INSO
23002
1st Edition
2021

Identical with
ISO/TR 22019:
2019

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

استاندارد ملی ایران
۲۳۰۰۲
چاپ اول
۱۴۰۰

فناوری نانو ـ ملاحظات برای انجام مطالعات توکسیکوکینتیک با نانومواد

Nanotechnology — Considerations for performing toxicokinetic studies with nanomaterials

ICS: 07.120

استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۰۰۲ (چاپ اول): سال ۱۴۰۰

سازمان ملی استاندارد ایران

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

صندوق‌پستی: 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.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 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 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 کمیتهٔ 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 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 کمیتهٔ 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)[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 ـ ملاحظات برای انجام مطالعات توکسیکوکینتیک با نانومواد»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
قاضی خوانساری، محمود (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
دبیر:	
منهاج‌بناء، رابعه (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	مدیرعامل- شرکت راهبران توسعه سبز
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اسلامی‌پور، الهه (کارشناسی ارشد زیست‌شناسی)	کارشناس- کارگروه استاندارد و ایمنی ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
حجازی، مرضیه (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه تبریز
زایرزاده، احسان (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	عضو هیئت علمی- پژوهشگاه استاندارد
سیفی، مهوش (کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)	نایب رئیس- کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISIRI/TC 229
کوهی، محمّد کاظم (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه تهران
میرزاجانی دمنه، فاطمه (دکتری تخصصی فیتوشیمی)	عضو هیئت علمی- مرکز تحقیقات پروتئین- دانشگاه شهید بهشتی
ویراستار:	
سیفی، مهوش (کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)	نایب رئیس- کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISIRI/TC 229

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

پیش‌گفتار ز
مقدمه ح
۱ هدف و دامنهٔ کاربرد ۱
۲ مراجع الزامی ۱
۳ اصطلاحات و تعاریف ۱
۴ کوته‌نوشت‌ها ۴
۵ اهمیت اطلاعات توکسیکوکینتیک در ارزیابی ریسک نانومواد ۵
۵-۱ کلیات ۵
۵-۲ امکان استفاده از اطلاعات توکسیکوکینتیک ۵
۵-۳ موضوعات کلیدی توکسیکوکینتیک برای نانومواد ۷
۶ عوامل مؤثر بر توکسیکوکینتیک نانومواد ۹
۶-۱ سرعت انحلال ۹
۶-۲ خواص شیمیایی فیزیکی تعیین‌کننده رفتار توکسیکوکینتیک ۱۱
۶-۲-۱ اندازه ۱۲
۶-۲-۲ خواص سطحی (شامل بار) ۱۴
۶-۲-۳ تاج پروتئینی ۱۵
۶-۲-۴ شکل ۱۸
۷ چالش‌های آنالیزی ۱۹
۷-۱ کلیات ۱۹
۷-۲ آنالیز عنصری ۲۰
۷-۳ آنالیز عنصری با نشانگر رادیواکتیوی یا نشانگر فلورسانسی ۲۲
۷-۴ تعیین ذرات ۲۳
۷-۵ حد تشخیص ۲۵
۸ موضوعات مربوط به شرایط تجویز دُز ۲۶
۸-۱ کلیات ۲۶
۸-۲ دُزسنجی ۲۹
۹ جذب نانومواد ۳۰

عنوان **صفحه**

۹-۱ کلیات ۳۰
۹-۲ پوست ۳۱
۹-۲-۱ مدل‌های آزمون ۳۱
۹-۲-۲ دانش موجود در مورد جذب نانوذرات از طریق پوست ۳۲
۹-۳ دستگاه گوارش (GI) ۳۳
۹-۳-۱ مدل‌های آزمون ۳۳
۹-۳-۲ دانش فعلی در مورد جذب نانوذرات در دستگاه گوارش ۳۶
۹-۴ دستگاه تنفسی ۳۸
۹-۴-۱ مدل‌های آزمون ۳۸
۹-۴-۲ دانش فعلی در مورد جذب نانوذرات پس از استنشاق ۳۹
۹-۴-۳ پایداری در ریه ۴۰
۹-۴-۴ جابه‌جایی نانوذرات از طریق ریه ۴۵
۱۰ توزیع ۴۷
۱۰-۱ کلیات ۴۷
۱۰-۲ توزیع ارگانی ۴۷
۱۰-۳ انتقال از طریق جفت، سد خونی- مغزی و ارگان‌های تولید مثل ۴۹
۱۱ سوخت‌وساز/تجزیه ۵۱
۱۲ دفع ۵۲
۱۳ نتیجه‌گیری ۵۳
پیوست الف (آگاهی‌دهنده) تعاریف مورداستفاده برگرفته از استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۴۸۰ ۶۰
پیوست ب (آگاهی‌دهنده) روش‌های کمیت سنجی نانومواد، مزایا و چالش‌ها ۶۶
کتاب‌نامه ۷۷

پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو- ملاحظات برای انجام مطالعات توکسیکوکینتیک با نانومواد» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/ منطقه‌ای به‌عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره‌شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تهیه و تدوین‌شده، در نود و نهمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۴۰۰/۰۲/۲۷ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، به عنوان 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 درزمینه 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، موردتوجه 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 «معادل یکسان» تهیه و تدوین‌شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می‌باشد و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی مزبور است:

ISO/TR 22019: 2019, Nanotechnologies— Considerations for performing toxicokinetic studies with nanomaterials.

مقدمه

نانومواد (NMs)[1] خانواده‌ای از مواد شیمیایی هستند که مانند هر ماده شیمیایی دیگری می‌توانند طیف وسیعی از سمیت را اعمال کنند. توکسیکوکینتیک می‌تواند از ارزشیابی ایمنی ترکیبات از جمله نانومواد با شناسایی ارگان‌های بالقوه هدف و به‌ویژه در مورد NMs، پتانسیل پایداری[2] در ارگان‌ها (از جمله دریافت[3] و بخش- بخش شدن[4]) پشتیبانی کند. علاوه‌بر این، اطلاعات توکسیکوکینتیک می‌تواند برای ارزیابی این‌که آیا یک نانوماده رفتاری متفاوت با یک نانوماده مشابه یا ماده توده‌ای با ترکیب‌بندی شیمیایی مشابه دارد، استفاده شود؛ به‌عنوان مثال نسبت به نفوذ سد[5]. مانند همه مطالعات انجام‌شده با NMs، یک مشخصه‌یابی مناسب از پراکنش نانوماده یا هواسُل‌های مورداستفاده در مطالعات توکسیکوکینتیک ضروری است.

