INSO
22889
1st Edition
2021

Modification of:
ISO 22082:
2020

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۲۲۸۸۹
چاپ اول
۱۳۹۹

دارای محتوای رنگی

فناوری نانو – ارزیابی سمیت نانومواد با استفاده از جنین کوریون‌زدایی‌شده ماهی گورخری

Nanotechnology— Assessment of nanomaterial toxicity using dechorionated zebrafish embryo

ICS:07.120

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران،ضلع جنوب‌غربی میدان ونک،خیابان ولی‌عصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن:۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱(۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴(۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.gov.ir

وبگاه: http://www.isiri.gov.ir

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No.2592 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.gov.ir

Website:http://www.isiri.gov.ir

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی را به‌عهده 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 منصفانهٔ 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 پیشنهادها در کمیتهٔ‌ملی 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 درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ‌ملی 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)[1]،کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] 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 استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ 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، گواهینامهٔ 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 of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
4-Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«فناوری نانو – ارزیابی سمیت نانومواد با استفاده از جنین کوریون‌زدایی‌شده ماهی گورخری»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
قاضی‌خوانساری، محمود (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	عضو هیئت علمی – دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
دبیر:	
جوهری، سیّدعلی (دکتری تخصصی تکثیر و پرورش آبزیان)	عضو هیئت علمی – دانشگاه کردستان
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اسلامی‌پور، الهه (کارشناسی ارشد زیست‌شناسی)	کارشناس – کارگروه استاندارد و ایمنی ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
پوی‌پوی، حسن (کارشناسی ارشد شیمی)	دبیر – کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISIRI/TC 229
کلباسی مسجدشاهی، محمّدرضا (دکتری تخصصی تکثیر و پرورش آبزیان)	عضو هیئت علمی – دانشگاه تربیت مدرس
کوهی، محمّدکاظم (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	عضو هیئت علمی – دانشگاه تهران
سرخیل، مهرداد (دکتری تخصصی تکثیر و پرورش آبزیان)	عضو هیئت علمی – دانشگاه فردوسی مشهد
سوری‌نژاد، ایمان (دکتری تخصصی تکثیر و پرورش آبزیان)	عضو هیئت علمی – دانشگاه هرمزگان
سیفی، مهوش (کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)	نایب رئیس – کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISIRI/TC 229
منهاج‌نیا، رابعه (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	کارشناس مسئول – کمیته فناوری نانو- سازمان دامپزشکی کشور

ویراستار:

سیفی، مهوش
(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

سمت و/یا محل اشتغال:

نایب رئیس – کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISIRI/TC 229

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
پیش‌گفتار	ط
مقدمه	ی
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاحات و تعاریف	۲
۴ کوته‌نوشت‌ها	۳
۵ مواد	۴
۵-۱ جاندار (ماهی گورخری، *Danio rerio*)	۴
۵-۲ محلول ذخیره	۵
۵-۳ کنترل مثبت	۵
۶ دستگاه‌ها	۵
۶-۱ تجهیزات فنّی	۵
۶-۱-۱ ظروف آزمون	۵
۶-۱-۲ گرم‌خانه	۶
۶-۱-۳ میکروسکوپ	۶
۶-۱-۴ حوضچه‌های تخم‌ریزی	۶
۶-۱-۵ پیپت	۶
۶-۲ ابزار آنالیز	۶
۶-۲-۱ میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)	۶
۶-۲-۲ میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)	۷
۶-۲-۳ پراکندگی نوری پویا (DLS)	۷
۶-۲-۴ پراکندگی نوری چندگانه ایستا (SMLS)	۷
۶-۲-۵ طیف‌سنجی جرمی پلاسمای جفت‌شده القایی (ICP-MS)	۷
۷ روش‌های اجرایی	۷
۷-۱ کشت	۷
۷-۱-۱ نژاد ماهی گورخری	۷

عنوان **صفحه**

۷-۱-۲ رژیم خوراکی ۷
۷-۱-۳ دوره نوری ۸
۷-۱-۴ دما و pH ۸
۷-۱-۵ جنس حوضچه ۸
۷-۲ تحریک تخم‌ریزی ۸
۷-۳ کوریون‌زدایی جنین‌ها ۸
۷-۳-۱ روش‌ها ۸
۷-۳-۲ روش کوریون‌زدایی آنزیمی ۹
۷-۴ آماده‌سازی محلول ذخیره نانومواد ۱۰
۷-۵ غلظت‌های موردآزمون ۱
۷-۶ پراکنش نانومواد ۱۱
۷-۷ ماده شیمیایی کنترل مثبت: ۴،۳-دی‌کلروآنیلین ۱۱
۷-۸ روش‌های آزمون ۱۱
۷-۸-۱ اندازه‌گیری کیفیت آب ۱۱
۷-۸-۲ آماده‌سازی جنین‌های کوریون‌زدایی‌شده ۱۱
۷-۸-۳ مواجهه ۱۲
۷-۸-۴ مشاهده نقاط انتهایی ۱۳
۷-۹ تحلیل داده‌ها ۱۳
۸ گزارش آزمون ۱۴
۸-۱ روش آزمون ۱۴
۸-۲ اطلاعاتی که باید در گزارش آزمون گنجانده شود ۱۴
۸-۲-۱ نانومواد موردآزمون ۱۴
۸-۲-۲ گونه موردآزمون ۱۴
۸-۲-۳ مواد و دستگاه‌ها ۱۴
۸-۲-۴ نگهداری ۱۴
۸-۲-۵ طراحی آزمون ۱۵
۸-۲-۶ شرایط آزمون ۱۵
۸-۲-۷ نتایج ۱۵

عنوان	صفحه
پیوست الف (آگاهی‌دهنده) روش کوریون‌زدایی مکانیکی	۱۶
پیوست ب (آگاهی‌دهنده) روش‌های تخم‌گیری از ماهی گورخری	۱۸
پیوست پ (آگاهی‌دهنده) صحّه‌گذاری نتایج	۱۹
پیوست ت (آگاهی‌دهنده) تغییرات اعمال شده در متن استاندارد ملی در مقایسه با منبع	۲۰
کتاب‌نامه	۲۱

پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو- ارزیابی سمیت نانومواد با استفاده از جنین کوریون‌زدایی‌شده ماهی گورخری» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به‌عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد پ، بند ۷، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تهیه و تدوین شده، در نود و ششمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۳۹۹/۱۲/۰۵ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ 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 زیر به روش «ترجمهٔ تغییریافته» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی همراه با اعمال تغییرات با توجه به مقتضیات کشور است:

ISO/TS 22082:2020, Nanotechnologies — Assessment of nanomaterial toxicity using dechorionated zebrafish embryo

مقدمه

در مطالعات ارزشیابی سمیت مواد شیمیایی در محیط‌های آبی، استفاده از ماهی روشی مهم و رایج است. هرچند، در رابطه با استفاده از جانوران مهره‌دار، از جمله ماهیان، در آزمون مواد شیمیایی، نگرانی‌هایی در زمینه رفاه حیوانات[1] وجود دارد. به‌عنوان یک آزمون جایگزین، استفاده از مراحل اولیه زندگی جنینی به جای استفاده از ماهیان نوجوان یا بزرگسال موردتوجه قرار گرفته‌است، چرا که از نظر رفاه حیوانات، استفاده جایگزین از جنین‌های ماهی دارای منافع بیشتری است و به‌طور واضح نسبت به استفاده از ماهیان نوجوان تکامل‌یافته‌تر (همان‌گونه‌که در رهنمود آزمون شماره203 TG[2] توسط سازمان همکاری اقتصادی و توسعه (OECD)[3] پیشنهاد شده‌است) تنش[4] کمتری ایجاد می‌کند.

