگر چه تعاریف زیادی برای آزمون های غربالگری وجود دارد، هدف از ارائه این استاندارد، آزمون های غربالگری به عنوان یک آزمون نسبتاً ساده و ارزان تعریف می شود که به آسانی اجرا و نتایج سریع را فراهم می کند.

یک آزمون غربالگری ممکن است شامل موارد زیر باشد:

- عدم استفاده از حیوانات با حساسیت بالا^۱؛
- ایجاد یک نقطه پایانی^۲ کمی یا یک غربالگری بله/خیر قابل پذیرش و قابل اعتماد؛
- تکرارپذیری در آزمایشگاه ها؛
- تجدیدپذیر با کنترل های مثبت یا منفی مناسب.

در آزمون های غربالگری، اغلب داده های مکانیستیک^۳ خاصی به دست می آید که می توان از آنها در آنالیز ترکیب مواد شیمیایی استفاده نمود. این استاندارد فقط بر آن دسته از آزمون هایی تمرکز دارد که برای تعیین سمیت نانومواد انجام شده اند. بنابراین، نتایج این نوع آزمون ها می تواند در ادامه دادن یا ندادن ساخت برخی از این مواد کمک کننده باشد. به طور مثال، آن دسته از نانومواد^۴ که پیش بینی می شود مخاطره آمیز^۴ هستند، از این طریق می توان از چرخه تولید حذف کرد.

هنگامی که از آزمون راهبرد لایه های^۵ استفاده می شود، روش غربالگری با ظرفیت بالا برای محدودیت بیشتر آزمایش های درون تنی یا شناسایی مواد مخاطره آمیز برای اهداف تحقیقات درون تنی و برون تنی به کار می رود. سنجش های غربالگری با ظرفیت بالا با توجه به حجم وسیع نانومواد موجود در بازار، از نظر سلامت انسان اهمیت زیادی دارد. به هر حال محدودیت هایی در سنجش های غربالگری در ارتباط با جزییات بیشتر و سنجش های تاییدی^۶ وجود دارد. بنابراین، آزمون ها باید طوری طراحی شوند که در درون یک آزمون راهبردی تایید شده قرار گیرند. محدودیت های سنجش شامل موارد زیر است:

- آزمون های غربالگری معمولاً برای پیش بینی انسانی معتبر نیستند.
 - روابط برون یابی دژ- پاسخ از طریق غربالگری و مواجهه انسانی پیچیده است.
 - پیش بینی غربالگری مواجهه حاد از مواجهه مزمن مخاطرات انسانی کار مشکلی است.
- هرچند آزمون های غربالگری به عنوان یک روش منحصر بفرد نیست، ولی اگر نتایج بیانگر این نکته باشد که یک ماده سمی است یا خیر، می تواند از مطالعات آینده جلوگیری کند.
- این بدان معنا است که در بعضی از موارد بدون شک این روش مخاطرات انسانی را کمتر از مقدار واقعی یا بیشتر از مقدار واقعی نشان می دهد.

1- Sentient animals
2- End point
3- Mechanistic
4- Hazardous
5- Tiered testing
6- Confirmatory Assays

۲-۵ غربالگری توکسیکولوژیک به عنوان بخشی از رویکرد لایه‌ای برای ارزیابی توکسیکولوژیک نانومواد ساخته شده

یک رویکرد آزمون لایه‌ای بر پایه ارزیابی گام به گام بنا نهاده شده است، این بدان معنی است که در هر گام از فرآیند ارزیابی، داده‌ها / اطلاعاتی که ممکن است در گام بعدی مورد نیاز باشند یا در کل فرآیند آزمون مفید واقع شوند را فراهم می‌کنند. آزمون‌های غربالگری اغلب در یک راهبرد آزمون مرحله‌ای قرار می‌گیرند و عموماً در یکی از مراحل اولیه انجام می‌شود. این امر موجب استفاده مجاز و کافی از منابع در سطوح گوناگون، مانند شناسایی مقتضیات لازم در آزمون و تصمیم‌گیری در تولید محصول از نظر پروفایل اولیه یک مخاطره^۱ خواهد بود. غربالگری توکسیکولوژیک بخشی از ابتدایی‌ترین مراحل در آزمون راهبردی مبتنی بر شواهد (راهبردهای آزمون هوشمند) به‌شمار می‌روند [6]. راهبردهای آزمون هوشمند، داده‌های موجود و با ارزش نانومواد را در نظر گرفته و با توجه به آنها یک آزمون راهبردی منطقی را برای درک ویژگی مخاطراتی که نانومواد بدون استفاده از آزمایش بر روی حیوان را ارائه می‌دهد.

علاوه بر روش‌های برون‌تنی و درون‌تنی، روش‌های نرم‌افزاری غیرآزمایشگاهی این‌سیلکو^۲ نیز می‌توانند بخشی از راهبردهای آزمون هوشمند باشد. روش‌های آنالیز کمی ارتباط بین ساختار فعالیت را (QSAR)^۳ می‌توان برای نانوذرات به‌کار برد. تجزیه و تحلیل نانومواد می‌تواند برای نانوذرات به‌کار گرفته شود، به‌شرط اینکه توصیف‌گرهای مناسب و دربرگیرنده مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی و ساختاری نانوذرات همراه با فعالیت زیستی وجود داشته باشد [8][7]. این امر منجر به ارائه مدل‌هایی می‌شود که با توجه به داده‌ها و رویکرد مدل سازی قادر به پیش‌بینی اثرات کیفی (مانند اثر استرس اکسیداتیو)^۴ اکسیداتیو^۴ و کمی (مانند اثر سمیت سلولی) هستند. با این حال، به دلیل عدم وجود مجموعه داده‌های مناسب، تاکنون

ط

پژوهش‌های محدودی در این مورد منتشر شده است [9] تا [17]. چالش‌ها و موفقیت‌های اخیر در ساختار کمی برای نانوذرات در جای دیگری مورد بررسی قرار خواهد گرفت [19][18].

۳-۵ بحث در مورد دُز مربوط به غربالگری توکسیکولوژیک

انسان‌ها و محیط از طرق محدودی در معرض نانومواد قرار می‌گیرند به‌طور مثال، از طریق تنفس، بلعیدن، تماس پوستی یا در محیط از طریق آب، هوا و خاک. غلظت‌های مواجهه مواد در این آزمون قابل تعیین می‌باشد (به‌طور مثال نانو مواد موجود در هوا^۵ و در محیط‌کار در هر گرم از امولسیون ترکیبی از روغن در آب که بر روی پوست استفاده شده است). در حال حاضر تراکم مواجهه نانومواد مهندسی شده برای محیط ناشناخته است. درحالی‌که مشخصات ریسک برای ارزیابی میزان غربالگری ضروری نیست، اما برای ارزیابی ریسک کمی^۶ مورد نیاز است. با این حال، در همه مطالعات، مجری باید دقت لازم را در انجام ارزیابی‌های غربالگری داشته و ارزیاب^۷ نیز باید داده‌ها را با دقت ارزشیابی نماید تا رابطه مابین تاثیر و دُز به‌کار گرفته شده دچار خطا و اغراق نگردد. ارزیاب باید در هر زمان که امکانش وجود داشت از مقادیر دُزهای مصرفی، استفاده و میزان خطری که آن دُز خاص ممکن است موجب شود را تخمین بزند. بنابراین پژوهش‌های برون‌تنی کشت

1- Early Hazard Profile

2- In Silico

3-Quantitative Structure–Activity Relationship

4- Oxidative Stress

5- Airborne

6- Quantitative Risk

7- Assessors

سلولی از مجرای تنفس، تراکم و ظرفیت ریه^۱ بعد از تنفس، مورد نظر قرار می‌گیرد. در پژوهش‌های برون‌تنی سلول‌های کراتین‌ساز پوست^۲، باید به مقدار دُز سازگار با غلظت استفاده شده در پوست توجه شود. سایر مقادیر برای نشان دادن پاسخ‌های مرتبط با دُز و تعیین مخاطرات بالقوه دُز- پاسخ معمولاً استفاده می‌شود. کمترین دُز تعیین شده در این مطالعات ممکن است در حدود میزان مواجهه در انسان باشد. سطوح دُزهای اضافی (این دُزهای تجویزی) اغلب نسبت به طرح واقعی اغراق‌آمیزتر است ولی به تحقیق کمک می‌کنند و در عین حال پژوهش را نیز تحت‌تاثیر قرارداده و پتانسیل مخاطرات را مشخص می‌کنند.

فاکتورهای متعددی در فرآیند آماده‌سازی نمونه در نظر گرفته شده تا از به‌کارگیری دُزهای هدف دریافتی اطمینان حاصل شود. در صورت نیاز به عوامل پخش‌کننده^۳، تدابیر مناسبی باید اتخاذ شود تا ذره به شکل توده در محیط ایجاد نشود مگر در صورتی که در فرآیند ارزیابی به توده بودن نیاز باشد. اگر از عوامل پخش‌کننده استفاده شود، آنها را مورد ارزیابی قرار داده تا از تاثیرات مشاهده شده اطمینان حاصل شود. برای مثال، اگر یک نانوذره برای اثرات سمی آن مورد ارزیابی قرار گرفته شود، عامل پخش‌کننده نباید نقشی را در اثرات سمیت ذره ایفا کند. روش‌های پراثرژی مانند فراصوتی^۴ برای پخش کردن ذرات استفاده می‌شود. توصیه می‌شود در صورتی که ذرات به دست آمده نمایانگر ذرات در محیط باشند، از این روش پخش استفاده شود.

همانطور که بارها در این استاندارد نیز بدان تاکید شده، اطلاعات مناسب فیزیکی و شیمیایی کافی مواد با لحاظ نمودن مقیاس‌های دُز (تعداد، جرم و مساحت سطح) باید توسط ارزیاب مورد توجه قرار گیرند. در مطالعات محیطی نیز توجه به غلظت محیطی، میزان مواجهه و دُز استفاده شده باید در نظر گرفته شود. آزمونی که در آنها تراکم پایداری پخش‌کنندگی ذرات کوتاه‌تر از طول زمان آزمون است نیز باید مورد توجه خاصی قرار گیرد تا بتوان تدابیر تجویز دُز جایگزین را اتخاذ نمود.

هنگام آماده‌سازی پروتکل جامع و دقیق شناسایی مخاطرات و یافتن گستره آن بر اساس ماهیت آنها، آزمون غربالگری مورد استفاده قرار می‌گیرد و لازم است به کاربران نیز یادآوری شود که سطوح دُز (غلظت محیطی و سطوح مواجهه) که برای ارزیابی خطر استفاده می‌شود احتمالاً با آنهایی که برای شناسایی مخاطرات به کار گرفته می‌شوند، متفاوت هستند.

۴-۵ ارتباط بین این استاندارد و استاندارد ISO/TR 16196: گردآوری و شرح آماده‌سازی نمونه و روش‌های تجویز دُز برای نانومواد ساخته شده

این استاندارد در هماهنگی با نسخه مشابه استاندارد ISO/TR 16196 تدوین شده است [20]. استاندارد ISO/TR 16196 به نقد و بررسی روش‌های استفاده شده در آماده‌سازی نمونه‌ها در محیط‌های مختلف برای پژوهش‌های توکسیکولوژیک پرداخته، همچنین به آزمون‌های دُز سنجی^۵ مربوط به استانداردهای دُز با توجه به روش‌های مختلف می‌پردازد. این استاندارد نیز با گذر از مباحث آماده‌سازی نمونه‌ها و استاندارد دُز مربوطه برای آزمون توکسیکولوژیک با توجه به مسیرهای مختلف، به انجام آزمون‌های غربالگری پرداخته و مکمل استاندارد ISO/TR 16196 می‌باشد. بنابراین در هنگام استفاده از

1- Lung Burden
2- Keratinocytes
3- Dispersing
4- Ultrasonication
5- Dose Metrics

این استاندارد، استاندارد ISO/TR 16196 نیز مورد توجه قرار گیرد، زیرا نداشتن اطلاع از این موارد آماده‌سازی نمونه‌ها، فرآیند انجام آزمون‌های غربالگری با مشکل مواجهه خواهد شد و مانع از انجام یک ارزیابی توکسیکولوژیک مناسب بر روی نانومواد می‌شود.

۵-۵ ارتباط بین استاندارد ارائه شده با استاندارد ISO/TR 13014، فناوری‌های نانو- رهنمودهایی در مورد مشخصات فیزیکی-شیمیایی نانومواد مهندسی شده برای ارزیابی توکسیکولوژیک

استاندارد ISO/TR13014 به بحث در مورد اهمیت مشخصه یابی^۱ نانومواد در زمان انجام آزمون‌های توکسیکولوژیک پرداخته و فهرستی از پارامترهای مهم برای اندازه‌گیری آنها با توجه به اطلاعات فعلی و رابطه پارامتر نانومواد با نتایج زیان‌آور بالقوه را فراهم می‌سازد [3].

استاندارد ISO/TR 13014 مشخصه یابی دقیق^۲ نانومواد برای درک و تفسیر بهتر از نتایج آزمون توکسیکولوژیک را امری ضروری دانسته و آن را اکیداً توصیه می‌نماید. بنابراین، این مواد زمینه بسیار خوبی برای این استاندارد است.

۶-۵ مروری بر دیگر فعالیت‌های بین‌المللی و اسناد منتشر شده مرتبط

تلاش‌های دیگر برای استاندارد کردن آزمون‌های توکسیکولوژیک نانو^۳ هدایت شده توسط سازمان‌های بین‌المللی OECD و ASTM و چند موسسه ملی اندازه‌شناسی^۴ انجام شده است [21]. تیم کاری OECD در مورد نانومواد تولید شده (WPMN)^۵ در سال ۲۰۰۶ کار خود را آغاز نمود و تا سال ۲۰۱۱ متشکل از ۹ تیم راهبردی (SG)^۶ بوده است (جدول ۱).

جدول ۱- گروه راهبردی کار گروه نانومواد ساخته شده سازمان توسعه و همکاری اقتصادی (OECD)

عنوان گروه راهبردی	گروه راهبردی
پایگاه داده‌های OECD در نانومواد تولید شده برای آگاهی و آنالیز فعالیت‌های تحقیقات EHS ^۷	SG1/SG2
آزمون‌های ایمنی نمایانگر یک مجموعه از نانومواد تولید شده	SG3
نانومواد ساخته شده و راهنمای‌های آزمون	SG4
همکاری در برنامه‌های تنظیم مقررات و طرح‌های داوطلبانه	SG5
همکاری در ارزیابی ریسک	SG6
نقش روش‌های جایگزین در نانو توکسیکولوژیک	SG7
اندازه‌گیری مواجهه و کاهش مواجهه	SG8
استفاده از نانومواد پایدار ساخته شده برای حفظ زیست‌محیطی	SG9

گروه WPMN SG4 یک بررسی جامع از راهنمایی‌های آزمون برای کاربرد نانومواد ساخته شده انجام داده است که توسط OECD منتشر شده است. داده‌ها نشان می‌دهند که روش‌های موجود در OECD عموماً برای شناسایی اثرات نانومواد

1- Characterization
 2- Rigorous
 3- Nanotoxicity
 4- National Metrology Institutes
 5- Working Party on Manufactured Nanomaterials
 6- Steering Groups
 7- Environment, Health and Safety

ساخته شده مفید می‌باشند. این راهنما بر اهمیت آماده‌سازی مواد و میزان دُز مصرفی در انجام آزمون‌های ایمنی و ارزیابی ریسک احتمالی صحه گذاشته و ارزیابی ریسک احتمالی نیز در سال ۲۰۱۲ منتشر گردید [22]. در سال ۲۰۱۱ مسائل ایمنی غذای اروپا^۱ یک راهنما برای ارزیابی ریسک احتمالی نانومواد مهندسی شده و کاربردهای نانومواد مهندسی شده در مواد غذایی انسانی^۲ و دامی^۳ منتشر کرده است (به جدول ۲ مراجعه شود).

جدول ۲- فهرست استانداردهای ASTM E 56 منتشر شده مربوط به آزمون توکسیکولوژیک

شماره مرجع	عنوان
E2524-08	استاندارد روش آزمون آنالیز خواص همولیتیک نانو ذرات
E2525-08	استاندارد روش آزمون ارزیابی اثر نانو ذرات در تشکیل کلونی‌های ماکروفاژ گرانولوسیت موشی
E2526-08	روش آزمون استاندارد برای ارزیابی اثرات سمیت نانو ذرات در سلول‌های کلیه و سلول‌های کبدی انسان و حیوانی

۶ روش‌هایی برای غربالگری توکسیکولوژیک مربوط به سلامت انسان ۱-۶ کلیات

روش‌های آزمایشگاهی در آزمون برون‌تنی شامل ارزیابی‌های سلولی یا غیرسلولی (بدون سلول) می‌باشد. در روش‌های بدون سلول برای اثرات غیراختصاصی، از نانومواد همانند تداخل با پروتئین‌های موجود در محیط کشت سلول، پلازما یا تشکیل رادیکال‌های آزاد ساخته شده، استفاده می‌شود.