اهمیت اطلاعات توکسیکوکینتیک برای ارزیابی ریسک (نانومواد)

توکسیکوکینتیک، جذب، توزیع، سوخت‌وساز و دفع (ADME)[6] ترکیبات خارجی[7] در بدن را با گذشت زمان توصیف می‌کند. توکسیکوکینتیک، مواجهه را با دُز داخلی مرتبط می‌کند و بنابراین یکی از ابعاد کلیدی برای سمیت است. اگر یک نانوماده از طریق هر یک از مسیرهای مواجهه احتمالی (از راه خوراکی[8]، تنفسی، پوستی) جذب بدن شود، می‌تواند وارد جریان خون یا لنف شود. متعاقب توزیع در ارگان‌های داخلی، بافت‌های هدف بالقوه و سمیت بالقوه تعیین می‌شود. ازسوی دیگر، NMs می‌توانند به‌صورت داخل وریدی تجویز شوند (به‌عنوان مثال در نانوپزشکی)، بنابراین مستقیماً وارد گردش خون شده و به‌طور بالقوه منجر به توزیع گسترده بافتی می‌شوند. از همین رو، توکسیکوکینتیک در طراحی مطالعات هدفمند سمیت و شناسایی پتانسیل ارگان‌های هدف کمک می‌کند و بنابراین می‌تواند اطلاعات مربوطه را برای توجیه یا چشم‌پوشی از مطالعات سمیت فراهم کند. علاوه‌بر این، اطلاعات توکسیکوکینتیک می‌تواند به‌عنوان پایه‌ای برای روش‌های گروه‌بندی و بررسی- سراسری[9] NMs مفید باشد. ارزیابی‌های ریسک بر اساس غلظت‌های داخلی که با استفاده از اطلاعات توکسیکوکینتیک تعیین شده‌اند، می‌توانند واقع‌بینانه‌تر از ارزیابی ریسک بر اساس دُزهای خارجی باشند، زیرا نانوذرات (NPs)[10] می‌توانند توزیع بافتی خاص و تجمع[11] را نشان دهند. از مطالعات توکسیکوکینتیک می‌توان برای ساخت مدل‌های توکسیکوکینتیک استفاده کرد، به‌ویژه مدل‌های فارماکوکینتیک بر اساس فیزیولوژی (PBPK)[12] که می‌تواند برای برون‌یابی[13] داده‌های تجربی سمیت به

1- Nanomaterials
2- Persistence
3- Uptake
4- Compartmentalization
5- Barrier penetration
6- Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion
7- Foreign compounds
8- Oral
9- Read-across
10- Nanoparticles
11- Accumulation
12- Physiologically- bsed pharmacokinetic
13- Extrapolate

سایر گونه‌ها، بافت‌ها، مسیرهای مواجهه، مدت زمان مواجهه و دُزها مورداستفاده قرار گیرد. با توجه به تجمع برخی از NPs، توانایی برون‌یابی به مدت زمان‌های مواجهه طولانی‌تر از اهمیت خاصی برای NMs برخوردار است.

چرا یک استاندارد مخصوص نانومواد ارائه می‌شود؟

مجموعه قابل‌توجهی از مقالات پژوهشی منتشرشده، از جمله بسیاری از دستورالعمل‌های ملی و بین‌المللی در مورد استفاده از روش‌های توکسیکوکینتیک به‌منظور مطالعه سرنوشت مواد شیمیایی در بدن وجود دارد. علاوه‌بر این، استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۴۸۰: سال ۱۳۹۵، *آزمون سمیت مواد شیمیایی- بررسی توکسیکوکینتیک- راهنما، در مورد توکسیکوکینتیک* [۳]، شرح مفصلی را برای ارزیابی مشخصات توکسیکوکینتیک مواد شیمیایی ارائه می‌دهد، اما NMs را به‌طور خاص مستثنی می‌کند. استاندارد ISO 10993-16:2017، *ارزیابی زیستی تجهیزات پزشکی ـ قسمت ۱۶: طراحی مطالعه توکسیکوکینتیک برای محصولات تخریب‌پذیر[1] و قابل فروشویی[2]*، مروری کلی برای مطالعات توکسیکوکینتیک برای مواد قابل‌فروشویی در تجهیزات پزشکی را ارائه می‌کند. علاوه‌بر این، آژانس دارویی اروپا (EMA)[3] در راهنمای ICH S3A[4] (توکسیکوکینتیک: یک راهنما برای ارزیابی مواجهه سیستمیک در مطالعات توکسیکولوژی) و S3B (فارماکوکینتیک: مطالعات توزیع بافت با تکرار دُز) رهنمودهایی را در مورد طراحی و انجام مطالعات توکسیکوکینتیک برای کمک به توسعه داروهای جدید ارایه می‌دهد.

همچنین رهنمودهایی در مورد مدل‌سازی توکسیکوکینتیک، به‌ویژه توسعه و کاربرد مدل‌های فارماکوکینتیک بر اساس فیزیولوژی PBPK وجود دارند. به‌عنوان مثال، پیش‌نویس آنالیز فارماکوکینتیک برپایه فیزیولوژی سازمان غذا و داروی ایالات متحده (USFDA)[5] « قالب و راهنمای محتوا برای صنعت»، محتوا و قالب استانداردی را برای گزارش مطالعات PBPK ارائه می‌کند، درحالی‌که رویکردهای آژانس حفاظت از محیط ایالات متحده (USEPA)[6] برای استفاده از مدل‌های فارماکوکینتیک بر اساس فیزیولوژی PBPK و داده‌های پشتیبانی‌کننده در ارزیابی ریسک، به کاربرد و ارزیابی مدل‌های PBPK برای اهداف ارزیابی ریسک می‌پردازند. آژانس دارویی اروپا (EMA) «راهنمایی درباره صلاحیت و گزارش مدل‌سازی و شبیه‌سازی فارماکوکینتیک بر اساس فیزیولوژی PBPK» را در سال ۲۰۱۶ منتشر کرده است [1]. سازمان بهداشت جهانی (WHO)[7] «مشخصه‌یابی و کاربرد مدل‌های فارماکوکینتیک بر اساس فیزیولوژی در ارزیابی ریسک» را منتشر کرده است [2].

1- Degradation
2- Leachable
3- European Medicines Agency
4- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
5- United States Food and Drug Administration
6- United States Environmental Protection Agency
7- World Health Organization

همان‌گونه که بیان شد، راهنمای آزمون توکسیکوکینتیک، استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۴۸۰: سال ۱۳۹۵، به‌طور شفاف بیان می‌کند که این راهنما برای آزمایش NMs درنظر گرفته نشده است[۳]، زیرا توکسیکوکینتیک NMs با یون‌ها/ مولکول‌های محلول و ذرات بزرگ متفاوت است. این امر در گزارشی در مورد بررسی اولیه دستورالعمل‌های آزمون OECD[1] برای کاربرد آنها در NMs موردتأیید قرار گرفت [4]. علاوه‌بر این، مدل‌های توصیف‌شده PBPK در اسناد راهنمای فعلی و ذکرشده برای NMs مناسب نیستند، زیرا فرآیندهای حاکم بر توزیع NPs با مواد حل‌شده (مولکولی/ یونی) که در اسناد راهنمای فعلی (به‌عنوان مثال مرجع [5]) ذکر شده‌اند، متفاوت هستند.