فناوری نانو اثرات مثبتی بر بخش‌های تجاری گوناگون داشته است، اما نگرانی‌هایی در رابطه با تأثیرات زیست‌محیطی بالقوه نامطلوب ناشی از محصولات نانوپدید باقیمانده است. در رهنمود آزمون OECD برای استفاده از جنین ماهیان در ارزشیابی سمیت حاد (به OECD TG 236 مراجعه شود) اشاره شده که برخی از مواد با وزن مولکولی بالاتر از ۳ کیلو دالتون، ساختار مولکولی توده‌ای و موادی که باعث تاخیر در تخم‌گشایی می‌شوند، ممکن است برای آزمون با استفاده ازاین روش مناسب نباشند. همچنین حضور لایه کوریون[5] می‌تواند ارزیابی صحیح فعالیت زیستی نانومواد را غیرممکن سازد. کوریون، خارجی‌ترین پوشش غیرسلولی جنین ماهی است و می‌تواند به‌عنوان مانعی برای مواجهه با برخی مواد شیمیایی و نانومواد عمل کند. درحال‌حاضر امکان پیش‌بینی این که کوریون ممکن است مانع ورود کدام نانومواد شود وجود ندارد. استفاده از جنین‌های کوریون‌زدایی‌شده[6] برای ارزیابی سمیت ممکن است اطلاعات اکوتوکسیکولوژی مستقیمی را فراهم نکند، اما ممکن است به تشخیص بهتر نانوموادی که دارای پتانسیل مخاطره هستند کمک کنند. بر همین اساس پژوهشگران زیادی در نقاط مختلف جهان روش‌هایی را برای زدودن کوریون از مراحل اولیه زندگی جنین‌های ماهی گورخری[7] تدوین کرده‌اند [2][1]. دو روش برای جداسازی کوریون از جنین‌ها وجود دارد: روش مکانیکی و روش آنزیمی. روش کوریون‌زدایی آنزیمی نسبت به روش کوریون‌زدایی مکانیکی برتری‌هایی دارد (به پیوست**الف**مراجعه شود)، که شامل کارآیی زمانی و نیروی انسانی به علت سادگی آماده‌سازی برای کوریون‌زدایی، عدم آسیب مکانیکی به جنین و قابلیت آماده‌سازی هم‌زمان تعداد زیادی جنین کوریون‌زدایی‌شده برای

1- Animal welfare
2- Test Guide
3- Organisation for Economic Cooperation and Development
4- Stress
5- Chorion
6- Dechorionated
7- Zebrafish

روش‌هایی است که مبتنی برتوان بالا[1] هستند. از سوی دیگر، یکی از معایب این روش مربوط می‌شود به متفاوت بودن فعالیت پروناز[2] که می‌تواند میزان[3] موفقیت در حذف کوریون را تحت‌تأثیر قرار دهد. پژوهشگران زیادی از جنین‌های کوریون‌زدایی‌شده برای ارزیابی سمیت مواد شیمیایی و نانومواد استفاده کرده‌اند [6][5][4][3]. هرچند، این روش‌ها هنوز به‌طور کامل استانداردسازی نشده‌اند [10][9][8][7].

سنجش سمیت با استفاده از جنین‌های کوریون‌زدایی‌شده ماهی گورخری می‌تواند برای آشکارسازی نانومواد دارای پتانسیل مخاطره، به عنوان سامانه‌ای جایگزین سامانه‌های متّکی بر دیگر مهره‌داران، عمل کند. از آنجاکه استفاده از جانوران مدل تکامل‌یافته‌تر، برای انجام آزمون‌های سمیت در حال بهبود است، نیاز فزاینده‌ای به روش‌های آزمون جایگزین وجود دارد. ماهی گورخری در مراحل اولیه زندگی (تا زمان تغذیه مستقل، مثلا ۱۲ ساعت بعد از لقاح) می‌تواند یک مدل جایگزین عالی در آزمون‌های سمیت درون‌تن باشد [27][26][25][24][23][22]. ماهی گورخری در مقایسه با دیگر جانوران مدل برای ارزیابی سمیت، دارای برتری‌هایی از قبیل سادگی نسبی پرورش و زادآوری، باروری بالا (لقاح خارجی است و هر ماهی ماده ۲۰۰ جنین تا ۳۰۰ جنین تولید می‌کند)، زمان کوتاه تجدید نسل (تقریبا ۳ ماه تا بلوغ طول می‌کشد)، در دسترس بودن منابع ژنومی (توالی‌یابی کامل ژنوم ماهی گورخری انجام شده‌است) و شباهت ژنتیکی به انسان است. در حدود ۷۰ درصد بیماری‌های انسان حداقل یک ژن ارتاساخت[4] در ماهی گورخری دارند و ۸۴ ۸۴ درصد ژن‌های انسان که با بیماری‌ها مرتبط هستند، دارای ژن‌های ارتاساخت در ماهی گورخری هستند [11]. بنابراین استفاده از ماهی گورخری برای ارزیابی سمیت مواد شیمیایی در حال افزایش است.

این استاندارد روش بهینه‌شده‌ای را برای حذف کوریون همراه با توصیه‌هایی در مورد چگونگی انجام مطالعات سمیت با استفاده از جنین‌های کوریون‌زدایی‌شده ماهی گورخری ارائه می‌دهد. همچنین در این استاندارد در مورد مزایای سنجش سمیت ماهی با استفاده از جنین‌های کوریون‌زدایی‌شده بحث شده‌است.

۱- در اینجا منظور از روش های مبتنی بر توان بالا (High-throughput based approach)، استفاده از سامانه‌های تمام خودکار با سرعت و دقّت بالا در غربالگری سمیت نانومواد است.

2- Pronase
3- Rate
4- Orthologue

فناوری نانو – ارزیابی سمیت نانومواد با استفاده از جنین کوریون‌زدایی‌شده ماهی گورخری

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روشی برای ارزیابی سریع سمیت نانومواد است (مراحل اولیه زندگی ماهی، از صفر ساعت پس از لقاح تا ۱۲۰ ساعت پس از لقاح). این استاندارد شامل اطلاعاتی در مورد اهمیت زدودن کوریون غیرسلولی، روش‌های دقیق زدودن کوریون و پروتکل کاملی برای ارزیابی سمیت نانومواد با استفاده از جنین کوریون‌زدایی‌شده ماهی گورخری است. تمرکز این استاندارد بر آزمون سمیت نانومواد است.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به‌صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده‌است. بدین‌ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

درصورتی‌که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده‌است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است.

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

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

2-3 ISO/TS 12805, Nanotechnologies — Materials specifications — Guidance on specifying nano-objects

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۴۶۴: سال ۱۳۹۲، فناوری نانو – ویژگی‌های مواد – راهکاری برای تعیین ویژگی‌های نانواشیاء، با استفاده از استاندارد ISO/TS 12805: 2011 تدوین شده‌است

2-4 ISO/TR 13014, Nanotechnologies — Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۲۰۶: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو - راهنمای مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی مواد نانومقیاس مهندسی‌شده برای ارزیابی توکسیکولوژیک، با استفاده از استاندارد ISO/TR 13014: 2012 تدوین شده‌است

2-5 ISO/TS 17200, Nanotechnology — Nanoparticles in powder form — Characteristics and measurements

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۷۸۵: سال ۱۳۹۴، فناوری نانو- نانوذرات پودری شکل – مشخصه‌ها و اندازه‌گیری‌ها، با استفاده از استاندارد ISO/TS 17200: 2013 تدوین شده‌است

2-6 ISO/TR 18196, Nanotechnologies — Measurement technique matrix for the characterization of nano-objects

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۶۱۱: سال ۱۳۹۶، فناوری نانو - ماتریس روش اندازه‌گیری برای مشخصه‌یابی نانواشیاء، با استفاده از استاندارد ISO/TR 18196: 2016 تدوین شده‌است

2-7 ISO 22412, Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS)

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۲۴۷: سال ۱۳۹۲، آنالیز اندازه ذره- پراکندگی نور دینامیک DLS، با استفاده از استاندارد ISO 22412: 2017 تدوین شده‌است

2-8 OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for theTesting of Chemicals. Section 2. OECD Publishing, Paris, 2013

۳ اصطلاحات و تعاریف

برای اهداف این استاندارد، علاوه بر اصطلاحات و تعاریف ارائه‌شده در استانداردهای ملی ایران-ایزو ۸۰۰۰۴-۱ و ۸۰۰۰۴-۲ و استانداردهای ISO/TS 12805، ISO/TR 13014، ISO/TS 12700 و OECD TG 236، اصطلاحات و تعاریف زیرنیز به‌کار می‌رود[۱]:

۳-۱

عامل حل‌کننده

solubilizing agent

حلال یا پراکنده‌سازی که می‌تواند نانومواد را در محلول، پراکنده و پایدار کند.