ارزیابی‌های سلولی برای بررسی ظرفیت نانومواد در ایجاد تداخل در فرآیندهای زیستی که در حفظ هموستاز^۴ سلولی به کار می‌رود. این فرآیندها شامل میزان بقای سلولی، تکثیر یا ازدیاد، رونویسی DNA و تقسیم سلولی می‌باشند. در آزمون آزمایشگاهی برون‌تنی از روش‌های غربالگری موثر در تشخیص اثرات سمیت نانومواد مانند آسیب DNA و جهش زایی^۵، مرگ برنامه ریزی شده سلول^۶ و یا نکروز^۷ استفاده می‌شود. هرچند، در آزمون برون‌تنی، با وجود منحصر به فرد بودن بودن روش و نتیجه‌گیری آزمون‌ها، اندازه‌گیری اثرات در حد و اندازه آزمون‌های درون‌تنی نیستند. آزمون‌های برون‌تنی می‌تواند به‌طور بالقوه در پیش‌بینی تاثیرات احتمالی درون‌تنی (به عنوان مثال عملکرد یک عضو خاص، یا مسیر خاص بافت و یا فرآیندها) موثر باشد. روش‌های غربالگری می‌تواند به‌عنوان اولین آزمون در شناسایی ریسک و اولویت بندی نانومواد که احتیاج به آزمون‌های بیشتر دارند، به کار رود [23]. همچنین روش‌های غربالگری جایگزین نیز می‌توانند به یک آزمون چند مرحله‌ای تبدیل شوند. در یک رویکرد آزمون مرحله‌ای، روش‌های غربالگری را می‌توان به عنوان اولین مرحله شناسایی مخاطرات و اولویت بندی نانومواد استفاده کرد، که در این صورت انجام آزمون‌ها و صحنه‌گذاری‌های بیشتر از طریق سنجش انطباقی و در صورت لزوم و در چارچوب مقررات غربالگری انجام می‌شود. این روش‌ها کاربرد گسترده همانند

1- European Food Safety Authority (EFSA)

2 -Food

3 -Feed

4- Homoeostasis

5- Mutagenicity

6- Apoptosis

7 - Necrosis

ژنومیکس^۱، پروتئومیکس^۲ و متابولومیکس^۳ دارند که قادر به فراهم ساختن اطلاعات لازم در مورد تمام فرآیندهای زیستی است و می‌توانند در پاسخ مواجهه نانومواد در یک آزمون تجربی روی نمونه داده شده تاثیرگذار باشند. برای ممانعت از رسیدن به نتایج مثبت یا منفی کاذب، توصیه می‌شود آزمون‌های غربالگری متعدد انجام شود.

۶-۲ کنترل‌های مثبت و منفی در آزمون‌های سمیت نانومواد

برای اعتبارسنجی^۴ آزمایش‌های غربالگری کنترل‌های منفی و مثبت توصیه می‌شود. معمولاً از کنترل مثبت برای تأیید صحت نتایج آزمایش‌ها استفاده می‌شود. یک کنترل مثبت با آگاهی از آزمایش‌های قبلی برای القاء پاسخ سوء در مواجهه با این نوع آزمایش کاربرد دارد. به عبارت دیگر، ارتباط کنترل مثبت با نانومواد در صورتی امکان‌پذیر است که کنترل مثبت دارای خصوصیات فیزیکی شیمیایی مشترک با نانومواد باشد، به عنوان مثال: اکسید فلزات، فلزات، پلیمر و غیره. سمیت نانومواد ناشناخته است، ولی با معیار^۵ یک ماده شناخته شده با مکانیسم زیستی مشابه می‌توان سمیت آن را مشخص نمود، به هر حال گستره^۶ دُز مصرفی یک کنترل مثبت، منعکس کننده شرایط واقعی مواجهه^۷ می‌باشد.

سیلیس متبلور (نانو یوسیل)^۸ به عنوان کنترل مثبت در توکسیکولوژیک ذره در مطالعات نمونه برداری داخل نای^۹ استفاده می‌شود. سیلیس متبلور قادر است پاسخ‌های التهابی درون تنی را تحریک کند. همچنین از الیاف آزبست نیز می‌توان برای کنترل مثبت توکسیکولوژیک الیاف در آزمون درون تنی و برون تنی استفاده کرد. در مرحله طراحی استاندارد آزمون‌های غربالگری، کنترل‌های مثبت مناسبی را برای ذره و فیبرها به کاربران توصیه می‌کنند.

از سوی دیگر، کنترل منفی، اثر کم اهمیت و بسیار جزئی داشته و در ارتباط با مقدار سمیت زمینه محسوب می‌شود. اگر پس از مواجهه با کنترل منفی اثر مثبتی از آن مشاهده شد، نشان دهنده اثر فاکتورهای دیگر می‌باشد و نتایج بدست آمده از آن آزمون باید حذف شود.

پروتکل‌های غربالگری اجرایی شده^{۱۰} توکسیکولوژیک برای مواد شیمیایی و یا مواد ذره‌ای در مقیاس بزرگتر توسعه یافته است، بنابراین ارزیابی متداول غربالگری سمیت نانو بیشتر روی مواد شیمیایی و ذرات بزرگ به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته می‌شود. این انتظار وجود دارد که کنترل‌های اساسی آزمون اختصاصی توکسیکولوژیک نانو ذره پیشرفته به تدریج جایگزین آزمون قدیمی شده است. تنها با اولویت ارجاع انواع نانو ذرات دیگر، می‌توان ایجاد یک ساختار اندازه‌گیری سمیت نانو را تسهیل نمود. پیش از این، ساده کردن مراحل غربالگری تعیین شده، که سبب کاهش نتایج نهایی متناقض در میان آزمایشگاه‌های مختلف شده است [24].

یادآوری - باتوجه به تعداد محدود نانومواد مرجع^{۱۱} تولید شده، بعضی از کشورها نانومواد که مشخصه‌های آنها شناخته شده و قابل تایید است را جایگزین مواد مرجع در تحقیقات قرار داده‌اند.

- 1- Genomics
- 2- Proteomics
- 3- Metabolomics
- 4- Validate
- 5- Benchmarked
- 6- Range
- 7- Real World
- 8- Nanousil
- 9- Intratracheal Instillation
- 10- Established
- 11- Reference Materials

اولین مرحله در ساخت یک مجموعه غربالگری در آزمون برون تنی، شناسایی و ارزیابی مربوطه به آن است. به‌طور کلی توصیه می‌شود در سنجش و آزمون برون تنی نانومواد، کنترل‌های مثبت و منفی با الگوی مناسب در نظر گرفته شوند تا انجام آزمون‌ها را تضمین کنند. کنترل‌های مثبت و منفی به‌صورت ایده‌آل باید مرتبط با نانوذرات با یک مخاطره انسانی مربوط به نانوذرات (یا بدون ارتباط به صورت کنترل منفی) باشند، که اساس مکانیستیک آن با سنجش ارزیابی شود. در مواردی که کنترل‌های نانوذره تعیین نشده، استفاده از کنترل‌های مولکول‌های کوچک مناسب است. ارزیابی‌ها همچنین شامل روش‌های شناسایی تداخل نانوذرات که در آن نمونه‌های متعددی از طیف تداخل نانو ذرات، کاتالیتیک یا خاصیت جذبی واکنشگر^۱ وجود دارد [27][26][25]. همچنین، استفاده از آزمون‌های متعدد برای اندازه‌گیری مکانسیم‌های مشابه، شناسایی دقیق نتایج کنترل‌های مثبت و منفی کاذب جنبه احتیاطی دارد.

به‌طور مطلوب، در آزمون‌های برون تنی، غربالگری مخاطرات نانومواد، نتایج مخاطرات واقعی انسانی، به‌جز اثرات موضعی شامل کنترل مثبت مناسب نانومواد معتبر و پیش‌بینی می‌شود. آزمون‌های برون تنی مناسب برای اهداف غربالگری و احتمالی از مواد مثبت و بیشترین ارزیابی‌های زیستی^۲، وابسته به پیش‌بینی‌ها می‌باشد. خوشبختانه داده‌های اخیر حاکی از آن است که تلفیق واکنش‌های استرس اکسیداتیو در آزمون برون تنی با اندازه‌گیری سطح ویژه تغییرات نگه دارنده مواد در التهاب‌های ریوی حاد نیاز به پیش‌بینی دقیق دارد [28]. نتایج ارزیابی‌های متعدد برون تنی در پیش‌بینی پاسخ‌های انسانی بوده و پژوهشگران تشویق می‌شوند از طراحی آسان آزمون برون تنی و پیش‌بینی اثر بر سلامت انسان استفاده کنند (و در آینده توسعه دهند) [29] تا [34].

به‌هرحال، در برخی موارد، مکانسیم‌های متفاوت مسئول سمیت مشاهده شده هستند تا آنهایی که اندازه‌گیری شده‌اند، یا سنجش برون تنی خود دقیقاً این اهداف مکانیستیکی را اندازه‌گیری نمی‌کند. این مساله مشکل عمده‌ای را بر سر راه آزمون‌های غربالگری نانومواد برای ارزیابی مخاطرات آزمون‌های برون تنی ایجاد می‌کند. آزمون‌های متعدد مانند سمیت سلولی^۳ و سمیت ژنتیکی^۴ نیازمند نشان دادن دریافت^۵ نانوذرات در سلول می‌باشد، زیرا ممکن است به دلیل عدم مواجهه مواجهه با ارگان‌های هدف داخل سلولی باشد.

توکسیکولوژی نانومواد مهندسی شده همواره به‌عنوان یک علم بسیار جدید در مقایسه با توکسیکولوژی مولکولی است و حتی برای مولکول‌های کوچک، آزمون برون تنی هم قابلیت پیش‌بینی را دارد که شامل تمام مخاطرات بالقوه و غیرکافی چالش برانگیز است [35]. جداسازی سموم شناخته شده بر اساس طبقه‌بندی آنها می‌تواند مشکل شناسایی و ارزیابی مناسب را آسان تر کند. طبقه‌بندی‌های مولکول‌های کوچک سموم مانند مختل‌کننده‌های آندوکراین^۶، در ارتباط با اثرات سمیت تعریف شده، مکانسیم‌های عمل، ارتباط فعالیت - ساختار^۷ و از همه مهم‌تر آزمون‌های غربالگری، آزمون برون تنی اعتباردهی اعتباردهی شده است. این وضعیت به احتمال زیاد درباره توکسیکولوژی نانومواد نیز در آینده مطرح خواهد شد که با

1- Reagent

2 -Bioassays

3 - Cytotoxicity

4 - Genotoxicity

5- Uptake

6- Endocrine disrupters

7- Structure-activity-relationships

طبقه‌بندی‌های مختلف سموم نانومواد براساس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی با سمیت مشخص و مکانیزم‌های عملکرد بسیار آسان خواهد شد.

متأسفانه به‌عنوان یک علم، نانو‌توکسیکولوژی، هنوز به یک سطح گستردگی نرسیده است. همچنین در موارد متعددی، در نانومواد، پایه مکانیستیک سمیت‌های مولکول‌های کوچک ناشناخته است [35].

یادآوری - بعضی از کشورها برنامه‌های برای پیش‌بینی خطرات احتمالی نانومواد که هنوز مخاطرات آنها مشخص نشده است را تدوین نموده‌اند.

کشورها با استفاده از دسته‌بندی پروفایل فعالیت زیستی^۱ سموم شناخته شده بر روی نتایج آزمون برون‌تنی، سعی در شناسایی علایم و خطرات ترکیبات شیمیایی جدید دارند. دسته‌بندی تولید سموم نانومواد شناخته شده در مجموعه گسترده‌ای از سنجش‌های زیستی برای شناسایی و پیش‌بینی ترکیبات مخاطره‌آمیز احتمالی نانومواد ایده مناسبی است. التهاب ناشی از واسطه استرس اکسیداتیو^۲ یکی از نمونه‌های مکانیستیک بسیار خوب و تایید شده در توکسیکولوژیک نانوذره به‌شمار می‌رود [36][37]. به‌هر حال باید توجه کرد که این الگوی توسعه یافته تقریباً منحصربه‌فرد و توسط پژوهشگران مطرح شده که تنفس نانومواد وارد شده به ریه سبب سمیت ریوی می‌شود. برای اثرات سمیت بر روی دیگر اعضای بدن و یا نحوه مواجهه به جزء تنفس، مناسب نیست. این واقعیت موجب محدودیت استفاده از غربالگری استرس اکسیداتیو و ارزیابی آزمون التهابی تایید شده نانومواد برای خطرات محیطی، شغلی و موارد مواجهه تنفسی در تماس اولیه می‌شود.

به دلایل دیگری که مواجهه تنفس در مرحله اولیه دارای اهمیت نیست، مانند کاربرد زیست پزشکی^۳، این سنجش‌ها چندان مرتبط نیست. به‌طور مثال مجموعه‌های غربالگری ترکیب سنجش خون می‌تواند برای کاربردهای زیست پزشکی با استفاده سیستماتیک^۴ قابل انجام باشد [38].

همچنین آزمون‌های سمیت نوری جلدی^۵ برای نانوذراتی که به‌منظور کاربردی‌های موضعی استفاده می‌شوند، مانند لوسیون‌های ضدآفتاب، مناسب است. بنابراین، درک کلی ارزیابی انجام شده مانند مسیر موردنظر در مواجهه عضو هدف برای پژوهشگران و دیگر افرادی که از آزمون‌های برون‌تنی استفاده می‌کنند، ضروری است. در واقع، رشته توکسیکولوژی نانومواد، مستلزم انجام و صحت‌گذاری سنجش‌های مکانیستیک جدید است تا نه تنها پیش‌بینی سمیت و نحوه مواجهه خاص، بلکه شناسایی و طبقه‌بندی نانومواد نیز امکانپذیر شود.

۲-۳-۶ روش‌های غربالگری سمیت سلولی

آزمون سمیت سلولی یکی از اساسی‌ترین روش‌های رایج در آزمون برون‌تنی است و وقتی که از رده‌های سلولی یا سلول‌های مناسب استفاده می‌شود، مانند مواجهه با دُز بالا در آزمون درون‌تنی است. معمولاً ارزیابی سمیت سلولی توسط پنجاه درصد غلظت کشنده (LC50)^۶ یا پنجاه درصد غلظت موثر (EC50)^۷ پس از ۲۴ ساعت مواجهه با مواد انجام

1- Bioactivity profiling

2- Oxidative Stress Mediated Inflammation

3- Biomedical

4 - Systemic

5- Phototoxicity Testing

6- Lethal concentration

7- Effective concentration

می‌شود. از آنجایی که سمیت سلولی اغلب در حضور سرم جنین گاوی^۱ یا در مرحله تکثیر سلولی رخ می‌دهد، Ec50 مناسب‌تر از Lc50 می‌باشد، زیرا در طی ۲۴ ساعت تعداد سلول‌ها افزایش می‌یابد.

روش‌های ارزیابی متداول که برای سنجش سمیت سلولی مواد شیمیایی استفاده می‌شود، برای ارزیابی سمیت سلولی نانومواد نیز کاربرد دارد. متداول‌ترین روش سنجش سمیت سلولی روش ۳- (۵ و ۴ دی متیل ۲- تیوزول) - ۵ و ۲ دی فنیل ۲ تترازولیوم (MTT) یا روش تغییر یافته (MTT) می‌باشد. علاوه بر روش MTT، به‌طور معمول روش آلامار بلو^۲، آزاد شدن لاکتات دهیدروژناز^۳، و شمارش تعداد سلول با استفاده از میزان جذب رنگ تریپان بلو توسط سلول نیز انجام می‌شود. وجود نانومواد غیرشفاف در نمونه‌های اندازه‌گیری ممکن است در ارزیابی رنگ سنجی^۴ و شاخص فلورومتريک^۵ و سنجش سمیت سلولی اختلال ایجاد کند. محلول شناور در سطح محلول^۶ سنجش را می‌توان با احتیاط به لوله آزمایشگاهی شفاف دیگری منتقل کرد تا این اختلال برطرف شود. هرچند توانایی نانوذره موردآزمون در جذب محصول نهایی آزمون و یا امکان تداخل در جذب نورهای فلوروسنت یا فرابنفش باید موردبررسی بیشتری قرارگیرد. اگر چنین تداخلات یا جذب نوری مورد تأیید قرار گیرد، نتایج به‌دست آمده از آزمون نانومواد قابل اطمینان نیست. برای جلوگیری از پیش‌آمدن چنین مواردی در سنجش، کنترل‌های مناسبی مورد نیاز است.

زمانی که نانومواد آب‌گریز^۷ مورد سنجش سمیت سلولی قرار می‌گیرند، قابلیت پراکنده‌سازی مواد یکی از عوامل عمده تعیین‌کننده آزمون به‌شمار می‌رود، زیرا مواد کلوخه آب‌گریز توان رسیدن به سلول‌های تک لایه و چسبیده به آن را ندارند. توصیه می‌شود به این نکته توجه شود که قطبیت از پتانسیل زتا^۸، یکی از مهمترین خصوصیات شناخته‌شده ذرات است که تعیین‌کننده جذب سلولی است و توسط افزودنی‌ها و/یا پوشش دهنده‌ها ممکن است تغییر کند [39]. بنابراین، مناسب است که میزان جذب نانومواد توسط سلول‌ها پیش از اندازه‌گیری میزان سمیت سلولی نانومواد، اندازه‌گیری شود [40].