از همین رو، رهنمودهای جدید یا اطلاعات تکمیلی خاص در مورد NMs علاوه‌بر رهنمودهای موجود نیز ضروری هستند. مروری بر دانش فعلی در مورد مشخصات توکسیکوکینتیک NMs و مسائل پیرامون آزمون توکسیکوکینتیک، یک گام مقدماتی و عملی برای اطمینان از بهترین درک ممکن از آزمایش موردنیاز برای به‌دست آوردن اطلاعات مربوط به توکسیکوکینتیک NMs است.

تفاوت نانومواد با یون‌ها/مولکول‌های محلول و ذرات بزرگ چیست؟

نانومواد خانواده‌ای منحصربه‌فرد از مواد شیمیایی را ارائه می‌کنند که با ذرات بسیار کوچک و کاهش اندازه، خصوصیات شیمیایی فیزیکی خاصی را پیدا می‌کنند که برای نمونه‌های توده (غیرنانویی) یا محلول وجود ندارد، و همان‌گونه که پیش از این در بسیاری از گزارش‌ها مورد بحث و بررسی قرار گرفته است (به‌عنوان مثال مراجع [6]، [7]، [8]، [9] و [10]) ممکن است با سمیت خاصی همراه باشند/نباشند.

توکسیکوکینتیک NPs مورد توجه ویژه‌ای قرار دارد؛ زیرا در مقایسه با ذرات با اندازه بزرگ‌تر، اندازه کوچک NPs می‌تواند سرعت جابه‌جایی را فراتر از مدخل ورودی، به مایع لنفاوی و گردش خون افزایش دهد و از این طریق می‌تواند به‌طور بالقوه به تمام ارگان‌های داخلی برسد [11]. علاوه‌بر این، NPs با اندازه کوچک‌تر می‌توانند توزیع ارگانی گسترده‌تری را نسبت به ذرات بزرگ‌تر نشان دهند [12]. به همین دلیل، جابه‌جایی در سراسر موانعی مانند سد خونی- مغزی و جفت ممکن است اتفاق بیفتد (به‌عنوان مثال مراجع [13] و [14]).

تفاوت‌های قابل‌توجه دیگر بین رفتار توکسیکوکینتیک مواد مولکولی/یونی محلول و NMs را می‌توان در چارچوب اصول حاکم بر جذب، توزیع، سوخت‌وساز و دفع (ADME) یک ماده درک کرد. برای مواد مولکولی/یونی محلول، توکسیکوکینتیک با (۱) جابه‌جایی غیرفعال که شامل انتشار و فیلتراسیون ساده است و یا (۲) جابه‌جایی ویژه، که شامل جابه‌جایی فعال، سیستم‌های جابه‌جایی با واسط حامل و انتشار تسهیل‌شده از طریق غشاهای سلولی، سوخت‌وساز آنزیمی و غیرفعال یا دفع فعال است، هدایت می‌شود. برای NMs، توکسیکوکینتیک شامل انبوهگی، کلوخگی، ساختار تاج پروتئین[2]، دریافت فعال سلولی، توزیع از طریق ماکروفاژها و تخریب و دفع برای NMs خاص است [15]. علاوه‌بر این، شیمی سطح/ترکیبات شیمیایی،

1- Organisation for Economic Co-operation and Development
2- Protein Corona

از طریق پتانسیل آن برای اتصال به انواع مختلف مولکول‌های زیستی بر روی سطح (که تاج «پروتئین» نیز توصیف می‌شود) بر روی توکسیکوکینتیک NPs تأثیر می‌گذارد. از آنجا که دفع غالباً محدود است، تجمع‌زیستی[1] می‌تواند مشابه سایر مولکول‌های کمتر سوخت‌وساز شده رخ دهد. بنابراین، الزامات برای آزمون و مدل‌سازی توکسیکوکینتیک NMs می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی با توکسیکوکینتیک تعیین‌شده برای مواد حل‌شده متفاوت باشد. با توجه به این موضوع، به‌ویژه پتانسیل تجمع و پایداری در ارگان‌ها باید ارزیابی شود، به‌عنوان مثال در دُزهای مکرر و مطالعات طولانی‌مدت توکسیکوکینتیک.

1- Bioaccumulation

فناوری نانو ـ ملاحظات برای انجام مطالعات توکسیکوکینتیک با نانومواد

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد توصیف سابقه و اصول مطالعات توکسیکوکینتیک مربوط به نانومواد است. پیوست **الف** تعاریف اصطلاحات مربوط به توکسیکوکینتیک را همان‌گونه که در استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۴۸۰: سال ۱۳۹۵مورداستفاده قرار می‌گیرد، نشان می‌دهد.

۲ مراجع الزامی

هیچ‌گونه مرجع الزامی در این استاندارد وجود ندارد.

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، علاوه‌بر اصطلاحات و تعاریف ارائه شده در مجموعه استانداردهای ملی ایران- ایزو ۸۰۰۰۴ و استاندارد ملی ایران شماره ۴ -۱۸۳۹۲، در مورد واژگان فناوری نانو، موارد زیر نیز به‌کار می‌رود[۱].

۳-۱

کلوخه

agglomerate

مجموعه‌ای از *ذرات* (۳-۱۰) که به شکل ضعیف یا نسبتاً قوی به یکدیگر متصل شده‌اند، به‌طوری که مساحت سطح خارجی حاصل آنها مشابه مجموع مساحت سطوح تک‌تک اجزاء تشکیل‌دهنده باشد.

یادآوری ۱- نیروهایی که کلوخه را نزدیک به یکدیگر نگه‌می‌دارد، نیروهای ضعیفی هستند، مانند نیروهای وان‌دروالسی و یا درهم‌تافتگی‌های فیزیکی ساده.

یادآوری ۲- کلوخه‌ها به‌عنوان ذرات ثانویه نیز در نظر گرفته می‌شوند و ذرات اصلی منشاء، ذرات نوع اول نامیده می‌شوند.

[منبع: زیربند۳-۴، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۲

انبوهه

aggregate

۱- اصطلاحات و تعاریف به‌کاررفته در استانداردهای ISO و IEC در وبگاه‌های www.iso.org/obp و www.electropedia.org قابل‌دسترس است.

مجموعه‌ای از *ذرات* (۳-۱۰) با پیوندهای قوی یا جوش‌خورده که مساحت سطح خارجی حاصل آنها به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کمتر از مجموع مساحت سطوح تک‌تک اجزاء تشکیل‌دهنده باشد.