۳-۲

تخم‌ریزی

spawning

رهاسازی تخمک‌ها به داخل آب برای لقاح است.

۱- اصطلاحات و تعاریف به کاررفته در استانداردهای ISO و IEC در وبگاه‌های https://www.iso.org/obp و http://www.electropedia.org/ قابل‌دسترس است.

۳-۳

کنترل مثبت

positive control

ماده و/یا موادی به خوبی مشخصه‌یابی‌شده است که هرگاه به‌وسیله یک روش آزمون معین مورد ارزشیابی قرار می‌گیرد، مناسب بودن سامانه و تکرارپذیری پاسخ ها و نتایج یا پاسخ واکنشی حاصل از آن را نشان می‌دهد.

[منبع: زیربند ISO 10993: 2010, 3.14]

۴-۳

آزمون یافتن محدوده

range-finding test

آزمون حاد به‌صورت مختصر است که در آن جانداران موردآزمون در برابر محدوده گسترده‌ای از محلول‌های آزمون نانومواد قرار می‌گیرند تا دامنه غلظت‌های مورداستفاده در آزمون نهایی مشخص شود.

یادآوری- این آزمون حداقل شامل پنج غلظت از نانوماده و گروه شاهد تیمار نشده‌است.

[منبع: OECD TG 236: 2013- تغییریافته]

۵-۳

LC_{50}[1]

غلظتی از یک ماده سمی که برای نیمی (۵۰ درصد) از یک گروه از جانداران موردآزمون کشنده است.

یادآوری- معمولا مواجهه با ماده مداوم است و LC_{50} با اشاره به یک دوره زمانی مشخص مواجهه تعریف می‌شود.

[منبع: ISO 6107-3: 1993]

۴ کوته‌نوشت‌ها

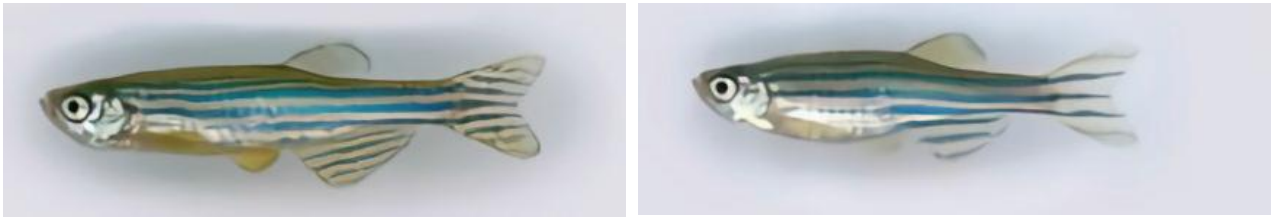
DPF	Day Post Fertilization	تعداد روز پس از لقاح
EM	Embryo Media	محیط‌کشت جنینی
HPF	Hour Post Fertilization	تعداد ساعت پس از لقاح
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	سطح فاقد اثر نامطلوب قابل‌مشاهده
DO	Dissolved Oxygen	اکسیژن محلول

1- Median Lethal Concentration

۵ مواد

۵-۱ جاندار (ماهی گورخری، *Danio rerio*)

ماهی گورخری (*Dani orerio*، به شکل ۱ مراجعه شود) یک ماهی استخوانی گرمسیری ساکن آب شیرین است که به خانواده کپورماهیان[1] تعلق دارد و به‌صورت طبیعی در هند، پاکستان، بنگلادش، نپال و برمه پراکنده است. میانگین اندازه ماهیان بالغ ۲ سانتی‌متر تا ۳ سانتی‌متر است و همچون گورخر، در طرفین بدن این ماهی نوارهای آبی رنگ مشاهده می‌شوند. ماهی گورخری نر بالغ، بدنی لاغرتر با راه‌راه‌های رنگی آبی و طلایی دارد. ماهی ماده دارای شکمی مایل به سفید و بزرگتر از نرها است و راه‌راه‌های بدن آن به جای طلایی، نقره‌ای است. این گونه را می‌توان در آکواریوم نگهداری و زادآوری کرد. طول دوره زندگی ماهی گورخری تقریبا ۲ تا ۳ سال است. اندام‌زایی ماهی گورخری طی ۵ روز پس از لقاح تکمیل می‌شود و طی تقریبا ۳ ماه این ماهی به بلوغ می‌رسد.

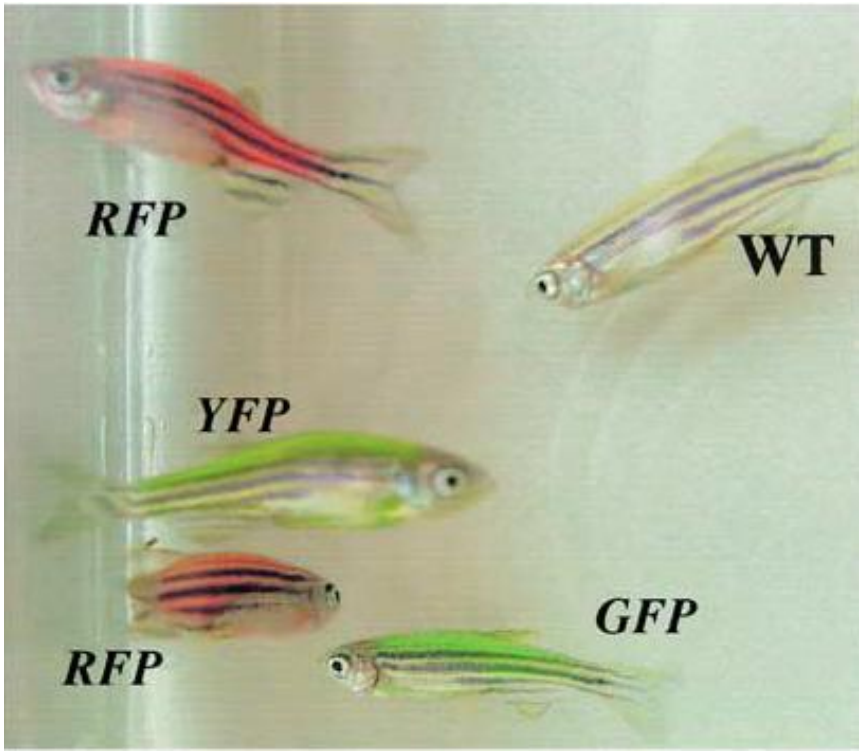


ماده نر

شکل ۱- ماهی گورخری

یادآوری- در ایران انواعی از ماهیان گورخری به رنگ قرمز و نارنجی دردسترس هستند که معمولا در انواع مطالعات زیستی، از جمله مطالعات توکسیکولوژی، از آن‌ها استفاده می‌شود. این ماهیان تراریخته[2]، از طریق انتقال ژن RFP[3] تولید شده‌اند و البته در دنیا انواع دیگری از آن‌ها نیز وجود دارند که از طریق انتقال ژن‌های GFP[4] و YFP[5] به‌ترتیب به رنگ‌های سبز و زرد نیز تولید شده‌اند. ضروری است درصورت استفاده از ماهیان گورخری تراریخته در آزمون‌های توکسیکولوژی، در گزارش به این نکته اشاره شود.

1- Cyprinidae
2- Transgenic
3- Red Fluorescent Protein
4- GreenFluorescent Protein
5- YellowFluorescent Protein



شکل ۲- ماهیان گورخری تراریخته (RFP، GFP و YFP) در مقایسه با ماهی گورخری نژاد وحشی (WT)[1]

۵-۲ محلول ذخیره، به‌صورت تازه و به‌وسیله آب خالص‌سازی‌شده[2] تهیه می‌شود.

یادآوری - منظور از آب خالص‌سازی‌شده، آبی است که از دستگاه‌های آب‌خالص‌ساز آزمایشگاهی که املاح آب را از طریق فیلتراسیون شیمیایی جذب می‌کنند، به‌دست می‌آید. استفاده از آب مقطر که از طریق تبخیر و میعان مجدد آب املاح آن گرفته شده‌است نیز برای ساخت محلول‌ذخیره امکان‌پذیر است.