۳-۳-۶ روش‌های غربالگری پاسخ‌های التهابی و ایمنی

ارزیابی ایمنوتوکسیسیته^۹ نانومواد ممکن است در آزمون‌های دارویی^{۱۰} و شیمیایی سیستم ایمنی با چالش‌های مختلفی روبرو شود. ممکن است خصوصیات فیزیکی شیمیایی نانومواد با مواد غیر نانومقیاس متفاوت باشد. خصوصیات فیزیکی شیمیایی که منشاء آنها از نانومقیاس باشد، ممکن است در ارزیابی اثرات ایمنوتوکسیسیته نانومواد موضوع مهمی باشد. اندازه و میزان توزیع ذره در رابطه با مساحت سطح به‌عنوان پارامتری مهم در ارزیابی بخش‌های محیط، سلامت و ایمنی نانومواد شناخته شده‌اند. اخیراً مشخصات اندازه یک ماده با توجه به سمیت آن در رابطه با مساحت سطح مورد بحث و بررسی قرار گرفته است [42][41]. واکنش‌های شیمیایی بر روی مساحت سطح اتفاق می‌افتد، بنابراین می‌توان انتظار داشت که یک ماده با یک مساحت سطح وسیع می‌تواند واکنش‌های بیشتری نسبت به همان ماده با سطح کوچک‌تر از خود نشان دهد. همچنین ممکن است انبوهه/کلوخه بر هضم ذره توسط ماکروفاژهای^{۱۱} کیسه‌های هوایی^۱ اثر بگذارد.

- 1- Fetal Bovine Serum
- 2- Alamar Blue
- 3- LDH Release
- 4- Colourimetric
- 5- Fluorometric
- 6- Supernatant
- 7- Hydrophobic
- 8- Zeta Potential
- 9- Immunotoxicity
- 10 -Pharmaceutical
- 11 -Macrophages

ذرات تنفسی بعد از وارد شدن در ریه معمولاً توسط ماکروفاژها شناسایی و پاکسازی می‌شود. بعضی از تحقیقات نشان می‌دهد که ماکروفاژها انبوهه یا کلوخه را نسبت به ذرات پراکنده در نانومقیاس راحت‌تر شناسایی و پاکسازی می‌کنند. اثرات شکل روی سمیت نانومواد نیز امری است که هنوز به خوبی مورد بررسی قرار نگرفته است، اما مطالعات حیوانی اخیر نشان داده است که نانوالیاف با نسبت منظر بالا (HARN) واکنشی مشابه پاسخ آزیست از خود نشان داده است [43]. در سال ۲۰۰۷ فهرست جامعی از روش‌های مربوط با ارزیابی ایمنوتوکسیسیته در مدل‌های حیوانی منتشر شده است [44]. برای حساسیت پوستی (نوع حساسیت تاخیری)^۲، سه روش ارزیابی در آزمون درون تنی به‌طور متداول قابل دسترس است: آزمون پیشینه خوکچه هندی^۳ (GPMT)، برای غربالگری مواد حساسیت‌زا در پوست انسان، آزمون بولر^۴ (BT). آزمون غربالگری برای موادی که باعث ایجاد حساسیت پوستی انسان و ارزیابی غدد لنفاوی (LLNA)^۵، مدلی برای ارزیابی پتانسیل حساسیت پوستی نسبت به مواد شیمیایی می‌باشد [45]. دو روش ارزیابی اخیر وابسته به میزان جذب پوستی ماده مورد نظر پیش از وقوع حساسیت پوستی است. هرچند نفوذ نانومواد به پوست معمولاً خیلی کم بوده یا اصلاً اتفاق نمی‌افتد [46] تا [49]. اخیراً، برای مواد شیمیایی، آزمون‌های پیشرفته جایگزین برون تنی برای آزمون‌های حساسیت پوستی در حال توسعه و تکوین است. کاربرد این روش‌ها برای نانومواد هنوز ناشناخته است.

هم اکنون مجموعه‌ای از روش‌های مناسب و استاندارد و تعریف‌شده برای سنجش اثرات ایمنوتوکسیسیته با ساختار پودمان سیستم ایمنی بدن در آزمون برون تنی انجام می‌شود. این سیستم دارای مجموعه‌ای اختصاصی از سلول‌های با منشأ انسانی، کشت داده شده در آزمون برون تن و ارزیابی شبیه‌سازی سیستم ایمنی بدن انسان می‌باشد (به جدول ۳ مراجعه شود).

ایمنوتوکسیسیته، متشکل از بخش‌های کوچک شامل معادل بافت محیطی PTE، پودمان معادل بافت لنفاوی LTE همچنین ارزیابی سایر مدل‌های بیماری و سنجش کارکردی می‌باشد. معادل بافت محیطی PTE مشابه پاسخ‌های ایمنی ذاتی و سازگار یافته در بافت‌های پیرامونی مانند پوست، ریه‌ها و دیگر بافت‌های مخاطی، فعالیت می‌کند. همچنین PTE، قادر به پیش‌بینی تقویت یا اثر واکنش، سمیت و پتانسیل تحریکات سیستم ایمنی از ترکیبات گوناگون شیمیایی و زیستی می‌باشد. مدل‌های اختصاصی برای مواجهه زیر پوستی، داخل عضله‌ای، داخل وریدی و بافت‌های مخاطی وجود دارند. پودمان LTE با استفاده از شبیه‌سازی انواع سلول‌های غدد لنفاوی و سلول‌های دندرتیک موجب تولید سلول‌های T و B فعال شده و این سلول‌ها سبب تولید فرآیند آنتی‌بادی می‌شوند. پودمان LTE قادر به تولید سلول‌های T فعال، آنتی‌بادی و سایتوکاین‌ها می‌شود که نسبت به سنجش سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، بهتر عمل می‌کند. این فناوری نه تنها به نانومواد بلکه به داروها و مواد شیمیایی سنتی نیز مرتبط است.

اگرچه این آزمون بیشتر مناسب آزمون‌های فرآورده‌های دارویی بوده و مختص نانومواد نیست، اما یک راهنمای شناخته شده و کاملاً پذیرفته شده بین المللی در مطالعات ایمنوتوکسیسیته، راهنمای کنفرانس بین المللی یکسان‌سازی سه‌جانبه^۶ است [50]. هدف آن تامین موارد زیر است:

الف- توصیه‌هایی در مورد رویکردهای آزمون غیربالینی برای شناسایی ترکیبات سمی بر روی سیستم‌ایمنی؛

1 - Alveolar

2 - Delayed Type Hypersensitivity

3 - Guinea-Pig Maximization Test

4 - Beuhler Test

5 - Local Lymph Node Assay

6 - International Conference on Harmonization harmonized Tripartite Guideline

ب- راهنمایی در مورد رویکرد تصمیم‌گیری براساس میزان شواهد و اثرات در آزمون ایمنوتوکسیسیته. براساس این استاندارد، ایمنوتوکسیسیته، به‌عنوان سرکوب‌کننده سیستم‌ایمنی^۱ ناخواسته و تشدیدکننده تعریف می‌شود. حساسیت بیش‌ازحد القاء شده توسط دارو و دفاع خودبخودی سیستم ایمنی، از این موضوع مستثنی است. اصول کلی شامل موارد ذیل است:

الف- توصیه می‌شود تمام مواد دارویی جدید انسانی از نظر پتانسیل القاء سیستم ایمنی مورد ارزشیابی قرار گیرند.

ب- روش‌های شامل مطالعات استاندارد سمیت STS و سایر مطالعات دیگر ایمنوتوکسیسیته مناسب است. این موضوع که آیا انجام مطالعات بیشتر در مورد ایمنوتوکسیسیته مناسب است یا خیر به بررسی‌های مبتنی بر شواهد بستگی دارد. توصیه می‌شود داده‌های مطالعات استاندارد سمیت برای علائم بالقوه سیستم ایمنی ارزشیابی شوند. علائمی که باید در نظر گرفته شود به شرح زیر است:

الف- تغییرات هماتولوژی^۲ (مانند لکوسیتوپنومیا^۳، الکوسیتوز^۴، گرانولوسیتوپنیا^۵، اگرانولوسیتوزیس^۶، لنفوپنیا^۷، لنفوسیتوز^۸؛ لنفوسیتوز^۹)؛

ب- تغییرات در میزان وزن عضو سیستم ایمنی و/ یا بافت‌شناسی (مانند تغییرات غده تیموس، طحال، غدد لنفاوی و یا مغز استخوان)؛

پ- تغییراتی که در گلوبولین سرم بدون تفسیر محتمل رخ می‌دهد، به‌طور مثال اثرات روی بافت کبد یا کلیه که می‌تواند نشان‌دهنده وجود تغییرات در ایمنوگلوبولین سرم باشد؛
ت- افزایش شیوع عفونت‌ها؛

ث- وقوع افزایش تومورها به‌عنوان یکی از نشانه‌های سرکوب سیستم ایمنی ناشی از سایر عوامل مانند سمیت ژنتیکی، اثرات هورمونی یا القای آنزیم‌های کبدی.

اگر شرایط سیستماتیک فراهم باشد، نانوذرات در عضوهایی مانند کبد و طحال که سیستم‌های شبیه رتیکولوآندوتلیال^۹ و غنی از سلول‌های بیگانه خوار^{۱۰} هستند، جمع می‌شوند. چسبیدن پروتئین‌های سرم و تشکیل پروتئین کرونا^{۱۱} برای بالا بردن توانایی شناسایی و جذب سلول‌های شبکه رتیکولوآندوتلیال توصیه می‌شود [51] تا [53].

مواجهه با ذرات کوچک، پاسخ‌های سیستم ایمنی در خون القاء می‌کند [54]. این اثرات ایجاد شده در خون شامل تمام ذرات کوچک نمی‌شود و احتمالاً انعکاسی از خاصیت سطحی ذره می‌باشد [55][56]. علاوه بر آن، همین پاسخ‌های سیستم ایمنی نیز که بر اثر استنشاق نانومواد به‌وجود می‌آیند، ممکن است موجب سرکوب سیستم ایمنی یا تحریک سیستم ایمنی شود و مانند مورد قبلی شامل تمام ذرات کوچک نمی‌شود و شاید انعکاسی از شیمی سطح ذره باشد.

ارزیابی پاسخ‌های سیستم ایمنی بدن انسان بر روی سیستم‌های مدل، امری دشوار است، زیرا شبیه‌سازی محیط هورمونی بدن آسان نیست. به‌رحال ریپان و همکاران [57] نشان دادند که فولرن‌ها^۱ سرکوب‌کننده پاسخ ایمنی هستند، زمانی که

- 1- Immunosuppression
- 2- Haematological
- 3- leukocytopenia
- 4- leukocytosis
- 5- Granulocytopenia
- 6- Granulocytosis
- 7- Lymphopenia
- 8- Lymphocytosis
- 9- Reticuloendothelial System
- 10- Phagocytizing
- 11- Corona

در مواجهه با ماست سل‌ها^۲ یا بازوفیل‌های خون محیطی قرار می‌گیرند. همچنین، در مدل اولیه موشی با IgE، فولرن‌ها مهار کننده آنافلاکسی^۳ می‌باشند [58]. شوهر و همکاران مطالعاتی در مورد آزاد شدن سائیتوکاین‌ها از ماکروفاژهای صفاقی در مواجهه با چربی‌های جامد ناشی از نانومواد نشان دادند. هرچند این ذرات بیانگر همان ذرات مشابه محیطی نیستند، زیرا آنها بطور معمول ذرات شفاف با ۲۰۰ نانومتر قطر و غیرمحلول هستند ولی با این حال این روش همچنان ارزشمند است. این محققین در بررسی خود، ماکروفاژهای صفاقی جدا شده را در مواجهه با نانومواد قرار دادند، بعد از مواجهه در طول ۳ ساعت، ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، سطح آزاد شدن IL-6, IL-12, IL-10 و TNF- α در محیط شناور سطحی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که چربی‌های جامد نانومواد، ترشح سائیتوکاین خارج از سمیت سلولی از خود بروز نمی‌دهند. برای درک ارزش طراحی این مطالعه، اعتبارسنجی با سایر نانومواد مورد نیاز است.

مشابه ارزیابی ریسک توکسیکولوژیک در سیستم‌های اعضای دیگر، ارزیابی تاثیرات سیستم ایمنی نیز مشمول موارد زیر است:

- اهمیت زیستی و آماری تغییرات؛
- شدت اثرات؛
- ارتباط مواجهه/ دُز؛
- فاکتور ایمنی بالاتراز دُز بالینی موردانتظار؛
- طول مدت درمان؛
- تعداد گونه‌ها و اثرات نقطه پایانی؛
- امکان وقوع تغییرات در مرحله بعدی به سایرین؛
- هدف‌های سلولی احتمالی و یا مکانیسم‌های فعالیت؛
- دُزهایی که سبب این تغییرات می‌شود در ارتباط با دُزهایی که سمیت‌های دیگری تولید می‌کند؛
- برگشت‌پذیری اثر (اثرات).

جدول ۳- مطالعات سمیت سیستم ایمنی بدن

پارامتر	اجزاء خاص
پاسخ آنتی‌بادی وابسته سلول T	با استفاده از یک آنتی‌ژن وابسته به سلول T شناخته شده (به عنوان مثال، گلبول قرمز گوسفند (SRBC) یا هموسیائین صدف کوهی [KLH]) که منجر به پاسخ افزایش ناگهانی آنتی‌بادی می‌شود.
ایمونوفنوتیپ ^۱	شناسایی و/ یا شمارش زیرمجموعه لکوسیت با استفاده از آنتی‌بادی با آنالیز فلوسایتومتری به وسیله ایمونوهیستوشیمی
سنجش‌های فعالیت سلول کشنده طبیعی ^۲	انجام پژوهش‌های ایمونوفنوتیپ نشان داد تغییری در تعداد، و یا مطالعات استاندارد سمیت نشان داد سرعت عفونت ویروسی و یا پاسخ به فاکتورهای دیگر
مطالعات مقاومت میزبانی	مستلزم گروه‌های مواجهه ^۳ از موش‌ها یا موش تحت درمان با دُزهای مختلف از ترکیب آزمون با غلظت‌های مختلف از یک پاتوژن باکتریایی، قارچی، ویروسی و انگلی (و یا سلول‌های تومور)
سنجش و عملکرد	ارزیابی عملکرد سلول‌های ماکروفاژها/نوتروفیل در مواجهه با ترکیب آزمایش در آزمون برون‌تنی و درون‌تنی،

1- Fullerenes
2- Mast Cells
3- Anaphylaxis

ماکروفاژ نوروفیل	و /یا به دست آمده از حیوانات درمان شده با ترکیب مورد آزمون (ex vivo assay)
1- Immunophenotyping 2- Natural Killer 3- Challenging	

۴-۳-۶ روش های غربالگری پاسخ های استرس (شامل اکسیداتیو و تولید پروتئین) ۱-۴-۳-۶ کلیات

نقش استرس اکسیداتیو در محدوده سمیت نانومواد و مسیرهای درگیر در پاسخ استرس اکسیداتیو سلولی قبلا مورد بررسی قرار گرفته است [60][59][36]. گونه های فعال اکسیژن (ROS)^۱ حاصل فعالیت های طبیعی سلولی است که توسط آنتی اکسیدان سلولی می توانند بی اثر شوند. استرس اکسیداتیو زمانی رخ می دهد که تشکیل ROS بیشتر از ظرفیت سیستم دفاع طبیعی سلول باشد. پاسخ سلولی در طی استرس اکسیداتیو، شامل تولید القاء تعدادی از سیگنال های حساس به فرآیندهای اکسایش و کاهش^۲ مطابق با مدل های سه مرحله ای پیشنهاد شده است که در ذیل به آنها می شود [59]. هنگامی که سطح استرس اکسیداتیو پایین است، پاسخ محافظتی مرحله یک موجب تولید آنتی اکسیدان هایی مانند /یزوآنزیم های گلوکوتاتیون /اس ترانسفراز می شود تا هموستاز یا ثبات فرآیند اکسایش و کاهش را مجددا برقرار کند. افزایش بیشتر در تشکیل ROS و یا ناتوانی در پاسخ اولیه آنتی اکسیدان می تواند موجب بروز التهاب^۳ (مرحله دو) و در نهایت اثرات سمیت بر سلول ها (مرحله سه) شود. القاء استرس اکسیداتیو و التهاب های به وجود آمده در پی آن می تواند یک دلیل منطقی برای سمیت نانومواد همچون ذرات بسیار ریز به شمار رود [60][59]. نانومواد می توانند از چند مسیر استرس اکسیداتیو القاء کنند. به طور مثال تولید رادیکال های $O_2^{\cdot -}$ و OH^{\cdot} می تواند به دلیل تشکیل جفت های الکترون به وسیله فعالیت نوری دی اکسیدتیتانیوم یا جهش یک الکترون از نوار هدایتی نیمه رسانای نانومواد باشد [61]. علاوه بر اینها، انحلال یون های فلزی آزاد شده از نانومواد و وجود فلزاتی واسطه مانند کبالت، مس، آهن، نیکل و کروم در سطح نانومواد می تواند موجب تولید رادیکال OH^{\cdot} از طریق واکنش فنتون شود. در نهایت، حتی نانومواد بی اثر نیز ممکن است از طریق قرار گرفتن در میتوکندری سبب مختل کردن عملکرد آن شده و تولید ROS را افزایش دهند [59]. بسیاری از پژوهش ها در مورد نانومواد در آزمون برون تنی معمولا بر روی ارزیابی اندازه گیری مارک های استرس اکسیداتیو و التهاب های رخ داده آمده معطوف می شود.