یادآوری ۱- نیروهایی که یک انبوهه را کنار یکدیگر نگه‌می‌دارد، نیروهای قوی هستند، مانند پیوندهای کووالانسی یا یونی و یا نتیجه جوش خوردن و گره‌خوردگی فیزیکی پیچیده یا درغیر این‌صورت، ذرات اولیه به هم چسبیده قبلی.

یادآوری ۲– انبوهه‌ها به‌عنوان ذرات ثانویه نیز درنظر گرفته می‌شوند و ذرات اصلی منشاء، ذرات اولیه نامیده می‌شوند.

[منبع: زیربند۳-۵، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۳

نانومقیاس

nanoscale

گستره اندازه بین تقریبا ۱ نانومتر تا۱۰۰ نانومتر است.

یادآوری ۱– خواصی را که از اندازه‌های بزرگتر برون‌یابی نمی‌شوند غالبا در این گستره اندازه نشان داده می‌شوند.

[منبع: زیربند ۲-۱، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۴-۳

فناوری نانو

nanotechnology

استفاده از دانسته‌های علمی در دست‌کاری و کنترل ماده، غالبا در *نانومقیاس* (۳-۳) برای بهره‌برداری از پدیده‌ها و خواص وابسته به ساختار و اندازه است. این خواص متمایز از خواص اتم‌ها و مولکول‌های منفرد و غیرقابل برون‌یابی (استنتاج) از شکل توده همان ماده هستند.

یادآوری– دست‌کاری و کنترل شامل سنتز مواد هم می‌شود.

[منبع: زیربند ۲-۳، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۵-۳

نانوماده

nanomaterial

ماده‌ای که هر بعد خارجی آن یا ساختار داخلی یا ساختار سطحی آن *نانومقیاس* (۳-۳) است.

یادآوری ۱– این اصطلاح عمومی شامل *نانوشیء* (۳-۶) و *ماده نانوساختاریافته* (۳-۸) است.

یادآوری ۲- زیربندهای ۳-۶ تا ۳-۱۱ نیز مشاهده شوند.

[منبع: زیربند ۲-۴، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۶-۳

نانوشیء

nano-object

هر قطعه مجزا از ماده با یک، دو و یا سه بعد خارجی در محدوده *نانومقیاس* (۳-۳) است.

یادآوری– ابعاد خارجی دوم و سوم عمود بر بعد اول و همچنین عمود بر یکدیگر هستند.

[منبع: زیربند ۲-۵، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۷-۳

نانوساختار

nanostructure

ترکیبی از اجزای تشکیل‌دهنده مرتبط با هم که یک یا بیشتر از یک جزء آنها در محدوده *نانومقیاس* (۳-۳) قرار دارند.

یادآوری– یک ناحیه به‌صورت یک مرز مشخص‌شده از ناپیوستگی در خواص تعریف می‌شود.

[منبع: زیربند ۲-۶، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۸-۳

ماده نانوساختاریافته

nanostructured material

ماده‌ای که دارای *نانوساختار* (۳-۷) داخلی و یا نانوساختار سطحی است.

یادآوری- این تعریف، امکان اینکه *نانوشیء* (۳-۶) ساختار داخلی و یا ساختار سطحی نانومقیاس داشته باشد را رد نمی‌کند. اگر ابعاد خارجی شیء در *نانومقیاس* (۳-۳) باشند، عبارت نانوشیء توصیه می‌شود.

[منبع: زیربند ۲-۷، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۹-۳

نانوذره

nanoparticle

نانوشیء با تمام ابعاد خارجی در مقیاس نانو که در آن طول بلندترین و کوتاه‌ترین محورهای نانوشیء به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت نداشته باشد.

یادآوری- چنانچه ابعاد به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت داشته باشند (معمولا بیشتر از سه برابر) ممکن است اصطلاحاتی مانند نانولیف (زیربند ۴-۵ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵) یا نانوصفحه (زیربند ۴-۶ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵) بر نانوذره ترجیح داده شود.

[منبع: زیربند ۴-۴، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۱۰

ذره

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 *نانواشیاء* (۳-۶) به‌کار گرفته می‌شود.

[منبع: زیربند ۳-۱، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۱۱

ماده

substance

یک عنصر یا ترکیب شیمیایی منفرد یا یک ساختار پیچیده از ترکیبات است.

[منبع: زیربند 3.6، استاندارد ISO 10993-9: 2009]

۴ کوته‌نوشت‌ها

کوته نوشت‌ها	معادل انگلیسی	معادل فارسی
AAS	Atomic Absorption Spectrometry	طیف‌سنجی جذب اتمی
ADME	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion	جذب، توزیع، سوخت وساز، دفع
AUC	Area under the Curve	سطح زیر منحنی
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid	مایع لاواژ برونکوآلوئولار
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry	پلاسمای جفت‌شده القایی- طیف‌سنجی جرمی

IV	Intravenous	داخل وریدی
IVIVE	in vitro in vivo extrapolation	برون‌یابی برون‌تنی- درون‌تنی
MPS	mononuclear phagocytic system	سیستم بیگانه‌خوار تک‌هسته‌ای
MWCNT	Multi Walled Carbon Nanotubes	نانولوله کربنی چنددیواره
NM (s)	Nanomaterial (s)	نانوماده (ها)
NP (s)	Nanoparticle (s)	نانوذره (ها)
PBPK	Physiologically Based Pharmacokinetic (model)	(مدل) فارماکوکینتیک بر اساس فیزیولوژی
SSA	Specific Surface Area	مساحت سطح ویژه
TG	Test Guideline	راهنمای آزمون

۵ اهمیت اطلاعات توکسیکوکینتیک در ارزیابی ریسک نانومواد

۵-۱ کلیات

مطالعات توکسیکوکینتیک در دستیابی به دیدگاه سم‌شناسانه مربوط به ارگان‌های هدف، مهم قلمداد می‌شوند و می‌توانند در ارزیابی ایمنی و ریسک NMs و/یا NPs بیشتر مورد توجه قرار گیرند. علاوه‌براین، ممکن است اطلاعات به‌دست آمده از ارتباط مدت‌های مواجهه (به‌عنوان مثال حاد، مزمن) در مطالعات سمیت براساس پایداری NP در طول زمان، به‌کاربرده شود. در نهایت، چنین اطلاعاتی برای استفاده در برون‌یابی‌های قابل‌اعتمادتر بر روی گونه‌ها، زمان و مسیرهای مواجهه ضروری است و می‌تواند برای گروه‌بندی، بررسی- سراسری و نادیده‌گرفتن برخی موارد، مورداستفاده قرار گیرد.