۵-۳ کنترل مثبت، از ۴،۳-دی‌کلروآنیلین[3] (3,4-DCA) (CAS# 95-76-1) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده می‌شود.

۶ دستگاه‌ها

۶-۱ تجهیزات فنّی

۶-۱-۱ ظروف آزمون

1- Wild Type
2- Purified water
3- 3,4-Dichloroaniline

می‌توان از پلیت‌های چندچاهکه (۶ چاهک یا ۱۲ چاهک) استفاده کرد. برای جلوگیری از تبخیر در زمان مواجهه، ظروف آزمون باید با یک لایه زیست‌سازگار[1] (مانند: پارافیلم یا سلفون محافظ غذا) درزبندی[2] شوند.

۶-۱-۲ گرم‌خانه[3]

گرم‌خانه‌های آزمایشگاهی با قابلیت کنترل دما (۱±۲۷ درجه سلسیوس) و دوره نوری (۱۰ ساعت روشنایی، ۱۴ ساعت تاریکی) می‌توانند مورداستفاده قرار گیرند.

۶-۱-۳ میکروسکوپ

استریومیکروسکوپ[4] یا میکروسکوپ وارونه[5] با قابلیت بزرگنمایی حداقل ۸۰ برابر می‌توانند مورداستفاده قرار گیرند.

۶-۱-۴ حوضچه‌های تخم‌ریزی

حوضچه‌های تخم‌ریزی می‌توانند در هر ابعاد و با هر نوع طراحی ساخته شوند و معمولا شامل یک قفسه جفت‌گیری[6] (زایشگاه) و یک ظرف کمی بزرگتر هستند.

قفسه‌های جفت‌گیری که در قسمت کف دارای سوراخ‌هایی (با اندازه ۰٫۵±۲ میلی‌متر) هستند، باعث می‌شوند تخم‌های تازه رهاشده به قسمت پایین (درون ظرف اصلی) سقوط کنند و توسط والدین خورده نشوند.

۶-۱-۵ پیپت

می‌توان از یک پیپت تک‌کاناله استفاده کرد.

۶-۲ ابزار آنالیز

از ابزارهای آنالیز ارائه‌شده در استاندارد ISO/TR 18196 و موارد زیر استفاده کنید:

۶-۲-۱ میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)[7]

میکروسکوپ الکترونی روبشی که تصاویر بزرگنمایی‌شده از نانومواد را به‌وسیله روبش سطح با استفاده از پرتو الکترون تولید می‌کند.

1- Biocompatible
2- Seal
3- Incubator
4- Stereo microscope
5- Inverted microscope
6- Mating cage
7- Scanning Electron Microscopy

۶-۲-۲ میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)[1]

میکروسکوپ الکترونی عبوری که تصاویر بزرگنمایی‌شده از نانومواد را با استفاده از پرتو الکترونی تولید می‌کندکه از میان نمونه عبور می‌کند و با آن برهم‌کنش دارد.

۶-۲-۳ پراکندگی نوری پویا (DLS)[2]

دستگاه DLS برای تعیین ویژگی پروفایل توزیع اندازه نانومواد در مایعات است.

۶-۲-۴ پراکندگی نوری چندگانه ایستا (SMLS)[3]

دستگاه SMLS برای آنالیز تغییرات اندازه ذرات در پراکنش[4]های غلیظ است.

۶-۲-۵ طیف‌سنجی جرمی پلاسمای جفت‌شده القایی (ICP-MS)[5]

دستگاه ICP-MS در آنالیز عناصر، برای شناسایی و تعیین کمّی یون‌های فلزی در غلظت‌های کم در حدود یک قسمت در 10^{15} قسمت استفاده می‌شود.

۷ روش‌های اجرایی

۷-۱ کشت

۷-۱-۱ نژاد ماهی گورخری

نژاد ماهی گورخری باید گزارش شود. توصیه می‌شود ماهیان بالغ عاری از عفونت و بیماری‌های خارجی قابل‌رؤیت باشند و حداقل به مدت ۶ ماه با هیچ دارویی تیمار نشده‌باشند. همچنین برای حفظ سلامتی، ماهی‌های بالغ باید در شرایط بهینه و تراکم مناسب نگهداری شوند.

۷-۱-۲ رژیم[6] خوراکی

ماهیان گورخری بالغ روزی دوبار با ناپلی زنده آرتمیا (*Artemia* sp.) و یا با غذاهای تجاری خشک دردسترس تغذیه می‌شوند. از تغذیه بیش از اندازه پرهیز شود. برای بهینه نگه‌داشتن کیفیت آب، هرگونه باقیمانده مواد غذایی روزانه از آب خارج شود. لاروها و ماهیان نوجوان روزانه سه بار با جیره[7] خشک تغذیه می‌شوند. نوع غذای مصرفی باید گزارش شود.

1- Transmission Electron Microscopy
2- Dynamic Light Scattering
3- Static Multiple Light Scattering
4- Dispersion
5- Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry
6- Regime
7- Diet

۷-۱-۳ دوره نوری

یک رژیم نوری شامل ۱۰ ساعت روشنایی و ۱۴ ساعت تاریکی پیشنهاد می‌شود. توصیه می‌شود هرگونه تغییر در دوره نوری پیشنهادی گزارش شود.

۷-۱-۴ دما و pH

برای نگهداری ماهی گورخری، pH نزدیک به خنثی و دمای آب ۲۶ درجه سلسیوس تا ۲۸ درجه سلسیوس پیشنهاد می‌شود. دما و pH واقعی آب باید گزارش شوند.

۷-۱-۵ جنس حوضچه

حوضچه‌های مورداستفاده برای نگهداری ماهی گورخری باید از شیشه معمولی[1]، پلی‌کربنات[2] و یا شیشه اکریلیک با کیفیت بالا ساخته شوند.

۷-۲ تحریک تخم‌ریزی

جنین‌ها با استفاده از تخم‌ریزی گروهی از ماهیان با سن بین ۳ ماه تا ۱۲ ماه به‌دست می‌آیند. برای تولید جنین‌ها می‌توان از جفت‌های مجزا (یک نر و یک ماده) و یا تخم‌ریزی گروهی (تعدادی نر و تعدادی ماده) ماهیان گورخری بالغ استفاده کرد. ظروف متعددی به عنوان حوضچه تخم‌ریزی دردسترس است و یا می‌تواند به صورت سفارشی ساخته شود. ماهیان بالغ با نسبت جنسی ۲ نر به ۱ ماده یا ۱ نر به ۱ ماده درون قفسه‌های جفت‌گیری قرار می‌گیرند. برای تحریک رفتار تخم‌ریزی، طیف کاملی از نور سفید روشن می‌شود. جنین‌ها طی یک ساعت پس از تخم‌ریزی جمع‌آوری شده و چندین بار با محیط کشت جنینی شستشو می‌شوند. جنین‌های لقاح‌نیافته (سلول‌های مات و یا پاره‌شده در داخل کوریون) به‌صورت چشمی شناسایی و حذف می‌شوند (به پیوست **ب**مراجعه شود).

۷-۳ کوریون‌زدایی جنین‌ها

۷-۳-۱ روش‌ها

دو روش کوریون‌زدایی وجود دارد که به‌صورت عمومی استفاده می‌شود: روش کوریون‌زدایی مکانیکی و آنزیمی. جنین‌ها می‌توانند به‌صورت مکانیکی و با استفاده از دو پنس[3] در زیر یک استریومیکروسکوپ کوریون‌زدایی شوند. شوند. به‌طور کلی کوریون‌زدایی مکانیکی فقط به زمان آماده‌سازی کمی نیاز دارد و نیازی به استفاده از آنزیم‌ها هم ندارد. هرچند، کوریون‌زدایی مکانیکی هم نیاز به زمان و هم کار زیادی دارد که به‌طور قابل‌توجّهی تعداد جنین‌های کوریون‌زدایی‌شده در یک زمان مشخص را محدود می‌سازد. از بین بردن کوریون جنین در مراحل

1- Glass
2- Polycarbonate
3- Forceps

اولیه زندگی (صفر ساعت پس از لقاح تا ۱۰ ساعت پس از لقاح) بسیار چالش برانگیز است، زیرا دستکاری دستی می‌تواند باعث صدمه پیش‌بینی‌نشده منجر به نقص‌های بعدی در طول عمر جنین شود. در کوریون‌زدایی آنزیمی به‌طور کلی از پروتئاز[1] استخراج‌شده از گونه‌های باکتری استفاده می‌شود و اجازه می‌دهد تعداد زیادی از جنین‌ها به‌طور هم‌زمان کوریون‌زدایی شوند.