۲-۴-۳-۶ فعالیت غیرسلولی اکسایش و کاهش نانوذرات

فعالیت اکسایش و کاهش غیرسلولی نانوذرات با استفاده از سنجش DTT^۴ ارزیابی می شود [62]. سنجش DTT فعالیت اکسایش کاهش عمومی یک نمونه به وسیله اندازه گیری تحریک (به عنوان مثال نانوذرات) وابسته به اکسیداسیون DTT و یک دی تیول تعیین می شود. این روش سنجش براساس تولید ROS توسط مقدار مشخصی از DTT اندازه گیری می شود. در طول این واکنش، DTT مصرف شده و ۲ نیترو ۵ مرکاپتوبنزویک اسید ایجاد می شود که توسط دستگاه طیف سنج نوری^۵ قابل اندازه گیری است. پس از اتمام این مراحل، نانوذرات در مراحل متعدد در مجاورت محلول اسیدی

1- Reactive Oxygen Species
 2- Redox
 3- Proinflammatory
 4- Dithiothreitol Assay
 5- Spectrophotometer

تری کلرواستیک اسید، قرار می‌گیرد. پس از آن با بافر تری‌هیدروکلراید حاوی DTNB انکوبه شده و سپس میزان جذب آن را می‌توان با دستگاه طیف سنج نوری در طول موج 412 نانومتر اندازه‌گیری کرد.

انجام روش‌های پیشرفته‌تر مستلزم استفاده از طیف سنج رزونانس اسپین الکترون ESR همراه با روش به دام‌اندازی اسپین است [64][63]. این مراحل از مزایای بیشتری برخوردار است، زیرا موجب شناسایی گونه‌هایی از رادیکال‌های آزاد می‌شود که توسط نانوذرات به وجود آمده است. روش شناسایی تشکیل ROS بر اساس به دام انداختن رادیکال‌ها به وسیله دی‌متیل-1-پیرولین N-اکسید¹ انجام می‌شود. وجود طیف‌های ESR نیز پس از مجاورت نانو ذره بوسیله DPMO در حضور یا عدم حضور آب اکسیژنه گزارش شده است. تشخیص و مشخصه‌یابی کمی سیگنال‌های ROS به دام افتاده توسط DPMO با انجام اندازه‌گیری‌هایی که سطح قله² نامیده می‌شود، امکان‌پذیر است. داده‌هایی که در نتیجه این فرآیندها به دست می‌آید، سبب شناسایی نوع رادیکال و ROS تولید شده توسط نانوذرات و تعیین کمیت سطوح قله می‌شود، به عنوان مثال DPMO-OH³ در واحدهای اختیاری.

۳-۴-۳-۶ تولید ROS در سلول‌ها

۱-۳-۴-۳-۶ کلیات

تولید ROS ممکن است توسط سلول‌ها یا به عنوان محصول جانبی حاصل از فعالیت طبیعی سلول تولید شود، اما یک افزایش ROS در پاسخ به فاکتورهای استرس ممکن است بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بوده و سبب آسیب به سلول شود. به هر حال، همه رده‌های سلولی در مجاورت با نانومواد ROS تولید نمی‌کنند.

به طور کلی در مطالعات سمیت نانو دو روش ارزیابی اندازه‌گیری القاء استرس اکسیداتیو تولید ROS داخل سلولی و کاهش گلوتاتیون بیشتر از همه استفاده می‌شود. اندازه‌گیری ROS توسط ارزیابی فلورومتری بر اساس اکسیداسیون داخل سلولی دو و هفت‌دی‌کلروفلوروسین دی‌استات است، در حالی که در گلوتاتیون (GSH)³، عمدتاً اندازه‌گیری با سنجش‌هایی بر اساس تولید یک رنگ فلوروسنت یا پاسخ رنگ‌سنجی GSH انجام می‌شود. نتایج حاصل از ارزیابی، ارتباط قابل قبولی از GSH و ROS را نشان می‌دهد [68] تا [65].

۲-۳-۴-۳-۶ تعیین ROS

برای اندازه‌گیری ROS های تولید شده، می‌توان از دی‌استات غیرفلورسنت H₂DCF-DA⁴ استفاده کرد. گروه‌های استات بلافاصله پس از وارد شدن به سلول شکسته شده و ترکیب باقی‌مانده یعنی H₂DCF داخل سلول باقی می‌ماند تا توسط ROS به یک ترکیب فلورسنت DCF اکسایش شده تبدیل شود. پس از تکثیر سلول‌ها با نانوذرات، بافت کشت داده شده را جدا کرده و شستشو می‌دهیم. سلول‌ها در مجاورت ۱۰ میکرومول H₂DCF-DA تازه تهیه شده در PBS، به مدت ۴۵ دقیقه در آزمون کشت و دور از نور نگهداری می‌شود. پس از مجاورت، محیط کشت بافت برداشته می‌شود و بافت شستشو داده می‌شود. یک تقسیم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر PBS نیز به سلول‌های داخل بافت کشت داده شده افزوده شده و میزان فلورسنت را نیز می‌توان در برانگیختگی طول موج ۴۸۵ نانومتر و نشر طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری فلوروسنت اندازه‌گیری کرد. سلول‌های حامل مواد نیز نقش کنترل منفی یا حل شونده را بازی می‌کنند. برای کنترل

1 -Dimethyl-1-Pyrroline N-oxide (DPMO)

2 -Peak

3 -Glutathione

4 -Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (H₂DCF-DA)

مثبت، از سلول‌های ماکروفاژ که در معرض محیط کشت حاوی ۱۰ میلی‌گرم لیپوپولی‌ساکارید (LPS)^۱ و یا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فوربول میریستات استات^۲ هستند، استفاده می‌شود، در صورتی که نیاز به تمایز باشد، می‌توان این مقادیر را تغییر داد. فقط کنترل نانوذره باید در ارزیابی لحاظ شود تا از تداخل نانوذره تحت بررسی با رنگ فلورسنت جلوگیری به عمل آید. حضور مداخله کننده می‌تواند سبب ایجاد نتایج مثبت کاذب بشود.

۶-۳-۴-۳ اندازه‌گیری GSH

پیشنهاد شده است که فقدان GSH موجب تضعیف نقش دفاعی آنتی‌اکسیدان می‌شود، این امر موجب تولید ROS بیشتر در داخل سلول شده و سرانجام منجر به مرگ سلول می‌شود [66]. گلوٲاتینون در دو حالت کاهش (GSH) و اکسایش (GSSG) وجود دارد. در حالت کاهش، گروه تیول از سیستمین قادر به دادن یک معادل کاهش به مولکول‌های ناپایدار دیگر مانند ROS می‌باشد. با دادن یک الکترون، گلوٲاتینون فعال شده، اما بلافاصله یا یک گلوٲاتینون فعال دیگر پاسخ داده و گلوٲاتینون دی‌سولفاید (GSSG) ایجاد شود. در این مکانیسم، GSH فعالیت‌های همانند آنتی‌اکسیدان دارد و از سلول‌ها در برابر آسیب‌های گونه‌های رادیکال اکسیژن محافظت می‌کند. یک افزایش نسبت GSSG به GSH معمولاً نشان‌دهنده وجود استرس اکسیداتیو می‌باشد. مقدار GSH در سلول‌ها را با استفاده از کیت‌های موجود در بازار می‌توان مشخص کرد. مقدار GSH در سلول‌های لیز شده را می‌توان بر اساس یک عامل شیمیایی که به‌طور ویژه به GSH متصل می‌شود، تعیین کرد که در پی آن یک عکس‌العمل ثانویه پیچیده را به یک ترکیب رنگ سنجی تبدیل می‌کند که قابل اندازه‌گیری توسط دستگاه طیف‌سنج نوری است. همچنین، کیت‌های آنتی‌بادی قابل دسترسی نیز وجود دارند که از یک آنتی‌بادی ضد GSH خاص که اصطلاحاً /لازرا (ELISA)^۳ نامیده می‌شود برای اندازه‌گیری مقدار GSH استفاده می‌کنند. در کیت‌ها برای هر نوع از سنجش، نمونه‌ها برای آماده‌سازی منحنی‌های استاندارد مورد استفاده قرار می‌گیرند. تاکید می‌شود که تداخل نانوذرات آزمون‌شده با جذب واکنش نهایی محصول را باید مورد توجه و کنترل قرار داد.

۶-۳-۵ روش‌های غربالگری اجزاء خونی (شامل فاکتورهای ایجاد لخته خون یا همولیز)

۶-۳-۵-۱ کلیات

مطالعات تداخل ذرات با ترکیبات خونی در سه گروه کلی زیر طبقه‌بندی شده است:

- الف- بخشی بر روی اثرات سیستم قلبی-عروقی و خون به‌عنوان هدف متمرکز است؛
 - ب- بخشی که به مشاهده چگونگی تداخل خون و پروتئین‌های خونی با نانوآشیاء می‌پردازد؛
 - پ- بخشی که از اثرات زیستی روی خون همانند یک خاصیت شناساگر استفاده می‌کند.
- در اینجا به بررسی هر سه گروه می‌پردازیم.

۶-۳-۵-۲ اثر بر روی سیستم قلبی و عروقی یا خون

مواجهه تنفسی ذرات کوچک بر سیستم قلب و عروق اثر می‌گذارد و یک افزایش در ریسک حمله قلبی پس از مواجهه با ذرات پیرامونی^۴ مانند دود حاصل از آگزوز دیزل مشاهده شده است [69]. علاوه‌براین، مواجهه با ذرات بسیار ریز مانند

1- Lipopolysaccharide

2- Phorbol Myristate Acetate

3- Enzyme Linked Immuno Sorbant

4- Ambient

خاکسترهای آتشفشانی نیز می‌تواند در همولیز و ایجاد لخته خون موثر باشند [71][70]. در بند بعدی خلاصه‌ای از روش‌های مطالعات غربالگری متمرکز بر خون یا سیستم قلبی و عروقی را به‌عنوان عضو هدف ارائه می‌شود. هلفاشتاین و همکاران [72] اثرات نانومواد را مستقیماً بر عضلات قلب در روش برون‌تنی ارزشیابی کردند. در مطالعه آنها، عضلات قلبی بطنی نوزاد موش صحرایی با غلظت‌های مختلفی از نانولوله‌های کربن یک جداره، ذرات انتشار یافته از دیزل یا دی‌اکسید تیتانیوم انکوبه شدند و سرعت هدایت و تولید ROS اندازه‌گیری شد. هرچند نتایج بدست آمده حاکی از اثرات مختلف تولید ROS بر روی عملکرد سلول قلب بود، مجریان هرگز حالت فیزیکی ذرات را در محیط کشت تأیید نکرده‌اند. نانولوله‌های کربنی قادر به جذب مواد مغذی از محیط کشت بوده و سرم حاوی پروتئین می‌تواند سمیت را تغییر دهد. بنابراین، طراحی این مطالعه نیازمند تعدادی سنجش کنترلی مناسب (مانند وقوع از برهم کنش، کاهش پروتئین) و اعتبار سنجی گسترده‌ای است.

لی و همکاران [73] مطالعاتی در مورد اثرات مستقیم نانوذرات بر اریتروسیت^۱، لخته شدن گلبول قرمز و ریخت‌شناسی جایگزین شده با دی‌اکسید تیتانیوم در نانومقیاس مرتبط با مواد ماکرو مقیاس انجام داده‌اند. همچنین، همولیز و تولید ROS با مواد نانومقیاس نسبت به مواد با مقیاس میکرون بسیار گسترده‌تر است. تأیید ارزش پیش‌گویانه این آزمون از طریق ارزشیابی ذرات مختلف الزامی است.

۳-۵-۳-۶ برهم‌کنش با خون که موجب اصلاح پاسخ زیستی می‌شود

مشخص شده است که خون، به‌ویژه پروتئین‌ها، می‌تواند با نانومواد به وسیله پوشش‌دهی سطح و تشکیل یک کرنا، برهم‌کنش داشته باشند [74]. در بعضی موارد، نانومواد پوشش داده‌شده با پروتئین، باعث تغییر سمیت می‌شوند، به‌طور کلی نتایج نشان داد که اینها سمیت کمتری در مقایسه با ذرات بدون پوشش پروتئین دارند، به‌عنوان مثال، پروتئین کرنا هم موجب تسهیل و هم کاهش جذب سلولی و تغییر در فعالیت بیولوژیکی می‌شود [51][53][74]. در ضمن این که این برهم‌کنش‌ها برای درک اثراتی از ذرات روی سیستم زیستی می‌تواند مهم باشند، اما پیش‌بینی اثرات زیستی حاصل از آن تاکنون امکان‌پذیر نبوده است. بنابراین، این پدیده دیگر مطرح نمی‌شود.

۴-۵-۳-۶ برهم‌کنش با خون به عنوان نشانگر خواص سمی

از برهم‌کنش نانومواد با خون برای پیش‌بینی خصوصیات زیستی به‌ویژه واکنش سطحی^۲ استفاده می‌شود. خلاصه این مطالعات در ادامه خواهد آمد. به‌طور کلی، چنین سنجش‌هایی فاقد اعتبار است.

خون، بویژه همولیز خون (تخریب سلول‌های قرمز خون)، به‌عنوان نشانگر واکنش سطحی مورد استفاده قرار می‌گیرد. وارهایت و همکاران [76] از همولیز به‌عنوان ویژگی میزان واکنش سطحی استفاده کردند و آن را با پاسخ‌های ریوی به دنبال مواجهه در آزمون درون‌تنی ارتباط دادند. در این مطالعه، محققین، کوارتز در اندازه میکرون یا نانو را با اریتروسیت تازه گرفته‌شده از خون کامل انسان مجاورت نموده و همولیز یا میزان تخریب سلول‌های قرمز خون را با دستگاه طیف‌سنج نوری اندازه‌گیری کردند. همچنین، حیوانات نیز در معرض تجویز مقدار کم داخل نای در برابر مواد مشابه قرار گرفته و سمیت ریوی با بررسی آسیب‌شناسی بافتی و تجویز داخل نای ارزیابی شد. میزان همولیز با التهاب ریوی و آسیب‌شناسی

1- Erythrocyte

2- Surface reactivity

ریوی بیشتر کیسه هوایی نسبت به خصوصیات فیزیکی مانند اندازه، میزان بلوری شدن، مساحت سطح یا تشکیل رادیکال‌هایی که به وسیله ESR اندازه‌گیری شده بودند، مرتبط بود.

آیساکا و همکاران [77] همچنین گسترش همولیز و سمیت ریوی را نشان دادند، اما نه در آزمایش مشابه. با استفاده از اریتروسیت گرفته شده از خون تازه انسان، همولیز اثرات ریوی نانو ذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در دو فاز آناستاز^۱ و فاز روتیل^۲ و با اندازه میکرون دی‌اکسیدتیتانیوم توسط ساینس و همکاران مقایسه شد [29]. به هر حال، مقایسه مشخصه‌یابی ذرات استفاده شده توسط ساینس و همکاران کافی نبود، لذا می‌توان آن را با آنچه که آیساکا و همکاران به کار برده بودند مقایسه کرد [77].

لی و همکاران [73] فعالیت همولیز نانو ذرات دی‌اکسیدتیتانیوم را گزارش کردند. لین و هاینز [78] همچنین از همولیز به عنوان نشانگر سمیت سلول استفاده کردند. گلبول‌های قرمز شسته شده در مجاورت نانو ذرات سیلیکای متخلخل و غیرمتخلخل قرار داده شد. افزایش همولیز وابسته به غلظت که در ارتباط با مساحت سطح بود مشاهده شد. منحنی‌های پاسخ دارای شیب کاهشی زیادی برای سیلیکای متخلخل بوده اما در مورد ذرات غیرمتخلخل اینگونه نبود.

با استفاده از همین اصول، روگرز و همکاران [79] سنجش «قابلیت کاهش فریک پلاسما (FRAP)» را با استفاده از کاهش فریک سرم^۳ (FRAS) به جای پلاسما اصلاح نمودند. سرم در مجاورت غلظت‌های مختلفی از نانو مواد قرار داده شد و میزان استرس اکسیداتیو اندازه‌گیری شد. با تبدیل داده‌های خام به واحدهای معادل Trolox، می‌توان نانو مواد را براساس میزان توانایی در کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدان سرم درجه‌بندی کرد. به طور کلی، نتایج مورد انتظار نشان داد که کربن‌های سیاه نانومقیاس، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را ۲۲۰ نانومتر مرتبه بیشتر از کربن‌های سیاه عادی کاهش می‌دهند، فولرن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را بیش از فولرن تصفیه‌شده کاهش می‌دهد، ظرفیت کاهش فاز آناستاز دی‌اکسیدتیتانیوم بیشتر از فاز روتیل می‌باشد.

۶-۳-۶ روش‌های غربالگری سمیت ژنی

آزمون نانو مواد برای یافتن اثرات سمیت ژنی در روش برون‌تنی که پیش‌بینی ریسک بالقوه سرطان‌زا یا سیر تکاملی می‌باشد، یکی از بحث برانگیزترین آزمون‌ها در بین سم‌شناسان به شمار می‌رود و بررسی‌های زیادی در مورد این موضوع وجود دارد [80] تا [84]. موضوعات مقدماتی شامل موارد ذیل است:

- ۱- مناسب بودن سنجش‌های سمیت ژنی برون‌تنی برای توسعه آزمون مولکول‌های کوچک؛
- ۲- ارتباط مکانیستی نقطه پایانی مراحل سمیت ژنی در روش برون‌تنی نسبت به نانو مواد سرطان‌زای^۴؛
- ۳- عدم دسترسی به کنترل‌های مثبت نانو مواد برای ارزشیابی از سنجش عملکرد، حساسیت و توان مقایسه‌ای؛
- ۴- ارتباط غلظت‌ها در روش برون‌تنی نسبت به مواجهه سناریوهای مختلف مواجهه درون‌تنی.