۵-۲ امکان استفاده از اطلاعات توکسیکوکینتیک

در مورد مواد محلول، قانون موردنیاز برای تهیه اطلاعات کینتیک بین کشورها نیز متفاوت است، اما غالباً این اطلاعات الزام قانونی ندارند [16]. هرچند، دانش توکسیکوکینتیک برای اهداف مختلف در رویکرد ارزیابی ریسک فعلی بر اساس آزمون‌های حیوانی ضروری است:

- برای پیش‌بینی مواجهه سیستمیک و دُز بافتی داخلی (دُز داده‌شده[1] را با دُز هدف[2] مرتبط[3] می‌کند)؛

1- Given dose
2- Target dose
3- Correlate

- برای دانستن این‌که آیا یک آزمون، مانند یک آزمون سمیت ژنی در مغز استخوان یا اسپرم، مرتبط است یا خیر (آیا ماده به این بافت‌ها می‌رسد؟)؛

- برای انجام برون‌یابی مسیر به مسیر[1] (به‌عنوان مثال به مرجع [17] مراجعه شود)؛

- برای انجام برون‌یابی دُز زیاد به کم[2] و یا انتخاب دُزهای مناسب (به‌عنوان مثال به مراجع [18] و [19] مراجعه شود)؛

- برای تأیید تطبیق نتایج آزمون از حیوانات به انسان (یعنی انجام برون‌یابی بین گونه‌ای؛ به‌عنوان مثال مرجع [20])؛

- برای امکان‌پذیرکردن برون‌یابی تجمع مواد نسبت به زمان، زیرا آزمون‌های حیوانی کل عمر انسان را پوشش نمی‌دهند، در حالی‌که تجمع می‌تواند در تمام عمر ادامه داشته و منجر به افزایش غلظت در بافت شود (به‌عنوان مثال مرجع [21]).

زمانی‌که از آزمون‌های حیوانی تا حد ممکن اجتناب می‌شود و ارزیابی ریسک اغلب بر اساس نتایج آزمون‌های برون‌تنی انجام می‌شود، همان‌طور که در اصل 3Rs[3] پیش‌بینی شده‌است [22]، اطلاعات کینتیکی، حتی ضروری‌تر هم می‌شوند. آزمون‌ها در شرایط برون‌تنی، نمی‌توانند آن‌گونه که در آزمون‌های حیوانی (درون‌تنی) انجام می‌شود، بیانگر کلیت توکسیکوکینتیک کامل بدن باشد.

به‌عنوان مثال، جذب در روده‌ها در یک آزمون برون‌تنی با سلول‌های کبدی لحاظ نمی‌شود. بنابراین، نتایج آزمون‌های برون‌تنی با استفاده از مدل‌های کینتیک، در فرآیندی تحت عنوان برون‌یابی برون‌تنی/درون‌تنی (IVIVE) باید با اطلاعات کینتیکی تکمیل شود.

علاوه‌بر این، اطلاعات توکسیکوکینتیک دیدگاهی از ارگان‌های هدف بالقوه و بار[4] اندام را که در نهایت ممکن است منجر به سمیت شود، فراهم می‌کند. این امر امکان انتخاب بهتر و طراحی مطالعات مخاطره را فراهم می‌کند، به‌عنوان مثال، چشم‌پوشی از مطالعه سیستمیک مشخص درصورتی که جذب و تجمع مواد رخ ندهد و یا افزودن آنالیزهای بیشتر به یک مطالعه که مربوط به ارگان‌های هدف شناسایی‌شده باشند.

1- Route-to-route extrapolation
2- High-to-low-dose extrapolation
3- 3Rs stand for Replace, Reduce, Refine
4- Burden

این ملاحظات هم برای NMs و هم مواد انحلال‌پذیر معتبر هستند. نکته ویژه برای NMs غیرقابل تجزیه[1] این است که پتانسیل بالاتری برای تجمع وجود دارد. درصورت تجمع، تعیین کینتیک از اهمیت بیشتری برای برآورد صحیح ریسک سلامتی برخوردار است، زیرا لازم است یک برون‌یابی نسبت به زمان انجام شود. این امر برای تجمع NMs دقیقا به همان اندازه تجمع مواد معتبر است. بنابراین، برای اهداف ارزیابی ریسک، غلظت‌های داخلی (یا بافت هدف) معیارهای بهتری از دُز نسبت به دُزهای خارجی محسوب می‌شوند.

نکته ویژه برای NMs این است که آنها یک الگوی توزیع متمایز با نسبت‌های زیاد در ارگان‌های دارای سیستم بیگانه‌خوار تک‌هسته‌ای (MPS)، به‌ویژه کبد و طحال دارند. چنین اطلاعاتی می‌توانند به‌عنوان مثال، تضمین‌کننده توجه ویژه به پتانسیل تأثیرات بر جمعیت‌های سلولی کبد و طحال باشند [21] [23].

با توجه به شکل‌های مختلفی که NMs می‌توانند وجود داشته یا تولید شوند، آزمون همه آنها به منابع زیادی نیاز دارد، گروه‌بندی برای NMs بسیار موردتوجه است. مقالات اخیر درباره امکان گروه‌بندی NMs، پارامترهای کینتیک را به‌عنوان بخش اساسی اطلاعات توصیف می‌کنند که براساس آنها می‌توان اطلاعاتی مانند: تجزیه (از جمله انحلال)، توزیع و پتانسیل تجمع‌زیستی یا پایداری و توزیع را مبنای گروه‌بندی و مطابقت‌ها قرارداد [24] [25] [26]. انحلال در واقع یک پارامتر فیزیکی‌ـ شیمیایی است که به محیط موضعی (به‌عنوان مثال آب، بافر و/یا مایعات بدن (شبیه‌سازی‌شده) نیز وابسته است، اما می‌تواند به‌عنوان یک پارامتر کینتیکی نیز لحاظ شود. سرعت انحلال/تجزیه، دیدگاهی را در مورد رفتار توکسیکوکینتیک یک NM فراهم می‌کند. تا زمانی که انحلال رخ دهد، کینتیک NMs از طریق ماهیت ذره بودن نانوماده کنترل می‌شود، درحالی‌که پس از انحلال، یون‌ها یا مولکول‌های (محلول) توکسیکوکینتیک را تعیین می‌کنند. برای ارزیابی این‌که آیا و تا چه حد NMs مختلف در ارگان‌های موردنظر توزیع را نشان می‌دهند، همچنین به‌عنوان بخشی از توجیه علمی برای گروه‌بندی و برای ارزیابی این‌که آیا می‌توان مخاطرات یکسانی را درنظر گرفت یا خیر، مطالعات توزیع موردنیاز است. تجمع، یک پارامتر کینتیک است که مستقیماً اندازه‌گیری نمی‌شود، اما از طریق سایر پارامترهای کینتیکی (اساسی‌تر) یعنی جذب، توزیع و حذف تعیین می‌شود.