۷-۳-۲ روش کوریون‌زدایی آنزیمی

آماده‌سازی مواد شیمیایی، ملزومات و تجهیزات.

- برای یک لیتر محیط کشت جنینی، ۵/۰ میلی‌مولار NaCl (۰/۲۹۲ گرم)، ۰/۱۷ میلی‌مولار KCl (۰/۰۱۳ گرم)، ۰/۳۳ میلی‌مولار CaCl (۰/۰۴۴ گرم) و ۰/۳۳ میلی‌مولار $MgSO_4$ (۰/۰۸۱ گرم) را در آب مقطر حل کنید و با استفاده از NaOH ۰/۱ نرمال یا HCl ۰/۰۱ نرمال، pH را در حدود ۷/۴ تنظیم کنید.

- جنین‌های لقاح‌یافته را جمع‌آوری و به هر تعداد که نیاز است (شامل ٪ ۲۰ بیشتر از مقدار مورد نیاز) جداسازی کنید. همه جنین‌ها در مرحله تکاملی ۴ ساعت بعد از لقاح (HPF) باشند.

- آنزیم پروناز (EC 3.4.24.4; CAS# 9036-06-0) مخلوطی است از چندین اندو-پروتئاز[2] و اکسو-پروتئازهای[3] غیراختصاصی به‌دست‌آمده از باکتری *Streptomyces griseus* که پروتئین‌ها را به اسیدهای آمینه منفرد هضم می‌کند. محلول ذخیره آنزیم پروناز را روی یخ با استفاده از آب مقطر و در میکروتیوب‌های یک‌بار مصرف در حجم کم (۱۰۰ میکرولیتر) تهیه کنید و تا قبل از استفاده در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگه‌داری کنید.

- جنین‌های کوریون‌دار (حدود ۱۰۰۰ عدد) را با ۱۹/۱ واحد آنزیم در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت جنینی (معادل ۰/۷۶۴ واحد در میلی‌لیتر) در یک پتری‌دیش[4] شیشه‌ای ۹۰ میلی‌متری تیمار کنید.

- به مدت ۵ دقیقه یا ۶ دقیقه به آرامی تکان دهید و سپس به مدت ۶ دقیقه با حداقل ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت جنینی بشویید، سپس به مدت ۳ دقیقه با مخلوط نهایی (بدون پروناز) بشویید.

- بعد از شستشو، اجازه دهید جنین‌ها به مدت ۲۰ دقیقه تا ۳۰ دقیقه در دمای ۱ ± ۲۷ درجه سلسیوس بمانند. پس از این استراحت، کوریون‌های ضعیف باقیمانده در پتری‌دیش به‌وسیله یک شستشوی دیگر با محیط کشت جنینی (به مدت ۶ دقیقه) حذف می‌شوند.

- جنین‌ها نباید در طی فرآیند کوریون‌زدایی در تماس با هوا یا پلاستیک قرار بگیرند. استفاده از پیپت‌های شیشه‌ای شفاف با دهانه گشاد توصیه می‌شود.

1- Protease
2- Endoproteases
3- Exoproteases
4- Petri dish

روش - کوریون‌زدایی آنزیمی - در شکل ۳ نشان داده شده‌است.

راهنما:

الف جنین معمولی؛

ب جنین کوریون‌زدایی‌شده.

شکل ۳- روش کوریون‌زدایی آنزیمی

۴-۷ آماده‌سازی محلول ذخیره نانومواد

محلول‌های ذخیره به‌صورت تازه و با آب خالص‌سازی‌شده تهیه می‌شوند. درصورت نیاز به پراکنده‌سازی نانومواد در محیط، محلول‌ذخیره می‌تواند از طریق اولتراسونیکیشن[1] و یا هم‌زدن طبق روش‌های پراکنش توضیح‌داده‌شده در مرجع شماره [12] آماده شود. درصورت نیاز، عوامل حل‌کننده (حلّال‌ها یا پراکنده‌سازها) می‌توانند برای پراکنده‌سازی نانومواد استفاده شوند. توصیه می‌شود پایداری نانومواد در محیط در طی آزمون با استفاده از آنالیزهای مناسب بسته به نوع ماده تأیید شود. توصیه می‌شود غلظت عامل حل‌کننده در تمام ظروف آزمون یکسان باشد و نباید از ٪ ۰٫۰۱ کسر حجمی فراتر رود. اگر از عامل حل‌کننده استفاده شده‌است، به یک گروه کنترل اضافه که محتوی عامل حل‌کننده باشد، نیاز است. در این‌صورت عامل حل‌کننده نباید دارای اثراتی (مثلا بر زنده‌مانی، بدشکلی و یا دیگر اثرات مضر) بر جنین‌ها باشد. توصیه می‌شود هضم اسیدی همراه با ICP-MS برای تایید غلظت یون فلزی در محلول ذخیره، استفاده شود.

1- Ultrasonication

۷-۵ غلظت‌های موردآزمون

محلول آزمون هر یک از غلظت‌های انتخاب‌شده به‌وسیله رقیق‌سازی پیاپی محلول ذخیره آماده می‌شود. عوامل حل‌کننده (حلّال‌ها یا پراکنده‌سازها) می‌توانند درصورت ضرورت برای پراکنده‌سازی نانومواد استفاده شوند.

۷-۶ پراکنش نانومواد

حالت‌های پراکنش نانومواد مطابق با استاندارد ISO 22412 است.

۷-۷ ماده شیمیایی کنترل مثبت: ۴،۳-دی‌کلروآنیلین

ماده شیمیایی ۴،۳-دی‌کلروآنیلین (3,4-DCA)یک تحریک‌کننده غیراختصاصی غشاء یا مهارکننده متابولیک است که به‌طور انحصاری به‌عنوان واسطه در صنایع شیمیایی برای سنتز ۴،۳-دی کلروفنیل ایزوسیانات[1]، علف‌هرزه‌کُش پروپانیل[2] و یک رزانه[3] آزو[4] برای پارچه‌های پلی‌استر استفاده می‌شود. سمیت 3,4-DCA در بسیاری از مطالعات مورد ارزشیابی قرار گرفته‌است [15][14][13]. در رهنمود آزمون OECD TG 236، ماده 3,4-DCA به‌عنوان کنترل مثبت پیشنهاد شده‌است و در خیلی از مطالعات با موفقیت به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شده‌است [17][16][15]. در این استاندارد، برای صحّه‌گذاری آزمون، ماده 3,4-DCA (۴٫۰ میلی‌گرم در لیتر برای ماهی گورخری) به‌عنوان کنترل مثبت انتخاب شده‌است. در این غلظت آزمون، تا ۱۲۰ ساعت بعد از لقاح، باید حداقل ٪ ۳۰ مرگ‌ومیر در گروه کنترل مثبت رخ دهد.

۷-۸ روش‌های آزمون

۷-۸-۱ اندازه‌گیری کیفیت آب

در شروع و پایان آزمون، کیفیت آب محلول موردآزمون را اندازه‌گیری، ثبت و گزارش کنید. اندازه‌گیری‌ها شامل pH، محتوای اکسیژن محلول، هدایت‌الکتریکی و غیره است.

۷-۸-۲ آماده‌سازی جنین‌های کوریون‌زدایی‌شده

به زیربند ۷-۳ مراجعه شود.