آزمون‌های متداول مواجهه متوالی^۵ در سنجش‌های برون‌تنی که در بسیاری از قالب‌های^۱ استاندارد شده قابل دسترسی است، شامل سنجش ژل تک حفره/الکتروفورز (سنجش کامت)^۲ [85]، آزمون جهش برگشتی باکتریایی (سنجش ایمز)^۳

1- Anatase
2- Rutile
3- Ferric Reducing Ability of Plasma Assay
4- Ferric Reducing Ability of Serum Assay
5- Carcinogenesis
6- Battery

[86]، آزمون جهش کروموزومی پستانداران در سلول‌های تخمدان همستر چینی [87]، سنجش جهش پیشرفته HPRT [88]، آزمون میکرونوکلوئوس⁴ [89]، آزمون سنتز برنامه ریزی نشده DNA در سلول پستانداران در روش برون تنی [90] و ارزیابی برون تنی تغییرات سلول جنین همستر، نژاد سوریه [83] می‌باشد.

بررسی مقالات آزمون سمیت ژنی نانومواد روند مشترکی را نشان می‌دهد [82][81]. به‌عنوان مثال، اکثریت سنجش جهش ژن باکتری نانومواد مانند سنجش ایمز، نتایج منفی داشته که ممکن است ناشی از عدم نفوذ نانومواد به دیواره سلول باکتری باشد [82][81]. در مقابل، بیشترین سنجش کامت برای آسیب DNA و سنجش‌های جهش ژنی پستانداران مثبت است، که ممکن است در اثر انحرافی باشد که از نتایج مثبت کاذب به‌دست آمده است [82]. چون سمیت ژنی اساساً براساس اثرات مستقیم روی DNA می‌باشد (اگرچه اثرات غیر مستقیم نیز می‌توانند توسط ROS رخ دهد)، برای هر سنجش سمیت ژنی، مواجهه داخل سلولی باید نشان داده شود. ذرات مثبت در سنجش کامت شامل نانومواد بر پایه کربن مانند فولرن و نانولوله کربن و همچنین نانوذرات فلزی مانند کبالت و دی‌اکسیدتیتانیوم است [82]. در میان طبقات نانومواد با خصوصیات فیزیکی-شیمیایی مشترک و یا ترکیب شیمیایی و طبقات سنجش سمیت ژنی، مانند اختلال کروموزومی⁵ و جهش‌های ژنی⁶، یافته‌های پایداری موجود نیست [81]. به‌علاوه، زمانی که تلاش برای مقایسه مطالعات و نتیجه‌گیری با توجه به ماهیت سمیت ژنی نانومواد خاص و سنجش‌های منحصربه‌فرد بررسی می‌شود، عدم سازگاری در طراحی سنجش نانومواد با خصوصیات فیزیکی شیمیایی به یک مشکل شایع تبدیل می‌شود [81]. همچنین تمام مطالعات، بر اهمیت ایجاد پروتکل‌های استاندارد شده توصیه می‌کنند.

موضوع دیگر نیاز به در نظر گرفتن چگونگی سنجش‌های استاندارد سمیت ژنی است که به چه نحو اصلاح شوند تا بتوانند با ارزشیابی نانومواد مطابقت داشته باشد. همانطور که در بالا نیز بدان اشاره شد، سیستم‌های سلولی پستانداران به‌دلیل تفاوت در جذب نانومواد مناسب‌تر از گونه‌های باکتریایی می‌باشند [83]. سنجش استاندارد میکرونوکلوئوس در روش برون تنی، به‌طور کلی محیط حاوی سرم و مهار کننده سیتوکالاسین⁷ B پلیمریزاسیون/اکتین⁸ را مورد استفاده قرار می‌دهد و هر دو ترکیب می‌توانند همچنان در جذب نانومواد توسط سلول تداخل ایجاد کنند [88][83]. این موضوع ممکن است نیازمند تغییر غلظت سرم یا افزودن سیتوکالاسین B پس از تیمار نانومواد باشد. علاوه بر این، موضوع چگونگی ارتباط غلظت برون تنی با مواجهه درون تنی مشکل ویژه نانومواد است، چون، نه تنها غلظت نانومواد، بلکه حالت نانومواد (انبوه/توده‌ای، پروتئین‌های چسبیده به سطح و غیره) هم مهم است، زیرا می‌تواند در مواجهه سلول و فعالیت زیستی موثر باشد. بنابراین، مشخصه‌یابی نانومواد در محیط مورد استفاده و به‌دنبال آن ارتباط دادن این خصوصیات فیزیکی شیمیایی به مواجهه واقعی، مهم است.

در نهایت، آزمون سمیت ژنی برون تنی از نانومواد فقط زمانی مفید است که مکانیسم نهایی به‌دست آمده از آن مرتبط با مکانیسم‌های مواد سرطان‌زای انسانی یا به مخاطره انداختن تولیدمثل باشد. در این حالت، یک درک غالب از نانومواد تحریک‌کننده سرطان‌زای ریوی وجود دارد، مبنی بر اینکه مکانیسم‌های اساسی موجب تداخل مستقیم نانومواد با ژنوم

1 -Format
2 -Comet Assay
3- Ames test
4- Micronucleus Test
5 -Chromosome Aberration
6- Gene Mutation
7 -Cytochalasin-B
8- Actin Polymerization

نیست، بلکه این امر توسط برهم‌کنش ثانویه یا بوسیله مکانیسم‌های غیرمستقیم (مانند التهاب و استرس اکسیداتیو) به‌وقوع می‌پیوندد [91][90]. اگر استرس اکسیداتیو ناشی از عامل التهابی ثانویه نباشد، مکانیسم اکسیداتیو در سیستم درون‌تنی را می‌توان به‌صورت بالقوه ارزیابی کرد. با این حال، فعلاً، مقالات نانومواد سرطان‌زای ریه یک منطق مکانیستیک قوی برای استفاده از سنجش‌های سمیت ژنی برون‌تنی در این زمان ارائه نمی‌کند. این توجیه و منطق در مطالعات آینده در مورد نانومواد سرطان‌زا به‌ویژه در اعضای متناوب بدن و متعاقب روش‌های متناوب مواجهه، ارائه خواهد شد. پیش‌بینی دقیق در مورد سنجش سمیت ژنی باید مورد بررسی بیشتری قرار گرفته و استاندارد شود و در ارتباط با سلامت انسان نیز مورد تأیید قرار گیرد. در حال حاضر مناسب‌ترین روش‌ها آنهایی است که مورد تأیید OECD است یا در صورت نیاز، دستخوش تغییراتی شده‌اند تا تطابق بیشتری با نانومواد داشته باشند.

۶-۳-۷ آزمون برون‌تنی (مانع) سد^۱ و سیستم‌های آزمون مناسب برای سنجش سمیت نسبت به (موانع) سدهای بیولوژیکی

۶-۳-۷-۱ کلیات

اثرات سوء نانومواد روی سلامت انسان ممکن است در قابلیت اتصال این مواد در عبور از موانع زیستی بدن باشد. راه‌های مواجهه (ریوی، گوارشی، پوستی) و ورود نانومواد به بدن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در حال حاضر، موانعی که در زیر به آنها اشاره شده دو مورد است.

۶-۳-۷-۲ ریوی

مطالعاتی که در اوایل دهه ۱۹۹۰ در مورد سمیت تنفسی^۲ انجام شده، بر تحقیقات توکسیکولوژیک و نانوتوکسیکولوژیک و

به‌ویژه اثرات بالقوه سمیت ریوی نانومواد متمرکز است. اغلب مقالات اولیه روی اثرات ریوی نانومواد متمرکز بوده و به دنبال آن، تحقیقات در مورد نانوتوکسیکولوژیک در دهه‌های بعد توسعه یافته است. مثال‌هایی از مطالعات اولیه شامل تحقیقاتی است که توسط فرین و همکاران، اوبردورستر و همکاران و دیگران انجام شده است [92][93]. در پی انتشار این مقالات، مفاهیمی مانند مساحت سطح، تعداد ذره، دُز دریافتی^۳، نسبت دُز دریافتی و انتقال و استقرار بالقوه ذرات درون بافت ریوی مورد توجه قرار گرفته است. اخیراً، مشخصاتی همانند تولید گونه‌های فعال اکسیژن، وضعیت انبوهه و کلوخه شدن، فرمول شیمیایی، درجه خلوص، عدم تجانس، مساحت سطح ویژه، سطح شیمی، پتانسیل زتا، خاصیت کاتالیزوری، توزیع اندازه، خاصیت جاذب، بار سطح، مرحله بلوری، اندازه دانه، اندازه هیدرودینامیک/اندازه ذره، شکل، خصوصیات مورد توجه قرار گرفته است. علاوه بر این، میزان غبارزایی و حلالیت در چربی می‌تواند به فرآیند پیش‌بینی‌کننده میزان سمیت نانوذرات کمک کند.

برای اهداف غربالگری، روش کامل‌تر و کم‌هزینه‌تری نیز وجود دارد که نشان‌دهنده هماهنگی داده‌ها با نتایج درون‌تنی است. با توجه به شروع اقداماتی مانند Tox21 تلاش‌های هماهنگی برای استفاده از محیط‌های کشت سلولی با منشأ انسانی و کشت همزمان^۴ برای ارزیابی سمیت بالقوه برای این مسیر مواجهه آغاز شده است [94].

1- Barrier
2- Inhalation Toxicity
3- Delivered Dose
4 -Co-Cultures

ثابت شده است که در مدل‌های برون‌تنی، استفاده از کشت سلول و کشت همزمان، اطلاعات مفیدی را در اختیار می‌گذارند [96][95]. برخی از مدل‌های سه بعدی که در آنها از ظروف شیشه‌ای ته‌صاف استفاده می‌شود و مدل‌های سلولی برون‌تنی /پیتلیوم مجرای تنفسی انسان تا چندین ماه قابل نگهداری است.

تحقیقات دقیق‌تر یک مطالعه که روی نقاط کوانتومی در سلول‌های شبیه ماکروفاژ موشی (سلول‌های J774.A1) انجام شده است، در استدلال مکانیسم سمی بودن نانومواد مفید است. کلیف و همکاران این فرضیه را مطرح کردند که محل قرارگیری درون سلولی نانومواد می‌تواند مستقیماً به علت سمیت بالقوه آنها باشد [97]. هرچند این مطالعات فقط بر روی نقاط کوانتومی متمرکز است، مطالعات دیگر نشان دادند که این یک فرضیه ارزشمند است.

آلفارو مورنو و همکاران [98] نشان دادند که کشت سلول‌های ریه انسان از خود (G-CSF)^۱، (MIP)^۲، β -(IL)-1^۳، (IL-6)^۴، (TNF)^۵ و (MIP-1 α)^۶ ترشح می‌کنند [98]. محققین همچنین نشان دادند که این اثرات با دیگر اثرات سیستماتیک مربوط به ذرات ریز همبستگی داشته و در مجموع سبب التهاب شدید، اختلال در اندوتلیال و تحرکات سلول‌های مغز استخوان می‌گردند.

راتن - روتیسهاوز و همکاران [99] یک کشت همزمان سه‌تایی شامل ترکیبی از سلول‌های اپیتلیال، ماکروفاژ و سلول‌های اندرتریک را طراحی کردند و نشان دادند که عامل تحریک مهم‌ترین مانع بر سر راه کارکرد اپیتلیال مجرای تنفسی انسان می‌باشد. با این مدل، اندازه‌گیری پاسخ‌های سلولی به دی‌اکسیدتیتانیوم، شامل ROS و آزاد کردن تومور نکروزفاکتور را نشان دادند و همچنین محل قرار گرفتن داخل سلولی نانومواد را به وسیله میکروسکوپ الکترونی نشان دادند. این مدل به‌عنوان یک ابزار برای مطالعه در مورد برهم‌کنش نانومواد و سلول‌های ریه و مدلی برای تحقیق سمیت بالقوه نانومواد ارائه شده است. سیستم این مدل با نتایج درون تنی مقایسه و هماهنگی خوب داده‌ها مشاهده شد. متعاقباً، نتایج پاسخ‌های توکسیکولوژیک از مواجهه با (نانو) سلولز، نانولوله کربنی چند جداره و فیبرهای آزبست^۷ در کشت سه‌تایی از یکدیگر متمایز متمایز بودند [97]. سلول‌های کیسه‌هوایی مشابه تیپ دو اپیتلیال انسانی (A-549) در مواجهه با کلوخه طبیعی آهن از ۲۰ نانومتر تا ۱۰ میکرومتر، قرار داده شد، براساس اندازه به چهار قسمت تقسیم شدند و برای قدرت تولید ROS، اثرات سمیت ژنی و تحریک مسیرهای سایتوکاین مورد آزمون قرار گرفتند. فعال‌سازی مسیر c-Jun به‌نظر می‌رسد وابسته به ROS باشد و تشکیل ROS نیز ظاهراً یکی از دلایل اثرات سمیت ژنی کلوخه طبیعی آهن می‌باشد [100]. علاوه بر این می‌توان از سیستم‌های کشت همزمان برای مواجهه تنفسی به‌صورت تداخل مایع برای شبیه‌سازی بهتر از طریق یک جریان هوایی در مقایسه با مواجهه داخل محیط کشت سلولی استفاده کرد. [101] درحالی‌که بسیاری از مطالعات آزمایش‌های کشت سلول یا کشت همزمان نتایج قابل قبولی را ارائه می‌کنند، از پروتکل‌های استاندارد به‌ندرت توسط آزمایشگاه‌های متعدد استفاده می‌شود. به استثناء این مورد، مدل تجاری قابل دسترس بافت مجرای تنفسی انسان درآزمون برون‌تنی نانومواد توسط بسیاری از آزمایشگاه‌های به‌عنوان روش مستند اشاره شده‌است.

1- Granulocyte Colony-Stimulating Factor
2- Macrophage Inflammatory Protein
3- Interleukin (IL)-1 β
4- Interleukin 6
5- Tumour Necrosis Factor α
6- Macrophage Inflammatory Proteins -1 α
7- Crocidolite

۳-۷-۳-۶ پوستی

وضعیت نفوذ نانوذرات در پوست به طور گسترده هنوز شناخته نشده است. شواهد محدودی نشان می‌دهد که نانوذرات قابلیت چندانی در نفوذ به پوست یا باقی ماندن در فولیکول‌های مو را دارند [103][102]. هر چند که خلاء علمی زیادی در مورد رفتار نانومواد روی پوست آسیب‌دیده و ترک‌خورده^۱ وجود دارد. به‌علاوه، مشخص شده است که رفتار نانومواد بر اساس بخش انتخابی رفتار متفاوتی نشان می‌دهند. بنابراین هنگام آنالیز داده سمیت پوستی، توصیه می‌شود به نوع بخش مواد نیز توجه شود.

معمولاً در آزمایش‌های نفوذپذیری، از پوست خرگوش و موش صحرایی به‌جای پوست انسان استفاده می‌شود. هر چند، به دلیل انتقالات فولیکولی و خواص فیزیکی-شیمیایی متفاوت موانع، نفوذپذیری پوست حیوانات آزمایشگاهی نسبتاً ضعیف می‌باشد. تفاوت‌های ریخت‌شناسی بین انواع پوست، اساساً متضمن تراکم فولیکول‌های مو همراه غلظت اسیدهای چرب آزاد و تری‌گلیسریدها، نشان‌دهنده فاکتور مهمی در میان موانع پوستی بین گونه‌های مختلف جانوری می‌باشد. تغییرپذیری بین نمونه‌های پوست انسان نیاز به بررسی دارد که این امر با استفاده از روش‌های متداول برون‌تنی امکان‌پذیر است.

متغیرهای متعدد درگیر در مواجهه، در استفاده از پوست حیوانات وجود دارد که موجب می‌شود استفاده از این مدل‌ها ارتباط و کارایی کمتری نسبت به روش برون‌تنی انسانی داشته باشند.

سازمان توسعه و همکاری اقتصادی (OECD TG428) [104]، از نمونه‌های پوست انسان به‌عنوان یک جزء از راهبرد آزمون جذب پوستی استفاده می‌کند. این روش برون‌تنی معمولاً برای کاربرد نانومواد بر پوست انسان در روش برون‌تنی و درون‌تنی استفاده می‌شود [105] تا [107]. در سنجش‌های برون‌تنی نمونه‌های پوستی برای ارزیابی میزان جذب نانومواد یا انتشار مواد در لایه پوست توسط سلول‌های ترکیبی تیپ فرنس^۲ یا مدل نفوذ^۳ استفاده می‌شود. پروتکل‌های آزمون سمیت پوستی دیگری توسط OECD اعتبارسنجی شده است، از جمله: ارزیابی خوردگی [108]، میزان تخریب پوستی برای ارزیابی میزان تجزیه‌پذیری [109] TER، خوردگی پوست موش صحرایی^۴ [110] [99] و سوزش پوستی آزمون برون‌تنی OECD TG 439 [111]. معمولاً نفوذ نانومواد به پوست خیلی کم یا حتی هیچ تلقی می‌شود [46] تا [49]. آزمایش‌های غربالگری حساسیت پوستی در زیربند ۳-۶-۲ مطرح شده است.