۳-۵ موضوعات کلیدی توکسیکوکینتیک برای نانومواد

خواص کینتیک یک ترکیب، شامل توزیع‌زیستی[2]، تجزیه‌زیستی[3] و پایداری‌زیستی[4] است و می‌تواند

1- Non-degradable
2- Biodistribution
3- Biodegradable
4- Biopersistence

به وسیله دوره زمانی جذب، توزیع، سوخت‌وساز و دفع (ADME) یک ترکیب در بدن با گذشت زمان توصیف شود. جذب، توزیع، (سوخت‌وساز) و دفع را می‌توان به عنوان فرآیندهای بالقوه متوالی توصیف کرد. اصول اساسی که در استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۴۸۰: سال ۱۳۹۵ [۳] و استاندارد ISO 10993-16:2017 شرح داده شده‌اند، چارچوبی را برای نحوه انجام مطالعات توکسیکوکینتیک ارائه می‌کنند. در یک نشست تخصصی OECD، توکسیکوکینتیک نانومواد ساخته‌شده، موضوعات تعیین‌کننده در توکسیکوکینتیک NMs و نحوه پرداختن به آنها موردبحث و بررسی قرار گرفت [27].

جذب نانومواد/نانواشیاء کنونی پس از مواجهه خوراکی معمولاً بسیار کم، به ترتیب ٪ ۱ و کمتر است [17] [28].

تفاوت عمده دیگر بین توکسیکوکینتیک مواد حل‌شده و NMs این است که توزیع بافت برای مواد حل‌شده وابسته به غلظت است (یعنی تفاوت غلظت در گردش/خون و اندام، میزان دریافت اندام را تعیین می‌کند) و به‌طور کلی تعادل بین خون و غلظت اندام حاصل می‌شود. در مقابل، همان‌گونه که در مشاهدات توزیع بخش عمده‌ای از یک دُز تزریق‌شده به طحال و کبد نشان داده شده‌است [12] [17] [29]، نانومواد/نانوذرات به سرعت توسط سلول‌های سیستم بیگانه‌خوار تک‌هسته‌ای (MPS) از گردش سیستمیک خارج می‌شوند. هرچند، گرانولوسیت‌ها نیز قادر به جذب NPs هستند [30]. این به معنی آن است که پلاسما معمولاً محیط مناسبی برای پایش مواجهه NP نیست و پارامترهای کینتیک پلاسما، مانند مساحت سطح زیر منحنی پلاسما (AUC)، معمولا به آن مرتبط نیستند. علاوه‌بر این، مدل‌های PBPK برای نانوذرات، لازم است بر پایه جریان خون و دریافت NPs توسط ماکروفاژها باشد (به‌عنوان مثال مراجع [5]، [31] و [32])، و یا آن‌که لازم است تا هدف‌گذاری خاصی توسط لیگاندها به‌عنوان اجزای سازنده یک NM برای هدف‌گیری دارو [33] [34]، به جای تقسیم تعادلی[1]، انجام شود.

در مورد سوخت‌وساز، با توجه به عدم اطمینان در ارتباط با وقوع سوخت‌وساز آنزیمی برای بسیاری از NMs (به‌عنوان مثال برای NMs غیر آلی مانند فلز و اکسیدهای فلزی)، ممکن است تبدیل‌زیستی[2] و یا تجزیه اصطلاحات مناسب‌تری باشند. هرچند، NMs آلی می‌توانند متابولیزه شوند. انحلال NM می‌تواند به عنوان یک فرآیند کلی‌تر که NMs را تغییر می‌دهد نیز لحاظ شود و از این رو مشابه سوخت‌وساز است.

1- Equilibrium partitioning
2- Biotransformation

دفع NMs موجود در بدن از طریق شیر مادر [35]، ادرار و صفرا [13] امکان‌پذیر است، اما به نظر می‌رسد که این امر برای تمام انواع NPs امکان‌پذیر نباشد. برای برخی از NPs (به‌عنوان مثال TiO_2) به نظر می‌رسد که تنها راه دفع (علاوه بر شیر مادر)، انحلال باشد که NMs نامحلول را بسیار پایدار و تجمع‌پذیر می‌کند.

از همین رو، اگرچه اطلاعات کینتیک در کل برای NMs به اندازه مواد مولکولی مهم است (به زیربند ۵-۱ مراجعه شود)، اما نوع اطلاعات کینتیکی که ضروری است، متفاوت بوده و سایر موارد هنگام آزمون خواص توکسیکوکینتیک نشان داده می‌شوند. پارامترهای کلیدی کینتیک برای NMs عبارتند از:

- تجزیه که اغلب با سرعت انحلال در محیط‌های مرتبط فیزیولوژیک مختلف (از جمله در ماکروفاژها) تعیین می‌شود (برای جزئیات بیشتر به زیربند ۶-۱ مراجعه شود)؛

- جذب (یعنی جابه‌جایی از سدهای خارجی، وابسته به مسیر مواجهه، برای جزئیات بیشتر به بند ۹ مراجعه شود)؛

- دریافت توسط ماکروفاژها/گرانولوسیت‌ها یا توسط مونوسیت‌ها در بافت‌ها (به‌عنوان یک پارامتر بسیار جدید، امکان‌پذیری آن هنوز ناشناخته است)؛

- سرعت حذف[1] از بافت‌ها (برای جزئیات بیشتر به بند ۱۲ مراجعه شود)؛

سرعت حذف می‌تواند مرتبط با اطلاعات فیزیولوژیکی در مورد محتوای ماکروفاژی بافت‌ها باشد که به تعیین سرعت دریافت[2] بالقوه در بافت‌ها کمک می‌کند. در نهایت این پارامترهای کلیدی، توزیع بافتی NM را تعیین می‌کنند و پتانسیل ریسک اثرات سمی در ارگان‌های هدف را نشان می‌دهند.

۶ عوامل مؤثر بر توکسیکوکینتیک نانومواد

۶-۱ سرعت انحلال

یکی از عوامل اصلی برای القاء اثر سوء (سمی) از طریق NMs، مربوط به حضور یا رهایش[3] نانواشیاء، یون‌ها، مولکول‌ها و یا اجزای آزاد از هر نانوماده مجزا است. از این نظر، انحلال و یا به بیان دقیق‌تر، سرعت انحلال NM می‌تواند برای ارزیابی ریسک بسیار تعیین‌کننده تلقی شود. اگر یک NM پیش از جذب کاملاً

1- Elimination
2- Uptake rate
3- Release

حل شده‌باشد، می‌توان از ارزیابی کلاسیک ریسک مواد شیمیایی/مولکول‌های محلول استفاده کرد (یعنی هیچ ملاحظه خاصی در مورد NM قابل‌اجرا نیست [36] [37]).