1- 3,4-dichlorophenylisocyanate
2- Propanil
3- Dye
4- Azo

۷-۸-۳ مواجهه

- جنین‌های ماهی گورخری سالم و طبیعی از نظر ریخت‌شناختی را که در مرحله تکاملی ۴ ساعت بعد از لقاح هستند انتخاب و با استفاده از ۰٫۷۶۴ واحد پروناز در میلی‌لیتر، کوریون‌زدایی کنید (به زیربند ۷-۳ مراجعه شود).
- در آغاز آزمایش غلظت واقعی ذرات را آنالیز و تأیید کنید.
- جنین‌هایی که به تازگی کوریون‌زدایی شده‌اند را تا زمان شروع آزمون در گرم‌خانه نگه‌دارید. ده عدد جنین سالم کوریون‌زدایی‌شده در مرحله ۶ ساعت بعد از لقاح را به‌صورت جداگانه در چاهک‌های میکروپلیت محتوی محلول آزمون قرار دهید (برای میکروپلیت‌های ۶ چاهکه، ۴ میلی‌لیتر در هر چاهک؛ برای میکروپلیت‌های ۱۲ چاهکه، ۲ میلی‌لیتر در هر چاهک).
- پلیت‌ها را با استفاده از پارافیلم یا سلفون محافظ غذا بپوشانید و در گرم‌خانه در دمای کنترل‌شده قراردهید.
- در رابطه با سامانه‌های نیمه-ایستا[1]، برای برقراری پایداری غلظت‌ها، هر ۲۴ ساعت و تا پایان آزمون، محیط آزمون را کاملا تجدید کنید. آزمون سمیت نانومواد بر پایه مواجهه از ۶ ساعت بعد از لقاح تا ۱۲۰ ساعت بعد از لقاح است.
- برای آزمون نهایی، حداقل ۵ غلظت آزمون را موردبررسی قرار دهید. فاصله بین غلظت‌های آزمون باید ضریب ثابتی باشد که از ۲٫۲ فراتر نرود. اگر عامل حل‌کننده استفاده شده‌است، غلظت آن باید در تمام ظروف آزمون یکسان باشد و نباید از ٪ ۰٫۰۱ کسر حجمی فراتر رود. تیمارها باید در ۳ تکرار انجام شوند.
- بعد از ۲۴ ساعت مواجهه، غلظت واقعی ذرات را آنالیز و تأیید کنید.
- در طی زمان مواجهه، جنین‌ها را روزانه زیر یک استریومیکروسکوپ مشاهده کنید. جنین‌های مرده را ثبت و از چاهک‌ها خارج کنید. مرگ‌ومیر با بررسی نقاط انتهایی[2] قابل‌مشاهده، مشخص می‌شود (به زیربند ۷-۸-۴ مراجعه شود). تعداد جنین‌های مرده را برای ترسیم منحنی پاسخ مرگ‌ومیر ثبت کنید.
- به‌منظور محاسبه دقیق LC_{50}، غلظت‌های آزمون نهایی باید شامل یک غلظت NOAEL و یک غلظت بالاتری باشد که باعث ایجاد ٪ ۱۰۰ کشندگی شود.

نانو مواد در دو مرحله آزمون می‌شوند تا غلظتی که برای ٪ ۵۰ جنین‌ها کشنده است (LC_{50}) مشخص شود. برای محاسبه این مقدار، نانومواد در آزمایش یافتن محدوده[3]، موردآزمون قرار می‌گیرند که نتایج این آزمون

1- Semi-static system
2- Endpoints
3- Range-finding

مشخص‌کننده غلظت‌های آزمون نهائی است. در آزمایش یافتن محدوده، فاصله بین غلظت‌ها باید زیاد باشد (مثلا ۰٫۱ میلی‌گرم در لیتر، ۱٫۰ میلی‌گرم در لیتر، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر).

۷-۸-۴ مشاهده نقاط انتهایی

۷-۸-۴-۱ مرگ‌ومیر

جنین‌ها (یا لاروهای) مرده را می‌توان با بررسی لختگی جنین[1]، جدا نشدن جوانه دم[2] از زرده، ضربان قلب و عدم تشکیل تن‌پار[3] در زیر استریومیکروسکوپ مشخص کرد. در طی آزمون، جنین‌ها (یا لاروها) روزانه در زیر استریومیکروسکوپ مشاهده می‌شوند.

۷-۸-۴-۲ لختگی جنین‌ها

لختگی یا انعقاد شامل از دست رفتن قابل‌توجه شفافیت، تغییر در رنگ و ظاهر مات جنین‌ها است.

۷-۸-۴-۳ عدم موفقیت در جوانه‌زدن دُم

جنینی که نتواند دُم را از کیسه زرده جدا کند، مرده درنظر گرفته می‌شود.

۷-۸-۴-۴ ضربان قلب

در نقطه زمانی ۴۸ ساعت بعد از لقاح، ضربان قلب به‌راحتی قابل‌مشاهده است. جنین (لاروی) که حرکات تنفسی در آن مشاهده نشود و یا ضربان قلب نداشته‌باشد، مرده درنظر گرفته می‌شود. جنین‌های دارای ضربان قلب نامنظم مرده درنظر گرفته نمی‌شوند.

۷-۸-۴-۵ عدم تشکیل تن‌پار

تشکیل تن‌پارها در جنین طبیعی بعد از ۲۴ ساعت پس از لقاح قابل‌مشاهده است و حداقل بعد از ۴۸ ساعت پس از لقاح باید تن‌پارها تکامل یافته باشند.

۷-۹ تحلیل داده‌ها

ارزشیابی سمیت بر اساس مرگ‌ومیر، با محاسبه LC_{50} در ۱۲۰ ساعت پس از لقاح ($120\ HPF\text{-}LC_{50}$) و با محدوده اطمینان ٪ ۹۵ تعیین می‌شود. LC_{50} با استفاده از تجزیه و تحلیل پروبیت[4] و مدل‌های رگرسیون لجستیک غیرخطی[5] محاسبه می‌شود.

1- Embryo coagulation
2- Tail-bud
3- Somite
4- Probit
5- Nonlinear logistic regression

۸ گزارش آزمون

۸-۱ روش آزمون

گزارش آزمون باید در تطابق با روش آزمون استفاده‌شده باشد.

۸-۲ اطلاعاتی که باید در گزارش آزمون گنجانده شود

۸-۲-۱ نانومواد مورد آزمون

- ماده مورد آزمون: کد سازنده، شماره کاتالوگ (کالانما)[1] یا فرمولاسیون، سریال ساخت یا تاریخ تولید، نام تجاری و غیره؛

- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانومواد: نوع، شکل، اندازه، مواد پوشش‌دهنده، خلوص و غیره؛

- پایداری نانومواد در محیط کشت جنینی و در آب خالص.

۸-۲-۲ گونه موردآزمون

- خاستگاه[2] سویه ماهی گورخری (شامل نام گونه و مرحله تکاملی)؛

- تعداد جنین‌های ماهیان گورخری استفاده‌شده برای کوریون‌زدایی در ۴ ساعت پس از لقاح؛

- تعداد جنین‌های ماهیان گورخری استفاده‌شده برای مواجهه در ۶ ساعت پس از لقاح.

۸-۲-۳ مواد و دستگاه‌ها

- توصیف ظروف آزمون استفاده‌شده: حوضچه‌ها، بشرها، حوضچه‌های تخم‌ریزی و غیره؛

- توصیف تجهیزات آنالیز: DLS، SEM، TEM، ICP-MS، SMLS و غیره؛

- توصیف آماده‌سازی نانومواد: آماده‌سازی محلول‌های ذخیره و آزمون، عامل حل‌کننده (درصورت وجود)، هرگونه آماده سازی حلّال و غیره؛

- توصیف آماده‌سازی کنترل مثبت: آماده‌سازی محلول‌های ذخیره و آزمون.

۸-۲-۴ نگهداری

- توصیف جمع‌آوری جنین‌ها: آماده‌سازی حوضچه‌های تخم‌ریزی؛

- توصیف کوریون‌زدایی (به زیربند ۷-۳ مراجعه شود).

1- Catalogue
2- Origin

۸-۲-۵ طراحی آزمون

- توصیف تیمارها: تعداد جانوران استفاده‌شده، تعداد تکرارها و غیره.