مدل‌های تجاری قابل دسترسی معتبر و مناسبی برای نانومواد تایید شده است. هر دو روش ظروف کشت سلولی و مدل سه‌بعدی برون‌تنی بر اساس فناوری التهاب و نفوذ و نوع توزیع مواد بر روی پوست برای مواد شیمیایی مورد تایید می‌باشند [112]. این روش‌ها توسط صنایع و دانشگاه‌ها استفاده می‌شود و در آزمایشگاه قابل بازسازی است.

۳-۶-۸ اندازه‌گیری‌های اومیکس^۵

رویکرد سمیت ژنی برای ارزیابی مکانیستیک نانومواد استفاده می‌شود. اندازه‌گیری‌های اومیکس مانند ژنومیکس، پروتئومیکس، ترانس کربتومیکس، متابولومیکس و دیگر سیستم‌های اومیکس در ارزیابی‌های مواد دارویی و اثرات سمیت بر محیط امری معمول به‌شمار می‌رود و اغلب از آنها به شکلی مشابه برای نانومواد نیز استفاده می‌شود. استفاده از کشت سلول در اتصال با اومیکس‌ها برای ارزیابی اثرات سلامتی نانومواد در مقالات دیده شده است، اگر چه این روش‌ها به شکل

1- Broken
2- Franz-type
3- Saarbruecken
4- Ter Skin Corrosivity Rat
5- OMICS

استاندارد مورد اجرا قرار نمی‌گیرند، با این وجود، نتایج به دست آمده مناسب بوده و اثبات داده‌ها می‌توانند اطلاعات سودمندی را برای آزمایش سریع، ارزان و موثر در مورد میزان سمیت نانومواد فراهم سازد. علاوه بر این، استفاده از گونه‌های سطوح پایه وابسته به تغذیه^۱ (مانند باکتری‌ها، جلبک‌ها، دافنی‌ها و نماتود (الگانس-سی))^۲ برای غربالگری نانو، بوم‌شناسی می‌شود، همچنین در سنجش ترکیبات از آنالیز اومیکس استفاده می‌شود.

لی و همکاران [113] کاربردی از عملکرد ژنومیک‌ها و گزارش‌هایی از اثرات نانوسریا^۳ (دارای خاصیت اکسایش و کاهش ولی اثر گسترده ژنومی آن هنوز ناشناخته است) بر نسخه‌برداری کلی ژنی سلول‌های عصبی موش را نشان دادند. یافته‌ها نشان داد که ژنومیکس و نسخه‌برداری برای ژن‌های خاص بیماری‌زا برای آنالیز اثرات ویژه بر سلامت نانومواد مناسب است [114].

یک مثال از کاربرد مشترک روش‌شناسی برای غربالگری بوم‌شناسی توسط روه و همکاران مطرح شد، در جایی که نانوذرات نقره به وسیله ارگانیسیم‌های ابتدایی مانند الگانس مورد آزمون قرار گرفته است. نمونه مشابهی از ژنومیک‌ها و نسخه‌برداری از باکتری‌های موجود در خاک، گونه‌های جلبکی یافت شده در آب یا دافنی و جلبک آبی نیز قابل انجام می‌باشد. در پژوهش الگانس، میکروآرای^۴ کل ژنوم برای ارزیابی کیفی پروفایل نسخه‌برداری استفاده شد، در حالی که پروفایل‌های اختصاصی با روش کیفی بررسی شد.

۹-۳-۶ سمیت‌های دیگر

سایر مطالعات غربالگری سم‌شناسی که در بالا ذکر نشده شامل آزمون‌های سمیت عصبی، سمیت تکوینی، سمیت جنینی و اثرات روی اندام‌های خاص است:

۹-۳-۶-۱ سمیت عصبی^۵: کشت همزمان دو سلول که مدلی از سد خونی- مغزی را شبیه‌سازی کرده و قادر است اثرات سمیت نانومواد را بر سلول‌ها پیش‌بینی کند. مقایسه بین نتایج داده‌های آزمون‌های برون‌تنی و درون‌تنی در رت‌ها یکسان بود [116].

۹-۳-۶-۲ سمیت تکوینی^۶: کاربرد مدل‌های جنینی انسانی خارج از بدن^۷ برای مشخص کردن این که آیا مولکول‌ها و نانوذرات قادر به عبور از سد جنینی می‌باشند یا خیر اثبات شده است و این امر در تشخیص اینکه آیا نانوذره توانایی به خطر انداختن جنین در حال رشد را داشته یا خیر را ممکن می‌سازد [117].

۹-۳-۶-۳ سمیت جنینی^۸: یک روش جایگزین جزیی برای آزمون درون‌تنی، ارزیابی سمیت تکوینی است که شامل آزمون‌هایی مانند: آزمون سلول بنیادی جنینی^۹، آزمون جوانه دست و پای موش^{۱۰}، و آزمون توده‌های ریز^{۱۱} می‌باشد [118].

- 1- Base-Level Trophic Species
- 2 -C. Elegans
- 3- Nanoceria
- 4 -Microarray
- 5- Neurotoxicity
- 6 -Developmental Toxicity
- 7- Ex vivo
- 8- Embryotoxicity
- 9- Embryonic Stem Cell Test
- 10 -Rat Limb Bud Test
- 11- Micromass Test

۶-۳-۹-۴ اثراتی بر اندام‌های بدن^۱: برای سنجش اثرات مواد دارویی بر روی اندام‌های خاص بدن یا قابلیت دارو یا وسایل وسایل رساننده مولکول برای انواع خاصی از سلول‌های هدف، یک روش برون‌تنی جدید توسعه یافته که با استفاده میکروفلوئید چند کاناله^۲ میکروتراشه از اشکال مختلف سلول‌های انسان ایجاد شده است. سین و همکاران [119]، وسیله مشابهی تهیه کردند، ارتباط انسانی HuRel، که به‌ویژه در ارتباط با متابولومیکس، سمیت ژنی و سمیت اندام دیگر بدن و ارزیابی ترکیبات موثر سوخت‌وساز بدن می‌باشد. واکر و همکاران [120] یک وسیله مشابه آزمایشگاه بر روی تراشه دارای ظرفیت نانو برای آزمون‌های توکسیکولوژیک سلولی ساخته‌اند که قادر است ۹ محلول خطی را در موازات با رده‌های سلولی انسان آزمایش کند. گوتوالد و همکاران [121] یک سکو با پایه تراشه برای تولید کشت سه‌بعدی بافت در روش برون‌تنی ساخته‌اند که با کارکرد اتوماتیک نیز سازگاری دارد. ابزارهای مشابه مانند ریه بر روی تراشه و امحاء و احشا بر روی تراشه ساخته شده است [122] تا [124]. این ابزارهای آزمایشگاهی بر روی تراشه به محققان امکان آزمون هر دو سمیت و در عین حال هدف‌گیری سلول را با استفاده از سلول‌های مختلف انسانی می‌دهد.

۶-۴ روش‌های مرتبط آزمون درون‌تنی برای غربالگری سمیت نانومواد ساخته شده

۶-۴-۱ کلیات

سیستم‌های مدل جدید درون‌تنی مانند جنین ماهی زبرا^۳، می‌تواند به راحتی و با سرعت در تمام سطوح سلولی و ملکولی، علاوه بر سطح کل حیوانی مورد استفاده قرار گیرد و در عین حال اطلاعات ما را از عواقب زیستی مواجهه نانومواد به سرعت افزایش دهد.

۶-۴-۲ مدل‌های غربالگری کل حیوان^۴ (شامل اندازه‌گیری متابولیسم‌ها، پروتئومیکس، ترانس کریپتومیکس و سمیت ژنی)

اثرات سمیت نانومواد بر روی سلامت انسان و محیط با استفاده از مدل‌هایی که از گونه‌های بدون احساس و درک استفاده می‌کنند، به‌عنوان ابزاری برای ارزیابی اثرات نانومواد برای سلامت انسان و محیط بروز کرده است. به‌عنوان مثال، جنین ماهی زبرا مدلی ارزشمند از بیولوژی مهره‌داران است که در آزمون‌های توکسیکولوژیک انسانی استفاده می‌شود [125] تا [132]. سیستم این مدل قابلیت تحقیقات حیوان کامل (مانند ارگانسیم‌های دست نخورده، مکانیسم‌های عملکردی هموستاتیک و سیگنال‌دهی بین سلولی) را به‌همراه آسان بودن کشت سلول (به‌عنوان مثال صرف وقت و هزینه کم زیرساخت محدود، مقدار کم محلول نانومواد مورد نیاز) را فراهم می‌سازد. لازم به ذکر است که در صورت بسته شدن مسیر آبشش ماهی به‌وسیله نانو ذرات نیز سمیت اتفاق می‌افتد، با این تفاوت که مرگ به‌علت قطع تنفس بوده و مرگ فیزیکی به جای مرگ بر اثر سمیت به‌وقوع پیوسته است.

مدل جنینی ماهی می‌تواند برای رسیدن به یک درک سریع از اثرات زیستی مواجهه نانومواد بر روی کل سیستم حیوانات استفاده شود. آزمون میزان سمیت نانومواد نشانگر حساسی از اثرات سیستم یکپارچه است، زیرا مهره‌داران در مراحل اولیه زندگی بیشترین پاسخ را نسبت به مداخلات از خود نشان می‌دهد، بدین ترتیب فرآیندهای اساسی تکوین در بین گونه‌ها به خوبی حفظ شده و موجب رسیدن به یک تفسیر جامع از نتایج سنجش می‌شود. از آنجایی که تکوین و رشد طبیعی

1 -Organ Effects

2 -Multi-Chambered Microfluidic

3 -Zebrafish

4 -Whole Animal Systems

مستلزم ارتباطات خوب تطابق داده شده سلول‌ها و سیگنال‌دهی سلولی می‌باشد، بنابراین در صورت مختل شدن این فرآیند به‌وسیله نانومواد امکان ایجاد اختلال در فرآیند تکوین وجود دارد. مختل شدن تکوین می‌تواند با ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی، رفتارهای غیرعادی یا مرگ جنین ایجاد شود. مجموعه‌ای از آنالیز ریخت‌شناسی، تکامل و رفتاری می‌تواند برای اندازه‌گیری اثرات سامانه‌های یکپارچه استفاده شود.

۳-۴-۶ سایر آزمون‌های غربالگری مرتبط با آزمون درون‌تنی

در سیستم‌های حیوان کامل، در مواجهه نانو مواد، سمیت به‌عنوان یک اثر ثانویه می‌تواند القا شود، به‌عنوان مثال اثرات پایین دستی^۱ از تماس نانومواد یا محصولات جانبی آن، یون‌های غیرمحلول یا گونه‌های فعال می‌توانند روی اندام‌های پایین بدن بعد از جذب مشاهده شود. علاوه‌براین، اثرات ثانویه در زمان تجمع نانومواد در عضو یا در سیستم‌های بدن را می‌توان مشاهده نمود. به‌عنوان مثال، تجمع نانولوله‌های کربن در مسیر گوارشی دافنی موجب مرگ می‌گردد که به‌ظاهر به‌علت پرشدگی فیزیکی رخ می‌دهد و نه به دلیل تاثیر مستقیم اندازه مواد [134][133]. اهمیت وجود یک چارچوب معتبر^۲ برای تعیین میزان اثرات مضر در مطالع موش صحرایی در مواجهه با فیبرهای نانوی کربنی به‌خوبی نشان داده شده است [135].

می‌توان «غربالگری» ایجاد لخته خون ترومبوزیس^۳ را در طراحی یک مطالعه مورد نظر قرار داد. سیلوا و همکاران [136] اثر ترومبوزیس در رگ گوش موش را ارزشیابی کردند. در این مدل، لخته حاصل از تزریق داخل رگی (IV) رز بنگال و شفاف شدن رگ‌ها به‌وسیله چراغ لیزر نشان داده شد. اثرات نانومواد بر ایجاد لخته‌های خون را می‌توان به وسیله تزریق همزمان داخل رگی ذره یا استفاده از مجرای نای پیش از استفاده از رز بنگال ارزیابی نمود، زیرا ده دقیقه پس از تزریق رز بنگال، لخته‌های خون شروع به شکل گرفتن می‌کنند. این نتایج نشانگر این است که بیدهای پلی استرن تزریق شده در داخل رگ زمان فرم گرفتن لخته‌ها را در مقایسه با گروه درمان نشده به‌نحو چشم‌گیری کاهش داده است، اما بیدهای^۴ استفاده شده در تزریق نای (IT)^۵ زمان تشکیل لخته‌ها را حتی بیش از تزریق داخل رگی (IV)^۶ کاهش می‌دهد. نکته جالب اینکه پوشش پلی استیرین با آمین^۷ تاثیرگذار تر از بیدهای با پوشش کربوکسیلات عمل می‌کند، همچنین، بیدهای پوشیده با آمین U شکل وابسته به دُر را از خود نشان می‌دهد. اعتبار صحت این روش نیازمند فعالیت‌های بیشتر در ارتباط با سایر ذرات و اندازه‌ها آنها است ولی احتمال اینکه این روش امکان دستیابی به یک سنجش غربالگری ترومبوزیس را فراهم می‌کند. آزمون‌های داخل نای به‌عنوان یک روش آزمایش غربالگری در سمیت تنفسی پیشنهاد می‌شود.

۷ روش‌های غربالگری توکسیکولوژیک مرتبط با محیط زیست

۱-۷ مقدمه

نکات مهم در آزمون‌های توکسیکولوژیک محیطی شامل:

- انتخاب محدوده غلظت نانوذرات در مواجهه با ارگانیس‌ها؛

1- Downstream
2- Weight-of Evidence Framework
3- Thrombosis
4- Beads
5- Intratrachea
6- Intravenous
7- Amine

- مشخصه‌یابی و کمیت (انبوهه، پوشش‌های سطحی و غیره و اینکه تا چه حد این ویژگی‌ها در طی آزمون تغییر می‌کنند) نانومواد مورد نظر در مواجهه با محیط زیست؛

- انتخاب مسیر(های) مواجهه (خوردن، استنشاق یا تماس با سطح خارجی موجود زنده؛

- مشخصه محیط مواجهه، وضعیت تغذیه (وجود یا عدم وجود مواد غذایی و اینکه چه مقدار و چه نوع مواد غذایی در دسترس هستند)؛

- نقاط پایانی تحقیق شده (سمیت حاد، سمیت تولید مثل، استرس اکسیداتیو، و غیره)؛

- حساسیت موجود زنده مواجهه یافته.

بررسی نقاط پایانی یا اثراتی که مورد آزمایش قرار می‌گیرند مشابه بررسی آلودگی‌های محیط است، مانند مواردی که به‌طور معمول اندازه‌گیری می‌شوند (مرگ‌ومیر، کاهش وزن، سطوح جمعیت یا اثرات تولید مثل) همچنین نقاط پایانی توکسیکولوژیک جدید مانند تغییرات در ژن‌ها یا بروز پروتئین و یا آسیب‌های اکسیداتیو به مولکول‌های زیستی.

روش‌های آزمون استاندارد موجود در مورد نانومواد بدون تغییرات، تا چه حد و اگر تغییراتی مورد نیاز است تا نتایج قابل اطمینان و تکرار پذیر باشند، موضوعی است که تحقیقات آینده به آن می‌پردازد. کاربرد روش‌های متداول بدون انجام اصلاحات یا اصلاحات مورد نیاز، احتمالاً بسته به نوع ارگانسیم و محیط (خاک، آب یا رسوبات) که آزمون در آن انجام می‌شود متفاوت هستند. هرچند روش‌های آزمون استاندارد متداول یک نقطه شروع توصیه شده برای آزمون اثرات بوم شناختی نانومواد محسوب می‌شوند [138][137]. چند نمونه از روش‌های بالقوه برای آزمون‌های سریع شامل این موارد است: آزمایش توقف رشد جلبک [139]، آزمایش بی‌حرکت کردن حاد/دلفنی [140]، تشخیص کیفی اثرات مواد سمی در نمونه‌های آب و خاک بر رشد، باروری و تولید الگانس سی^۱ (نماتود)، (چهار روز برای آزمون رشد) [141] و راهنمای استاندارد آزمون سمیت خاک آزمایشگاهی با نماتود/الگانس سی، (یک یا دو روز برای سمیت حاد مرگ و میر) انجام می‌شود [143][142]. یک روش دیگر غربالگری سریع، سمیت باکتری با استفاده از ظروف ۹۶ حفره‌ای و دستگاه ثبت اطلاعات به‌صورت خودکار است. یک مثال برای این موضوع، سطح پروفایل فیزیولوژیکی می‌باشد که ثابت شده است برای تغییرات زمانی و فضایی در جامعه میکروبی اثرگذار است. در تحقیقات اکولوژیک کاربردی می‌توان از ظروف ۹۶ حفره‌ای تخت برای اندازه‌گیری متابولیسم از منبع کربن ۳۱ در هر سنجش استفاده کرد [144]. با وجود اینکه روش استاندارد برای انجام این رویکرد تدوین نشده است، اما یک روش کوتاه مدت چهارساعته برای فعال کردن آزمون مهار تنفسی وجود دارد [145].

نکات روش شناسی^۲ ویژه‌ای برای آزمون‌های نانوذراتی کربنی اخیراً منتشر شده است [143]. علاوه بر آن، مروری بر اثرات اکولوژیکی نانولوله‌های کربنی در ماتریس‌های مختلف نیز منتشر و در دسترس قرار گرفته است [146]. همچنین، روش آماده‌سازی سوسپانسیون نانومواد و ارتباط محیطی این رویکرد نیاز به بررسی دقیقی دارد. به‌عنوان مثال، در بعضی از آزمایش‌های اولیه با فولرن‌ها [147]، فولرن سوسپانسی شده^۳ همراه با تتراهیدروفوران (THF)، موجب ایجاد اثرات سمی شده که مرتبط با محصولات جانبی THF بوده و فولرن‌ها در ایجاد آنها نقشی نداشتند [148]. یکی از فاکتور مهم دخیل در تهیه مراحل سوسپانسیون نانومواد، استفاده از شرایط فراصوتی و تکرار پذیری در بین آزمایشگاه‌ها است.