سرعت انحلال NM نسبت به متغیرهای پروتکل آزمون تجربی بسیار حساس است، به‌عنوان مثال روش پراکنش NM، توزیع اندازه اولیه و کلوخه/انبوهه، دما، pH، ترکیب‌بندی محیط آزمون، شرایط هیدرودینامیکی (هم‌زدن و غیره). این حساسیت به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از مواد حل‌شده است. علاوه‌بر این، هنوز در مورد مناسب‌ترین ترکیب مرحله جداسازی جامد- مایع (اولترافیلتراسیون، اولتراسانتریفیوژ و غیره) و فنون آنالیز عنصری (طیف‌سنجی اتمی، ولتامتری و غیره) و همچنین در مورد اینکه کدام بخش محلول (یون‌های آزاد، کمپلکس‌های محلول با وزن مولکولی پایین، فلز متصل به درشت مولکول‌ها و غیره) بیشترین کاربرد را برای اهداف سم‌شناسی دارند، اجماع‌نظر وجود ندارد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که سرعت انحلال NM در محیط فیزیولوژیکی مرتبط، هنوز از نقطه نظر نظارتی به‌عنوان نقطه‌پایان به‌طور ناقص تعریف شده‌است. از همین رو، توسعه و استانداردسازی بیشتر برای روش‌های آزمون سرعت انحلال بسیار ضروری است (ISO/TR 19075)[1] [38].

سرعت انحلال یک NM معین در انسان با نوع مایعات بدن متغیر است؛ به‌عنوان مثال، به‌دلیل تفاوت درpH این مایعات. بنابراین، تعیین سرعت انحلال در یک مجموعه محیط شبیه‌سازی‌شده با مایعات بدن، ضروری است. مایعات مربوط به بدن نه تنها بزاق، مخاط ریه، شیره معده، مایع روده و پلاسما هستند، بلکه مایعات لیزوزومی را نیز شامل می‌شوند، زیرا در نهایت NMs در لیزوزوم‌های ماکروفاژها قرار می‌گیرند [37]. به‌عنوان مثال، ذرات شبه‌نانوسیم[2] NiO با مخلوط‌شدن با مایع لیزوزومی مصنوعی در مدت ۲۴ ساعت ٪ ۱۰۰ حل شدند، درحالی‌که این ذرات در آب، آب شور و مایع مصنوعی فضای بینابینی ریه (محلول گمبل[3]) در ۲۱۶ ساعت به مقدار بسیار کمی (٪ ۳٫۵ تا ٪ ۶٫۵) حل شدند. نانوذرات کروی NiO هنگامی که با مایع لیزوزومی مصنوعی مخلوط شدند، پس از ۲۱۶ ساعت فقط ٪ ۱۲ و ٪ ۳۵ حل شدند و بزرگ‌ترین NiO NPs با شکل‌های نامنظم به سختی حل شدند که نشان‌دهنده تأثیر شکل بر انحلال است [39]. در این حالت، ذرات شبه‌نانوسیم طی ۲۴ ساعت از بین می‌روند. هم در مورد ذرات شبه‌نانوسیم و هم در مورد نانوکره‌ها[4]، نانوذرات

۱- استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۱۵۶: سال ۱۳۹۸، فناوری نانو- استفاده و کاربرد آزمون‌های برون‌تنی بدون سلولی و روش‌شناسی‌های ارزیابی ماندگاری‌زیستی نانوماده، با استفاده از استاندارد ISO/TR 19057: 2017 تدوین شده‌است.

2- Nanowire-like
3- Gamble’s solution
4- Nanospheres

و یون‌ها می‌توانند طی ۲۴ ساعتِ اول وجود داشته باشند، اما با نسبت متفاوت (که با گذشت زمان تغییر می‌کند) و به این شکل بر ارزیابی ریسک تأثیر می‌گذارند.

۲-۶ خواص شیمیایی فیزیکی تعیین‌کننده رفتار توکسیکوکینتیک

چندین عامل مشخص بر کینتیک نانوماده مهندسی‌شده تأثیر می‌گذارد (به‌غیر از عواملی که بر کینتیک مواد مولکولی نیز تأثیر می‌گذارند) [13] [40] [41] [42] [43]:

- اندازه (ذره اولیه و کلوخه/انبوهه) نانوماده؛

- بار سطحی نانوماده؛

- ریخت‌شناسی/شکل (به‌عنوان مثال نسبت منظری[1] در مورد الیاف)؛

- اتصال پروتئین به نانوماده؛

- شیمی سطح (به‌عنوان مثال پوشش‌ها، آب‌گریزی).

هم اندازه و هم بار سطحی، نشان داده‌اند که بر ترکیب‌بندی و تراکم پروتئین‌های متصل به NPs تأثیر می‌گذارند [۴۴].

در مورد سرعت انحلال، این خواص فیزیکی- شیمیایی ممکن است در محیط‌های مختلف تغییر کنند، به‌عنوان مثال مانند ماده آغازین[2] در دُز محیطی[3]، مایعات بدن و در بافت‌ها. بنابراین، ممکن است مشخصه‌یابی فیزیکی- شیمیایی در مراحل مختلف آزمون توکسیکوکینتیک لازم باشد.

آنالیز رابطه میان خواص فیزیکی- شیمیایی NMs و رفتار توکسیکوکینتیک آنها هنوز هم امری دشوار است، زیرا مطالعات کمی وجود دارد که به‌طور نظام‌مند ارتباط تغییر یک خاصیت را نسبت به زمان بررسی کرده باشند. علاوه‌بر این، کیفیت مطالعات همواره کافی نیست، به‌ویژه مواردی که در اوایل تحقیق در مورد NMs انجام شده‌است، زمانی که دانش بسیار کمی برای اطمینان از کیفیت قطعی وجود داشته است.

برای هر مطالعه انجام‌شده در مورد NMs، از جمله مطالعات توکسیکوکینتیک، (به‌عنوان مثال اندازه، کلوخگی/انبوهگی، ریخت‌شناسی، تجزیه/انحلال، بار سطحی، شیمی سطح) NM پراکنده‌شده یا هواسُل

1- Aspect ratio
2- Pristine material
3- Dosing medium

ارزشیابی‌شده، لازم است دانش پارامترهای فیزیکوشیمیایی، موجود باشد. برای مشاهده اطلاعات در مورد تعیین پارامترهای مختلف فیزیکوشیمیایی به استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۶۱۱: سال ۱۳۹۶ مراجعه شود.