۸-۲-۶ شرایط آزمون

- توصیف مواجهه: منبع و کیفیت آب (pH، اکسیژن محلول، رسانایی الکتریکی و غیره)، شرایط مواجهه (دما، شرایط روشنایی/تاریکی و غیره)؛

- اندازه‌گیری رفتار نانومواد: پایداری (اندازه‌های انبوهه‌ها و پتانسیل‌زتاها در زمان شروع و زمان پایان و غیره)، غلظت واقعی نانومواد (درصورت امکان) در شروع و بعد از ۲۴ ساعت، غلظت یون‌های رهایش‌یافته از نانومواد پایه فلزی (همچون نانوذرات نقره).

۸-۲-۷ نتایج

- تعداد لاروها یا جنین‌های مرده ماهی گورخری (به زیربند ۷-۸ مراجعه شود) در گروه کنترل و گروه‌های مواجه‌شده با نانومواد؛

- LC_{50} محاسبه‌شده در ۱۲۰ ساعت پس از لقاح برای مرگ‌ومیر (به زیربند ۷-۸-۴ مراجعه شود)؛

- تأیید صحّه‌گذاری نتیجه (به پیوست **ج** مراجعه شود).

پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

روش کوریون‌زدایی مکانیکی

الف- ۱- روش‌های عملیاتی

الف-۱-۱ یک جفت پنس ریز سترون آماده کنید.

الف-۱-۲ جنین‌های لقاح‌یافته در یک روز مشترک را جمع‌آوری کنید و جنین‌های ۴ ساعت پس از لقاح را استفاده کنید.

الف-۱-۳ در زیر استریومیکروسکوپ به‌وسیله یک جفت پنس در هر دست، کوریون را در دو موقعیت نزدیک درکنار جنین بگیرید.

الف-۱-۴ پنس‌ها را از هم دور کنید تا یک پارگی در کوریون ایجاد شود.

الف-۱-۵ جنین‌ها را برای هرگونه علامت آسیب از جمله پارگی لایه‌های سلول یا سوراخ شدن زرده مشاهده کنید. از جنین‌های آسیب‌دیده برای آزمون استفاده نکنید.

الف-۲ مزایا

الف-۲-۱ سادگی اجرا.

الف-۲-۲ دستیابی سریع به تعداد کمی از جنین‌های کوریون‌زدایی‌شده.

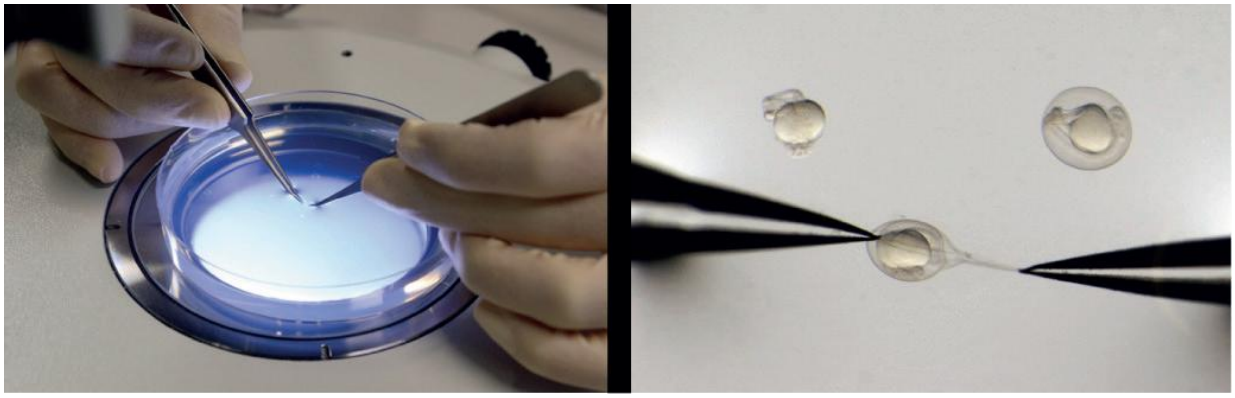
الف-۳ معایب

الف-۳-۱ برای کسب مهارت، نیاز به تمرین زیاد دارد.

الف-۳-۲ برای به‌دست‌آوردن تعداد زیادی از جنین‌های کوریون‌زدایی‌شده نیاز به صرف زمان و نیروی کار زیاد است.

الف-۳-۳ میزان آسیب‌های مکانیکی به جنین‌ها بالا است.

الف-۳-۴ برای رویکردهای مبتنی برتوان بالا مناسب نیست.



یادآوری- به مرجع شماره [18] کتاب‌نامه مراجعه شود.

شکل الف- ۱ روش کوریون‌زدایی مکانیکی

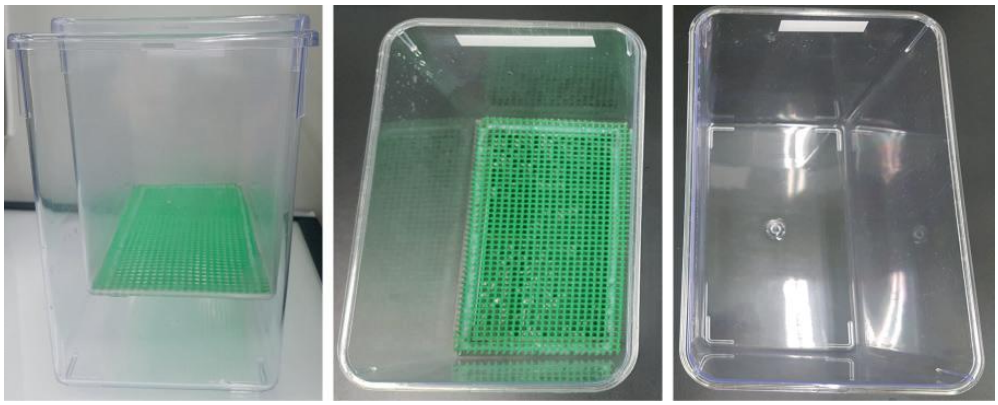
پیوست ب

(آگاهی‌دهنده)

روش‌های تخم‌گیری از ماهی گورخری

روش‌های اجرایی عملیاتی:

- یک قفسه جفت‌گیری آماده کنید (به شکل ب- ۱ مراجعه شود)؛
- جنین‌ها از طریق تخم‌ریزی گروهی از ماهیان با سن بین ۳ ماه تا ۱۲ ماه به‌دست می‌آیند؛
- ماده‌ها و نرها را (با نسبت جنسی ۲ به ۱ یا ۱ به ۱) در یک حوضچه جفت‌گیری که به‌وسیله یک تقسیم‌کننده حوضچه (شبکه پلاستیکی) جدا شده‌است (طوری که ماهیان نر از ماهیان ماده جدا باشند) قرار دهید؛
- حوضچه را در تاریکی قرار دهید؛
- نور سفید را روشن کنید تا رفتار تخم‌ریزی تحریک شود، تقسیم‌کننده حوضچه را خارج کنید و به ماهیان ۱ ساعت زمان دهید تا تخم‌ریزی کنند؛
- جنین‌ها را با استفاده از یک صافی مشبّک جمع‌آوری کنید؛
- چندین بار و با دقّت جنین‌ها را با محیط کشت جنینی شستشو دهید تا بقایا[1] حذف شوند؛
- جنین‌های تمیزشده را تا فرارسیدن زمان شروع فرآیند کوریون‌زدایی به یک پتری‌دیش محتوی محیط کشت جنینی منتقل کنید.



شکل ب- ۱- به ترتیب از راست به چپ: حوضچه تخم‌ریزی، قفسه جفت‌گیری با کف مشبک و قفسه جفت‌گیری قرارداده‌شده در حوضچه تخم‌ریزی ماهی گورخری

1- Debris

پیوست پ

(آگاهی‌دهنده)

صحّه‌گذاری نتایج

برای صحیح بودن یک آزمون، باید شرایط زیر وجود داشته‌باشد:

- در طی آزمون، زنده‌مانی کلی جنین‌ها یا لاروهای ماهی گورخری در گروه کنترل (کنترل آب رقیق‌سازی و کنترل حلّال) باید بیش از ٪ ۹۰ باشد؛
- در طی آزمون، دمای آب نگهداری باید ۱ ± ۲۷ درجه سلسیوس باشد؛
- در شروع و پایان آزمون، غلظت اکسیژن محلول باید بین ٪ ۶۰ تا ٪ ۱۰۰ مقدار اشباع هوا (۵٫۳۴۹ میلی‌گرم در لیتر تا ۸٫۹۱۵ میلی‌گرم در لیتر، در دمای ۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱ اتمسفر) باشد؛
- میزان لقاح کلی تمام تخم‌های جمع‌آوری‌شده در مجموعه موردآزمون، باید بزرگتر یا مساوی ٪ ۷۰ باشد.