1- Elegans C
2- Methodology
3- Suspended

۲-۷ سرنوشت محیط و توزیع

سرنوشت محیطی و توزیع نانومواد به عوامل گسترده‌ای مانند مسیر توزیعی که نانومواد در ابتدا از طریق آن وارد محیط زیست می‌شوند، بستگی دارد (به‌عنوان مثال، استفاده از مواد سخت و طبیعی بازیافت شده از فاضلاب برای مصارف خاک یا تجزیه‌پذیری محصولات مصرفی). پس از رهایش، تحرک نانومواد به ویژگی‌های محیط زیستی مانند اجزای خاک و خواص رسوب ته‌نشین شدن یا شیمی آبی، آب موجود در دریاها یا مخازن بستگی دارد. خصوصیات نانومواد به‌ویژه وجود یا فقدان پوشش سطح، شکل و ریخت‌شناسی (کروی‌ها در مقابل رشته‌ها)، ترکیب ذره و تمایل برای مولکول‌های دیگر موجود در محیط مانند مواد ارگانیک و طبیعی بسیار به هم مرتبط است [151][150].

۳-۷ تجزیه‌پذیری و تبدیل محیط زیست

تبدیل و تجزیه‌پذیری بالقوه در نانومواد غیرارگانیک با پایه کربن، متفاوت است. نانوذرات کربنی (مانند فولران‌ها و نانولوله کربنی) ممکن است در نهایت از طرق زیستی یا غیرزیستی به سنگ‌های معدنی دی‌اکسید کربن (تخریب طبیعی) تبدیل شوند [152]. نانوذرات کربنی همچنین می‌توانند از طریق اکسیداسیون و تغییرات شیمی سطح ذرات و تغییرات اصلاح شوند. نانومواد معدنی همچنین می‌توانند از طریق تجزیه شدن به یون‌های خود، فرایندهای اکسیداسیون (به‌عنوان مثال از آهن صفر ظرفیتی به اکسیدهای آهن) و واکنش‌های شیمیایی و تغییر ترکیب نانومواد (تبدیل شدن نانوذرات نقره به سولفید نقره) تغییر شکل دهند. موضوع مرتبط دیگر در مورد نانومواد در ارتباط با تغییرات پوشش سطح آنها مانند تجزیه‌پذیری طبیعی، تجزیه‌پذیری زیست‌محیطی (به عنوان مثال تبدیل مواد طبیعی ارگانیک به سیترات) یا اصلاح پوشش سطح توسط فرآیندهای زیستی و غیرزیستی (مانند تجزیه شیمیایی بر اثر نیروی تابشی) می‌باشد.

۴-۷ بقا و تجمع زیست محیطی

بقا و تجمع طبیعی نانومواد به خصوصیات ذاتی (اندازه، آرایش نانو ذرات، پوشش سطح)، خصوصیات محیطی (شامل عوامل گوناگون که از اهمیت زیادی برای محیط آبی، خاکی و رسوبات برخوردارند) و خصوصیات ارگانسیم‌ها بستگی دارد. در آلودگی‌های نانومواد به‌وسیله بلع غذا، آب، خاک و رسوبات، عامل تعیین کننده، میزان موادی است که جذب بافت‌های ارگانسیم‌های بدن شده‌اند و باقی ماندن این مواد در سیستم گوارشی عامل تعیین کننده‌ای به شمار نمی‌رود. قابلیت بافت‌های ارگانسیم‌ها در دفع نانومواد نیز بخشی مهمی در موضوع بقا زیستی طبیعی آنها است. با این وجود جذب شدن این مواد در بافت‌های ارگانسیم با باقی ماندن آنها در سیستم گوارشی تاکنون در آلودگی‌های مرتبط با مطالعات بوم‌شناختی مشاهده نشده است [133] [152] [151] [134]. هرچند، جذب نانو ذرات طلا در کرم خاکی [153] و همچنین جذب نانولوله‌های کربنی در گیاهان مشاهده شده است [151] تا [154]. علاوه بر اینها چند مورد از انتقال زنجیره غذایی نیز مشاهده شده است [155] تا [158]، اما بزرگنمایی زیستی^۱ (مانند افزایش از یک سطح تغذیه به بعد) امری معمول به شمار نمی‌رود. یکی از چالش‌های ملموس این حوزه فقدان شناسایی نانومواد متمایز و عملیات استخراج آنها محسوب شده و دیگری نیز فقدان روش‌های تحلیلی برای ارزیابی توزیع و اصلاح نانوذرات در درون ارگانسیم می‌باشد.

کتابنامه

[۱] استاندارد ملی ایران شماره ۱۲۱۳۶: وسایل پزشکی - کاربرد مدیریت ریسک در وسایل پزشکی

[2] ISO 10993-18, Biological evaluation of medical devices , Part 18: Chemical characterization of materials

[3] ISO/TR 13014, Nanotechnologies — Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment

[4] ISO/TR 13121, Nanotechnologies — Nanomaterial risk evaluation

[5] Russell W .M.S., & B urch R.L. The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London, 1959

[6] Hirsch C., Roessleinm M., Krug H.F., Wick P. Nanomaterial cell interactions: are current In vitro tests reliable? *Nanomedicine (Lond)*. 2011, 6 pp. 837–847

[7] Puzyn T ., L eszczynska D., L eszczynski J. Quantitative Structure–Activity Relationships (QSARs) in the European REACH System: Could These Approaches be applied to Nanomaterials? In: *Practical Aspects of Computational Chemistry*, (Leszczynski J., & Shukla N.K. Ed.). Springer Science, 2009a, pp. 201–16.

[8] Fubini B., G hiazza M., F enoglio I. Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology*. 2010, 4 pp. 347–363

[9] Fourches D ., P u D., T assa C., W eissleder R., S haw S .Y., M umper R.J. et al. Quantitative nanostructure-activity relationship modeling. *ACS Nano*. 2010, 4 pp. 5703–5712

[10] Burello E., & Worth A.P. A theoretical framework for predicting the oxidative stress potential of oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2011, 5 pp. 228–235

[11] Puzyn T., Rasulev B., Gajewicz A., Hu X., Dasari T.P., Michalkova A. et al. Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles. *Nat. Nanotechnol*. 2011, 6 pp. 175–178

[12] Sayes C., & Ivanov I. Comparative study of predictive computational models for nanoparticle induced cytotoxicity. *Risk Anal*. 2010, 30 pp. 1723–1734

[13] Liu R., Rallo R., George S., Ji Z., Nair S., Nel A.E. et al. Classification NanoSAR development for cytotoxicity of metal oxide nanoparticles. *Small*. 2011, 7 pp. 1118–1126

[14] Epa V.C., B urden F.R., T assa C ., W eissleder R., S haw S., W inkler D.A. Modeling Biological Activities of Nanoparticles. *Nano Lett*. 2012, 12 pp. 5808–5812

[15] Feliu N., & Fadeel B. Nanotoxicology: no small matter. *Nanoscale*. 2010, 2 pp. 2514–2520

[16] Fourches D., P u D., T ropsha A. Exploring Quantitative Nanostructure-Activity Relationships (QNAR) Modeling as a Tool for Predicting Biological Effects of Manufactured Nanoparticles. *Comb. Chem. High Throughput Screen*. 2011, 14 pp. 217–225

- [17] Toropov A.A., Toropova A.P., Benfenati E. SMILES-based optimal descriptors: QSAR modeling of carcinogenicity by balance of correlations with ideal slopes. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45 pp. 3581–3587
- [18] Winkler D.A., Mombelli E., Pietroiusti A., Tran L., Worth A., Fadel B. et al. Applying quantitative structure-activity relationship approaches to nanotoxicology: Current status and future potential. *Toxicology*. 2012, 12 pp. 397–406
- [19] Nel A., Xia T., Meng H., Wang X., Lin S., Ji Z. et al. Nanomaterial Toxicity Testing in the 21st Century: Use of a Predictive Toxicological Approach and High-Throughput Screening. *Acc. Chem. Res.* 2012
- [20] ISO/TR 16196, Compilation and Description of Sample Preparation and Dosing Methods for Engineered and Manufactured NMs
- [21] Locascio E.L., Reipa V., Zook J.M., Pleus R.C. Nanomaterial Toxicity: Emerging Standards and Efforts to Support Standards Development. In: *Nanotechnology Standards*, (Murashov V., & Howard J. Ed.). Springer Science, 2011, pp. 179–208.
- [22] No. 24 Preliminary Guidance Notes on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured NMs, available at <http://search.oecd.org/officialdocuments>
- [23] Oostingh G.J., Casals E., Italiani P., Colognato R., Strizinger R., Ponti J. et al. Problems and challenges in the development and validation of human cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects. *Part. Fibre Toxicol.* 2011, 8 p. 8
- [24] McNeil S.E. Challenges for nanoparticle characterization. *Methods Mol. Biol.* 2011, 697 pp. 9–15
- [25] Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O., Zhangs L.W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009, 234 (2) pp. 222–235
- [26] Rushton E.K., Jiang J., Leonard S.S., Eberly S., Castranova V., Biswas P. et al. Concept of assessing nanoparticle hazards considering nanoparticle dose-metric and chemical/biological response metrics. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2010, 73 pp. 445–461
- [27] Sayes C.M., Reed K.L., Warheit D.B. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing In vitro measurements to In vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol. Sci.* 2007, 97 pp. 163–180
- [28] Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schürch S., Kreyling W., Schulz H. et al. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ. Health Perspect.* 2005, 113 pp. 1555–1560
- [29] Rothen-Rutishauser B., Mueller L., Blank F., Brandenberger C., Muehlfeld C., Gehr P. A newly developed In vitro model of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of nanoparticles. *ALTEX*. 2008, 25 pp. 191–196
- [30] Jones C.F., & Grainger D.W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61 pp. 438–456
- [31] Petri-Fink A., & Rothen-Rutishauser B. Nanoparticles and cells: an interdisciplinary approach. *Chimia (Aarau)*. 2012, 66 pp. 104–109

- [32] Han X., Corson N., Wade-Mercer P., Gelein R., Jiang J., Sahu M. et al. Assessing the relevance of In vitro studies in nanotoxicology by examining correlations between In vitro and in vivo data. *Toxicology*. 2012, 16 pp. 1–9
- [33] Dix D.J., Houck K.A., Martin M.T., Richard A.M., Setzer R.W., Kavlock R.J. The ToxCast program for prioritizing toxicity testing of environmental chemicals. *Toxicol. Sci.* 2007, 95 pp. 5–12
- [34] Li N., Xia T., Nel A.E. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic. Biol. Med.* 2008, 44 pp. 1689–1699
- [35] Ayres J.G., Borm P., Cassee F.R., Castranova V., Donaldson K., Ghio A. et al. Evaluating the toxicity of airborne particulate matter and nanoparticles by measuring oxidative stress potential — A workshop report and consensus statement. *InhToxicol.* 2008, 20 pp. 75–99
- [36] Dobrovolskaia M.A., Aggarwal P., Hall J.B., McNeil S.E. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol. Pharm.* 2008, 5 pp. 487–495
- [37] Mudunkotuwa I.A., & Grassian V.H. Citric Acid Adsorption on TiO₂ Nanoparticles in Aqueous Suspensions at Acidic and Circumneutral pH: Surface Coverage, Surface Speciation, and Its Impact on Nanoparticle-Nanoparticle Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132 pp. 14986–14994
- [38] Hirano A., Uda K., Maeda Y., Kasaka, T., Shiraki, K. One-Dimensional Protein-Based Nanoparticles Induce Lipid Bilayer Disruption: Carbon Nanotube Conjugates and Amyloid Fibrils. *Langmuir*. 2010, 26 pp. 17256–17259
- [39] Powers K.W., Palazuelos M., Moudgil B.M., Roberts S.M. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology*. 2007, 1 pp. 42–51
- [40] Oberdorster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 2001, 74 pp. 1–8
- [41] Poland C.A., & Duffin R. Kinloch, Maynard, A., Wallace, W.A.H., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., MacNee, W., Donaldson, K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3 pp. 423–428
- [42] De Jong W.H., & Van Loveren H. Eds. *Animal models in immunotoxicology. Methods*, Vol. 41, January 2007
- [43] OECD 429, Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay
- [44] Butz T., Reinert T., Pinheiro T., Moretto P., Pallon J., Kiss A.Z. et al. Nanoderm: quality of skin as barrier to ultra-fine particles. *QLK4-CT-2002-02678*. 2007. <http://www.uni-leipzig>.
- [45] Monteiro-Riviere N.A., & Larese Filon F. Skin. In: *Adverse effects of engineered nanomaterials. Exposure, toxicology and impact on human health*. (Eds. Fadeel, F., Pietroiusti, A. Shvedova, A.A). Chapter 11. Academic Press. London-Waltham-San Diego, 2012
- [46] Monteiro-Riviere N.A., & Riviere J.E. Interaction of nanomaterials with skin: aspects of absorption and biodistribution. *Nanotoxicology*. 2009, 3 pp. 288–293

- [47] Sadrieh N., Wokovich A.M., Gopee N.V., Zheng J., Haines D., Parmiter D. et al. Lack of Significant Dermal Penetration of Titanium Dioxide from Sunscreen Formulations Containing Nano- and Submicron-Size TiO₂ Particles. *Toxicol. Sci.* 2010, 115 pp. 156–166
- [48] International Conference on Harmonization 2005, available at http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3_R2/Step4/M3_R2
- [49] Aggarwal P., Hall J.B., McLeland C.B., Dobrovolskaia M.A., McNeil S.E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61 pp. 428–437
- [50] Dobrovolskaia M.A., Patri A.K., Zheng J., Clogston J.D., Ayub N., Aggarwal P. et al. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine.* 2009, 5 pp. 106–117
- [51] Lacerda S.H., Park J.J., Meuse C., Pristinski D., Becker M.L., Karim A. et al. Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. *ACS Nano.* 2010, 4 pp. 365–379
- [52] Chen F., Castranova V., Shi X.L., Demers L.M. New insights into the role of nuclear factor-kappa B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem.* 2001, 45 pp. 7–17
- [53] Gilmour P.S., Ziesenis A., Morrison E.R., Vickers M.A., Drost E.M., Ford I. et al. Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004, 195 pp. 35–44
- [54] Mitchell L.A., Lauer F.T., Burchiel S.W., McDonald J.D. Mechanism for how inhaled multiwalled carbon nanotubes suppress systemic immune function in mice. *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4 pp. 451–456
- [55] Ryan J.J., Bateman H.R., Stover A., Gomez G., Norton S.K., Zhao W. et al. Fullerene nanomaterials inhibits the allergic response. *J. Immunol.* 2007, 179 pp. 665–672
- [56] Schöler N., Zimmerman E., Katzfey U., Hahn H., Muller R.H., Leisenfeld O. Effect of solid lipid nanoparticles (SLN) on cytokine production and viability of murine peritoneal macrophages. *J. Microencapsul.* 2000, 17 pp. 639–650
- [57] Nel A., Xia T., Madler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 2006, 311 pp. 622–627
- [58] Xia T., Kovoichich M., Brant J., Hotze M., Sempf J., Oberley T. et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett.* 2006, 6 pp. 1794–1807
- [59] Lewicka Z.A., Yu W.W., Oliva B.L., Contreras E.Q., Colvin V.L. Photochemical behavior of nanoscale TiO₂ and ZnO sunscreen ingredients. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 2013, 263 pp. 24–33
- [60] Grum-Tokars V., Ratia K., Begaye A., Baker S.C., Mesecar A.D. Evaluating the 3C-like protease activity of SARS-Coronavirus: Recommendations for standardized assays for drug discovery. *Virus.* 2007, 133 pp. 63–73
- [61] Van Maanen J.M., Borm P.J., Knaapen A., Van Herwijnen M., Schilderman P.A., Smith K.R. et al. In vitro effects of coal fly ashes: hydroxyl radical generation, iron release, and DNA damage and toxicity in rat lung epithelial cells. *Inhal. Toxicol.* 1999, 11 pp. 1123–1141