پیوست ت

(آگاهی دهنده)

تغییرات اعمال‌شده در متن استاندارد ملی در مقایسه با منبع

ت- ۱ بخش‌های اضافه‌شده:

- زیربند ۵-۱: یادآوری: «**یادآوری** - در ایران انواعی از ماهیان گورخری به رنگ قرمز ونارنجی دردسترس هستند که معمولا درانواع مطالعات زیستی، ازجمله مطالعات توکسیکولوژی، ازآن‌ها استفاده می‌شود. این ماهیان تراریخته، ازطریق انتقال ژن RFP تولید شده‌اند و البته در دنیا انواع دیگری از آن‌ها نیز وجود دارند که ازطریق انتقال ژن‌های FP و YFP به‌ترتیب به رنگ‌های سبز و زرد نیز تولید شده‌اند. ضروری است درصورت استفاده از ماهیان گورخری تراریخته در آزمایشات توکسیکولوژی، درگزارش به این نکته اشاره شود.» اضافه شده‌است.

- زیربند ۵-۱: شکل ۲ اضافه شده‌است.

ت-۲ بخش‌های تغییریافته:

- پیوست ب: عنوان شکل ب-۱ بدین‌صورت تغییر داده شده‌است: «شکل ب- ۱- به ترتیب از راست به چپ: حوضچه تخم‌ریزی، قفسه جفت‌گیری باکف مشبّک و قفسه جفت‌گیری قرارداده شده درحوضچه تخم‌ریزی ماهی گورخری» جایگزین عبارت انگلیسی "Zebrafish mating tank" شده‌است.

کتاب‌نامه

[1] Truong, L. Harper S.L., Tanguay R.L. Evaluation of embryo toxicity using the zebrafishmodel. In:Drug safety evaluation. ed: Springer, 2011, pp. 271-279

[2] Mandrell D., Truong L., Jephson C., Sarker M.R., Moore A., Lang C. et al. Automated zebrafishchorion removal and single embryo placement: optimizing throughput of zebrafishdevelopmental toxicity screens. Journal of Laboratory Automation. 2012, 17, pp. 66–74

[3] Cunningham S., Brennan-Fournet M.E., Ledwith D., Byrnes L., Joshi L. Effect of nanoparticlestabilization and physicochemical properties on exposure outcome: acute toxicity of silvernanoparticle preparations in zebrafish (*Daniorerio*). Environmental Science &Technology. 2013,47, pp. 3883–3892

[4] Park K., Tuttle G., Sinche F., Harper S.L. Stability of citrate-capped silver nanoparticles nexposure media and their effects on the development of embryonic zebrafish (*Daniorerio*).Archives of PharmacalResearch. 2013, 36, pp. 125–133

[5] Gao J. Nanoparticle toxicity and molecular mechanisms in fish: A case study with silvernanoparticles, 2016. Dissertation, Purdue University

[6] Paatero, Casals E., Niemi R., Özliseli E., Rosenholm J.M., Sahlgren C. Analyses in zebrafishembryos reveal that nanotoxicity profiles are dependent on surface-functionalization controlledpenetrance of biological membranes. Scientific Reports. 2017, 7, p. 8423

[7] Truong L., Mandrell D., Mandrell R., Simonich M., Tanguay R.L. A rapid throughput approachidentifies cognitive deficits in adult zebrafish from developmental exposure to polybrominatedflame retardants. Neurotoxicology. 2014, 43, pp. 134–142

[8] Truong L., Bugel S.M., Chlebowski A., Usenko C.Y., Simonich M.T., Simonich S.L.M. et al.Optimizing multi-dimensional high throughput screening using zebrafish. Reproductive Toxicology. 2016,65, pp. 139–147

[9] Noyes P.D., Haggard D.E., Gonnerman G.D., Tanguay R.L. Advanced morphological—behavioraltest platform reveals neurodevelopmental defects in embryonic zebrafish exposed tocomprehensive suite of halogenated and organophosphate flame retardants. Toxicological Sciences. 2015,145, pp. 177–195

[10] Harper S.L., Carriere J.L., Miller J.M., Hutchison J.E., Maddux B.L., Tanguay R.L. Systematicevaluation of nanomaterial toxicity: utility of standardized materials and rapid assays. ACSNano. 2011, 5, pp. 4688–4697

[11] Howe K., Clark M.D., Torroja C.F., Torrance J., Berthelot C., Muffato M. et al. The zebrafishreference genome sequence and its relationship to the human genome.Nature. 2013, 496, p. 498

[12] DeLoid G.M., Cohen J.M., Pyrgiotakis G., Demokritou P. Preparation, characterization, and invitro dosimetry of dispersed, engineered nanomaterials. Nature Protocols. 2017, 12, p. 355

[13] Scheil V., Kienle C., Osterauer R., Gerhardt A., Köhler H.-R. Effects of 3, 4-dichloroaniline anddiazinon on different biological organisation levels of zebrafish (*Daniorerio*) embryos andlarvae.Ecotoxicology. 2009, 18, pp. 355–363

[14] Pereira T.S.B., Boscolo C.N.P., da Silva D.G.H., Batlouni S.R., Schlenk D., de Almeida E.A. Antiandrogenicactivities of diuron and its metabolites in male Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*).Aquatic Toxicology. 2015, 164, pp. 10–15

[15] Saeed S., Al-Naema N., Butler J.D., Febbo E.J. Arabian killifish (*Aphaniusdispar*) embryos: Amodel organism for the risk assessment of the Arabian Gulf coastal waters. Environmental Toxicology and Chemistry.2015, 34, pp. 2898–2905

[16] Adeyemi J.A., da Cunha Martins-Junior A., Barbosa Jr F. Teratogenicity, genotoxicity and xidativestress in zebrafish embryos (*Daniorerio*) co-exposed to arsenic and atrazine. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology. 2015, 172, pp. 7–12

[17] Bai H., Kong W.-W., Shao C.-L., Li Y., Liu Y.-Z., Liu M. et al. Zebrafish embryo toxicity microscalemodel for ichthyotoxicity evaluation of marine natural products. Marine Biotechnology. 2016, 18,pp. 264–270

[18] Zebrafish embryo sample preparation (online). Available at: https://openspim.org/Zebrafish_embryo_sample_preparation

[19] OECD. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section2. OECD Publishing, Paris, 2019.

[20] ISO 10993-10: 2010, Biological evaluation of medical devices — Part 10: Tests for irritation and skinsensitization

[21] ISO 6107-3: 1993, Water quality — Vocabulary — Part 3

فهرست مطالعات نانوسمیت با استفاده از جنین‌های ماهی گورخری

[22] Duan J., Yu Y., Shi H., Tian L., Guo C., Huang P. et al. Toxic effects of silica nanoparticles onzebrafish embryos and larvae. PLOS One.2013, 8, p. e74606

[23] Hussain C.M. Nanomaterials in chromatography: current trends in chromatographic researchtechnology and techniques. Elsevier, 2018

[24] Kim K.-T. Tanguay R.L. The role of chorion on toxicity of silver nanoparticles in the embryoniczebrafish assay.Environmental Health and Toxicology.2014, 29

[25] King-Heiden T.C., Wiecinski P.N., Mangham A.N., Metz K.M., Nesbit D., Pedersen J.A et al. Quantumdot nanotoxicity assessment using the zebrafish embryo. Environmental Science and Technology.2009, 43, pp. 1605–1611

[26] Lee K.J., Nallathamby P.D., Browning L.M., Osgood C.J. Xu X.-H.N. In vivo imaging of transportand biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos.ACS Nano. 2007, 1, pp. 133–143

[27] Rizzo L.Y., Golombek S.K., Mertens M.E., Pan Y., Laaf D., Broda J. et al. In vivo nanotoxicity testingusing the zebrafish embryo assay. Journal of Materials Chemistry B. 2013, 1, pp. 3918–3925