- [62] Park M.V.D.Z., Neigh A.M., Vermeulen J.P., De La Fonteyne L.J.J., Verharen H.W., Briede J.J. et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*. 2011, 32 pp. 9810–9817
- [63] Yang H., Liu C., Yang D., Zhang H., Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J. Appl. Toxicol.* 2009, 29 pp. 69–78
- [64] Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In vitro*. 2005, 19 pp. 975–983
- [65] Carlson C., Hussain S.M., Schrand A.M., Braydich-Stolle L.K., Hess K.L., Jones R.L. et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B*. 2008, 112 pp. 13608–13619
- [66] Park E.J., Cho J., Park Y.K., Park K. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology*. 2008, 245 pp. 90–100
- [67] Chang C.C., Hwang J.S., Chan C.C., Wang P.Y., Hu T.H., Cheng T.S. Effects of concentrated ambient particle on heart rate, blood pressure, and cardiac contractility in spontaneously hypertensive rats. *Inhal. Toxicol.* 2004, 16 pp. 421–429
- [68] Vallyathan V., Mentnech M.S., Stettler L.E., Dollberg D.D., Green F.H.Y. Mount St. Helens' volcanic ash: hemolytic activity. *Environ. Res.* 1983, 30 pp. 349–360
- [69] Endo M., Koyama S., Matsuda Y., Hayashi T., Kim Y.A. Thrombogenicity and blood coagulation of a microcatheter prepared from carbon nanotube-nylon-based composite. *Nano Lett.* 2005, 5 pp. 101–105
- [70] Helfenstein M., Miragoli M., Rohr S., Mueller L., Wick P., Mohr M. et al. Effects of combustion-derived ultrafine particles, manufactured nanoparticles on heart cells in vitro. *Toxicology*. 2008, 253 pp. 70–78
- [71] Li S.Q., Zhu R.R., Zhu H., Xue M., Sun X.Y., Yao S.D. et al. Nanotoxicity of TiO₂ nanoparticles to erythrocyte in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46 pp. 3626–3631
- [72] Fabian E., Landsiedel R., Ma-Hock L., Wiench K., Wohlleben W., van Ravenzwaay B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch. Toxicol.* 2007, 82 pp. 151–157
- [73] Landsiedel R., Ma-Hock L., Van Ravenzwaay B., Schulz M., Wiench K., Champ S. et al. Gene toxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UV-protection in cosmetic formulations. *Nanotoxicology*. 2010, 4 pp. 364–381
- [74] Warheit D.B., Webb T.R., Colvin V.L., Reed K.L., Sayes C.M. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol. Sci.* 2007, 95 pp. 270–280
- [75] Aisaka Y., Kawaguchi R., Watanabe S. Hemolysis caused by titanium dioxide particles. *Inhal. Toxicol.* 2008, 20 pp. 891–893
- [76] Lin Y.S., & Haynes C.L. Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132 pp. 4834–4842

- [77] Rogers E.J., Hsieh S.F., Organti N., Schmidt D., Bello D. A high throughput In vitro analytical approach to screen for oxidative stress potential exerted by nanomaterials using a biologically relevant matrix: human blood serum. *Toxicol. In vitro.* 2008, 22 pp. 1639–1647
- [78] Warheit D.B. & Donner E.M. Rationale of genotoxicity testing of nanomaterials: regulatory requirements and appropriateness of available OECD test guidelines. *Nanotoxicology.* 2010, 4 pp. 409–413
- [79] Landsiedel R., Kapp M.D., Schulz M., Wiench K., Oesch F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations – many questions, some answers. *Mutat. Res.* 2009, 681 pp. 241–258
- [80] Magdolenova Z., Collins A., Kumar A., Dhawan A., Stone V., Dusinska M. Mechanisms of genotoxicity. A review of In vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology.* 2013; Epub ahead of print
- [81] Doak S.H., Manshian B., Jenkins G.J., Singh N. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutat. Res.* 2011, 745 pp. 104–111
- [82] Kumar A., & Dhawan A. Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: an update. *Arch. Toxicol.* 2013, 87 pp. 1883–1900
- [83] Karlsson H.L. The comet assay in nanotoxicology research. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 398 pp. 651–666
- [84] OECD TG 471, Bacterial reverse mutation test
- [85] OECD TG 473, In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test
- [86] OECD TG 476, In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test
- [87] OECD TG 487, In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test
- [88] Tsuda H., Xu J., Sakai Y., Futakuchi M., Fukamachi K. Toxicology of engineered nanomaterials – a review of carcinogenic potential. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2009, 10 pp. 975–980
- [89] Nagai H., & Toyokuni S. Biopersistent fiber-induced inflammation and carcinogenesis: lessons learned from asbestos toward safety of fibrous nanomaterials. *Arch. Biochem. Biophys.* 2010, 502 pp. 1–7
- [90] Ferin J., & Oberdorster G. Translocation of particles from pulmonary alveoli into the interstitium. *Journal of Aerosol Medicine – Deposition Clearance and Effects in the Lung,* 5, 1992, pp. 179–187
- [91] Oberdorster G., Ferin J., Gleason R., Soderholm S.C, Finkelstein J. Role of the alveolar macrophage in lung injury studies with ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 1992, 97 pp. 193–199
- [92] Computational Toxicology Research. Tox21, Chemical Testing in the 21st Century, available at <http://epa.gov/ncct/Tox21/>
- [93] Huang S., Wiszniewski L., Constant S., Roggen E. Potential of In vitro reconstituted 3D human airway epithelia (MucilAir™) to assess respiratory sensitizers. *Toxicol. In vitro.* 2013 Apr, 27 (3) pp. 1151–1156

- [94] Ren D., & Daines D.A. Use of the EpiAirway model for characterizing long-term host-pathogen interactions. *J. Vis. Exp.* 2011 Sep 2, (55) p. e3261
- [95] Clift M.J., Foster E.J., Vanhecke D., Studer D., Wick P., Gehr P. et al. Investigating the interaction of cellulose nanofibers derived from cotton with a sophisticated 3D human lung cell coculture. *Biomacromolecules*. 2011, 10 pp. 3666–3673
- [96] Alfaro-Moreno E., Nawrot T.S., Vanaudenaerde B.M., Hoylaerts M.F., Vanoirbeek J.A., Nemery B. et al. Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban PM10. *Eur. Respir. J.* 2008, 32 pp. 1184–1194
- [97] Roten-Rutishauser B., Brown D.M., Piallier-Boyles M., Kinloch I.A., Windle A.H., Gehr P. et al. Relating the physicochemical characteristics and dispersion of multiwalled carbon nanotubes in different suspension media to their oxidative reactivity in vitro and inflammation in vivo. *Nanotoxicology*. 2010, 4 pp. 331–342
- [98] Könczöl M., Ebeling S., Goldenberg E., Treude F., Gminski R., Gieré R. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK, and NF- κ B. *Chem. Res. Toxicol.* 2011 Sep 19, 24 (9) pp. 1460–1475 Epub 2011 Jul 18. DOI: doi: 10.1021/tx200051s
- [99] Diabate S., Mueulhopt S., Paur H.R., Krug H.F. The response of a co-culture lung model to fine and ultrafine particles of incinerator fly ash at the air-liquid interface. *Altern. Lab. Anim.* 2008, 36 pp. 285–298
- [100] Lademann J., Knorr F., Richter H., Blume-Peytavi U., Vogt A., Antoniou C. et al. Hair follicles – an efficient storage and penetration pathway for topically applied substances. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2008, 21 pp. 150–155
- [101] Kiss B., Biro T., Czifra G., Toth B., Kertes Z., Szikszai Z. et al. Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. *Exp. Dermatol.* 2008, 17 pp. 659–667
- [102] OECD TG 428, Skin Absorption: In vitro Method
- [103] Mavon A., Miquel C., Lejeune O., Payre B., Moretto P. In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and mineral sunscreen. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2007, 20 pp. 10–20
- [104] Baroli B., Ennas M., Loffredo F., I sola M., Pinna R., Lopez-Quintela M.A. Penetration of metallic nanoparticles in human Full thickness skin. *J. Invest. Dermatol.* 2007, 127 pp. 1701–1712
- [105] Wissing S., & Mueller R. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: In vitro release and in vivo skin penetration. *J. Control. Release.* 2002, 81 pp. 225–233
- [106] OECD 431, In vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method
- [107] OECD 435, In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion
- [108] OECD 430, In vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER)
- [109] OECD TG 439, In vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method

- [110] Jírová D., Basketter D., Liebsch M., Bendová H., Kejllová K., Marriott M. et al. Comparison of human skin irritation patch test data with In vitro skin irritation assays and animal data. *Contact Dermat.* 2010 Feb, 62 (2) pp. 109–116
- [111] Lee T.L., Raitano J.M., Rennert O.M., Chan S.W., Shan W.Y. Accessing the genomic effects of naked nanoceria in murine neuronal cells. *Nanomedicine.* 2012, 8 pp. 599–608
- [112] Fingerman I.M., McDaniel L., Zhang X.A., Ratzat W., Hassan T., Jiang Z.F. et al. NCBI Epigenomics: A new public resource for exploring epigenomics data sets. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39 pp. D908–D912
- [113] Roh J., Umh H.N., Sung H.K., Lee B.C., Kim Y. Repression of photomediated morphological changes of silver nanoplates. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2012, 415 pp. 449–453
- [114] Lu W., Tan Y.Z., Jiang X.G. Establishment of coculture model of blood-brain barrier In vitro for nanoparticle's transepytosis and toxicity evaluation. *Yao Xue Xue Bao.* 2006, 41 pp. 296–304
- [115] Myllynen P.K., Loughran M.J., Howard C.V., Sormunen R., Walsh A.A., Vähäkangas K.H. Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta. *Reprod. Toxicol.* 2008, 26 pp. 130–137
- [116] Peters A.K., Wouwer G.V., Weyn B., Verheyen G.R., Vanparys P., Gompel J.V. Automated analysis of contractility in the embryonic stem cell test, a novel approach to assess embryotoxicity. *Toxicol. In vitro.* 2008, 22 pp. 1948–1956
- [117] Sin A., Chin K.C., Jamil M.F., Kosto Y., Rao G., Shuler M.L. The design and fabrication of three-chamber microscale cell culture analog devices with integrated dissolved oxygen sensors. *Biotechnol. Prog.* 2004, 20 pp. 338–345
- [118] Walker G.M., Monteiro-Riviere N., Rouse J., O'Neill A.T. A linear dilution microfluidic device for cytotoxicity assays. *Lab Chip.* 2007, 7 pp. 226–232
- [119] Gottwald E., Giselbrecht S., Augspurger C., Lahni B., Dambrowsky N., Truckenmüller R. et al. A chip-based platform for the in vitro generation of tissues in three-dimensional organization. *Lab Chip.* 2007, 7 pp. 777–785
- [120] Huh D., Matthews B.D., Mammoto A., Montoya-Zavala M., Hsin H.Y., Ingber D.E. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science.* 2010, 328 pp. 1662–1668
- [121] Huh D., Leslie D.C., Matthews B.D., Fraser J.P., Jurek S., Hamilton G.A., Thorneloe K.S., McAlexander M.A., Ingber D.E. A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice. *Sci Transl Med.* 4:159ra147 doi: 2012 doi:10.1126/scitranslmed.3004249
- [122] Kim H.J., Huh D., Hamilton G., Ingber D.E. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip.* 2012, 21 pp. 2165–2174
- [123] Andreasen E.A., Tanguay R.L., Peterson R.E., Heideman W. Identification of a critical amino acid in the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 2002, 277 pp. 13210–13218
- [124] Haendel M.A., Tilton F., Bailey G.S., Tanguay R.L. Developmental toxicity of the dithiocarbamate pesticide sodium metam in zebrafish. *Toxicol. Sci.* 2004, 81 pp. 390–400

- [125] Harper S .L., Dahl J .L, Maddux B .L.S., Tanguay R .L, Hutchinson J .E. Proactively designing nanomaterials to enhance performance and minimize hazard. *International Journal of Nanotechnology*. 2008, 5 pp. 124–142
- [126] Harper S.L., Usenko C., Hutchinson J.E., Maddux B.L.S., Tanguay R.L. درون تنی biodistribution and toxicity depends on nanomaterial composition, size, surface functionalization and route of exposure. *Journal of Experimental Nanoscience*. 2008, 3 pp. 195–206
- [127] Lein P., Silbergeld E., Locke P., Goldberg A.M. In vitro and other alternative approaches to developmental neurotoxicity testing (dnt). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2005, 19 (3) pp. 735–744
- [128] Mathew L .K, Andreasen E .A, Tanguay R.L. Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits regenerative growth. *Mol. Pharmacol.* 2006, 69 pp. 257–265
- [129] Saili K.S., Simonich M.T., Tanguay R.L. Developmental Neurobehavioral Toxicity of Bisphenol A: Defining the Role of Estrogen Related Receptor Gamma. *Toxicologist*. 2010, 114 p. 1392
- [130] Tal T.L., Franzosa J.A., Menelaou E., Svoboda K., Tanguay R.L. The Developmental Neurotoxicity of MicroRNAs. *Toxicologist*. 2010, 114 p. 172
- [131] Petersen E.J., Huang Q.G., Weber W.J. Bioaccumulation of radio-labeled carbon nanotubes by *Eisenia foetida*. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42 pp. 3090–3095
- [132] Petersen E.J., Huang Q.G., Weber W.J. Ecological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Lumbricus variegatus*. *Environ. Health Perspect.* 2008, 116 pp. 496–500
- [133] Warheit D .B., Reed K .L., DeLorme M .P. Embracing a Weight-of-Evidence Approach for Establishing NOAELs for Nanoparticle Inhalation Toxicity Studies. *Toxicol. Pathol.* 2013, 41pp. 387–394
- [134] Silva V.M., Corson N., Elder A., Oberdorster G. The rat ear vein model for investigating in vivo thrombogenicity of ultrafine particles (UFP). *Toxicol. Sci.* 2005, 85 pp. 983–989
- [135] Handy R.D., van den Brink N., Chappel M., Mühlhling M., and Behra R., Dusinska M. et al. Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far? *Ecotoxicology*. 2012, 21 pp. 933–972
- [136] Handy R.D., Cornelis G., Fernandes T., Tsyusko O., Decho A., Sabo-Atwood T. et al. Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: practical experiences and recommendations from the bench. *Environ. Toxicol. Chem.* 2012, 31 pp. 15–31
- [137] OECD 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, 3 days
- [138] OECD 202, *Daphnia* sp, Acute Immobilisation Test, 2 days
- [139] ISO 10872, Water quality — Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda)
- [140] ASTM E2172-01, Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity Tests with the Nematode *Caenorhabditis elegans*
- [141] Petersen E.J., & Henry T.B. Methodological considerations for testing the ecotoxicity of carbon nanotubes and fullerenes [Review]. *Environ. Toxicol. Chem.* 2012, 31 pp. 60–72

- [142] Insam H. A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: *Microbial Communities: Functional Versus Structural Approaches*, (Insam H., & Rangger A. eds.). Springer-Verlag, Berlin, 1997
- [143] OECD TG 209, Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)
- [144] Petersen E.J., Zhang L.W., Mattison N.T., O'Carroll D.M., Whelton A.J., Uddin N. et al. Potential Release Pathways, Environmental Fate, And Ecological Risks of Carbon Nanotubes. *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45 pp. 9837–9856
- [145] Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ. Health Perspect.* 2004, 112 pp. 1058–1062
- [146] Henry T.B., Menn F.M., Fleming J.T., Wilgus J., Compton R.N., Sayler G.S. Attributing effects of aqueous C60 nano-aggregates to tetrahydrofuran decomposition products in larval zebrafish by assessment of gene expression. *Environ. Health Perspect.* 2007, 115 pp. 1059–1065
- [147] Taurozzi J.S., Hackley V.A., Wiesner M.R. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment – issues and recommendations. *Nanotoxicol.* 2010, 5 pp. 711–729
- [148] Unrine J.M., Hunyadi S.E., Tsyusko O.V., Rao W., Shoults-Wilson W.A., Bertsch P.M. Evidence for Bioavailability of Au Nanoparticles from Soil and Biodistribution within Earthworms (*Eisenia fetida*). *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44 pp. 8308–8313
- [149] Judy J.D., Unrine J.M., Bertsch P.M. Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain. *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45 pp. 776–781
- [150] Lin S.J., Reppert J., Hu Q., Hudson J.S., Reid M.L., Ratnikova T.A. et al. Uptake, Translocation, and Transmission of Carbon Nanomaterials in Rice Plants. *Small.* 2009, 5 pp. 1128–1132
- [151] Unrine J.M., Hunyadi S.E., Tsyusko O.V., Rao W., Shoults-Wilson W.A., Bertsch P.M. Evidence for Bioavailability of Au Nanoparticles from Soil and Biodistribution within Earthworms (*Eisenia fetida*). *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44 pp. 8308–8313
- [152] Khodakovskaya M.V., de Silva K., Nedosekin D.A., Dervishi E., Biris A.S., Shashkov E.V. et al. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011, 108 pp. 1028–1033
- [153] Jackson B.P., Pace H., Lanzarotti A., Smith R., Rånville J.F. Synchrotron X-ray 2D and 3D elemental imaging of CdSe/ZnS quantum dot nanoparticles in *Daphnia magna*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 394 pp. 911–917
- [154] Ghafari P., St-Denis C.H., Power M.E. Jr, Tsou V., Mandal H.S. et al. Impact of carbon nanotubes on the ingestion and digestion of bacteria by ciliated protozoa. *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3 pp. 347–351
- [155] Holbrook R.D., Kline C.N., Filliben J.J. Impact of source water quality on multiwall carbon nanotube coagulation. *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44 pp. 1386–1391

[156] Bouldin J.L., Ingle T.M., Sengupta A., Alexander R., Hannigan R.E., Buchanan R.A. Aqueous toxicity and food chain transfer of quantum Dots (TM) in freshwater algae and Ceriodaphnia dubia. Environ. Toxicol. Chem. 2008, 27 pp. 1958–1963

[157] Zhu X.S., Wang J.X., Zhang X.Z., Chang Y., Chen Y.S. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. Chemosphere. 2010, 79 pp. 928–933

[158] Werlin R ., P riester J.H., Mielke R .E, K ramer S., J ackson S., S toimenov P.K. et al. Biomagnification of cadmium selenide quantum dots in a simple experimental microbial food chain. Nat. Nanotechnol. 2011, 6 pp. 65–71