۶-۲-۱ اندازه

در بسیاری از مطالعات، مشاهده شده‌است که NM با اندازه کوچک‌تر منجر به توزیع‌زیستی گسترده‌تری در بافت‌های دیگر، در مقایسه با NM با اندازه بزرگ‌تر، شده‌است. به‌عنوان مثال، هنگام مقایسه اندازه Au-NPs گزارش شد که کوچک‌ترین NPs (یعنی ۱۰ نانومتر)، گسترده‌ترین توزیع ارگانی را پس از تجویز داخل وریدی نشان داده‌است [12]. درخت‌سانان[1] پلی آمیدوآمین (PAMAM)[2] با اندازه ذرات ۵ نانومتر، در مقایسه با ذرات با اندازه ۱۱ نانومتر و ۲۲ نانومتر، توزیع مطلوب‌تری را در تومورها در موش‌ها نشان دادند که حاکی از شناسایی کمتر سیستم ایمنی و اتصال اختصاصی کمتر با اندام[3] است [45]. نتایج متناقضی در مورد تأثیر اندازه بر الگوی توزیع به‌دست آمده‌است: ذرات۲۰ نانومتری Ag-NPs، پس از تزریق IV، عمدتا در کبد و سپس در کلیه‌ها و طحال توزیع می‌شوند، درحالی‌که ذرات بزرگ‌تر (۸۰ نانومتر و ۱۱۰ نانومتر) عمدتا در طحال و سپس در کبد و ریه توزیع می‌شوند. در سایر ارگان‌های ارزشیابی‌شده، هیچ تفاوت عمده‌ای بین اندازه‌ها مشاهده نشد [29]. با این همه، در مطالعه‌ای دیگر، برای Ag-NPs پس از تجویز داخل وریدی، تمام اندازه‌های ذرات (۱۰ نانومتر، ۴۰ نانومتر و ۱۰۰ نانومتر) صرف‌نظر از پوشش آنها، موردبررسی قرار گرفتند و بالاترین غلظت نقره را طحال و کبد و سپس ریه، کلیه و مغز نشان دادند [46].

همچنین گزارش‌هایی مبنی بر این امر وجود دارد که NM کوچک‌تر منجر به غلظت بالاتر در ارگان‌ها می‌شود که نشان‌دهنده جذب مخصوص بافتی بالاتر است. به‌عنوان مثال، غلظت نقره در طحال، ریه، کلیه، مغز و خون موش‌های تحت درمان[4] با نانوذرات نقره ۱۰ نانومتر نسبت به موش‌هایی که با ذرات بزرگ‌تر تحت درمان قرار گرفته بودند، به‌طور قابل‌توجهی بالاتر بود. این یافته با عوارض جانبی مرتبط (مردگی سلول‌های کبدی در زوم میانی[5]، خونریزی کیسه صفرا[6]) که در موش‌های تحت درمان با نانوذرات نقره ۱۰ نانومتر مشاهده شد، همبستگی داشت؛ درصورتی‌که ضایعه‌های مشاهده‌شده در موش‌های تحت درمان با نانوذرات نقره ۴۰ نانومتر و ۱۰۰ نانومتر، به ترتیب خفیف‌تر یا ناچیز بودند [46]. پس از مواجهه استنشاقی، هیچ‌گونه احتباس وابسته به اندازه در ریه مشاهده نشد. تمامی اندازه‌های NPs مورد بررسی (۱۰ نانومتر، ۱۵ نانومتر،

1- Dendrimers
2- Poly amidoamine
3- Organ-specific binding
4- Treated
5- Midzonal hepatocellular necrosis
6- Gall bladder hemorrhage

۳۵ نانومتر و ۷۵ نانومتر از NPs ایریدیم-192) زمان‌های باقیماندگی[1] مشابهی را نشان دادند [47]. پاک‌سازی طولانی‌مدت و آهسته ایریدیم از ریه موش (یعنی نیمه- زمان باقیماندگی[2] در چند صد روز) وجود داشت. در بدن یک جابه‌جایی کم وجود داشت (حداکثر ٪ ۰٫۴ از بارِ ریه). هرچند، توزیع ارگانی در کبد و طحال تفاوت قابل‌توجهی را بین اندازه ۱۰ نانومتر و ۱۵ نانومتر از یک طرف و ۳۵ نانومتر و ۷۵ نانومتر از طرف دیگر با سطوح بالا برای NPs کوچک‌تر نشان داد. کرلینگ[3] و همکاران [48] نیز نشان دادند که NPs کوچک‌تر ایریدیم و کربن، پس از استنشاق، بیشتر به بدن منتقل می‌شوند [48].

یکی از عوامل پیچیده در ارزیابی سامانمند تأثیر اندازه NP بر روی توکسیکوکینتیک، این است که سایر خواص (به‌عنوان مثال شکل، ترکیب‌بندی سطح و غیره) باید در بین ذرات آزمون‌شده مشابه باشند.

به نظر می‌رسد که محدوده‌های بهینه اندازه برای دریافت بافتی وجود داشته‌باشد که به ترتیب با ارگان و نوع سلول در شرایط برون‌تنی متفاوت هستند. برای NPs کلوخه (< ۰٫۵ µm)، انتظار می‌رود که دریافت توسط ماکروفاژها اصلی‌ترین مسیر درون‌سازی شده‌باشد، درحالی‌که ذرات کوچک‌تر در درجه اول توسط مسیرهای اندوسیتوتیک[4] فرآوری می‌شوند [13]. برای نانوذرات طلا مشخص شده‌است که اندازه بهینه برای دریافت در سلول‌های SK-BR-3[5] سرطان پستان انسانی، ۲۵ نانومتر تا ۵۰ نانومتر است [49].

جنبه دیگری از اندازه، این واقعیت است که NPs می‌توانند بر اساس ذرات اولیه به عنوان واحدهای[6] سازنده بالقوه در شکل‌گیری کلوخه‌ها (یعنی سازه‌هایی که توسط نیروهای ضعیف واندروالس تشکیل می‌شوند) و انبوهه‌ها (یعنی ساختارهایی که توسط نیروهای قوی اتصال مولکولی تشکیل شده‌اند)، ابرساختارها را تشکیل می‌دهند. برای نانوذرات طلا با ذرات اولیه ۵ نانومتر تا ۸ نانومتر، این ساختارها می‌توانند گستره ۴۰ نانومتر تا ۲۰۰۰ نانومتر داشته باشند [50]. یکی از تأثیرات مداخله‌گر در دُز داخل وریدی نانوساختارهای طلا با مقدار قابل‌توجهی از انبوهه‌های باقی‌مانده در سرنگ‌های تجویز، گزارش شده‌است. اگرچه چنین هدررفت‌هایی غالباً در وسایل آزمایشگاهی گزارش می‌شود و ممکن است ویژه انبوهه‌ها نباشد، اما ممکن است به دلیل رسوب سریع‌تر انبوهه‌ها، هدررفتن آن‌ها به آسانی رخ دهد. انبوهه می‌تواند پتانسیل تجمع را تغییر دهد و منجر به اختلاف توزیع وابسته به اندازه شود. اختلاف در توزیع به‌طور چشمگیری در ریه دیده می‌شود

1- Retention times
2- Retention half-times
3- Kreyling
4- Endocytotic
5- A human breast cancer cell line isolated by the Memorial Sloan–Kettering Cancer Center
6- Blocks

و انبوهه‌ها در مقایسه با ذرات اولیه، تجمع قابل‌توجه بیشتری نشان می‌دهند. انبوهه‌ها همچنین به‌طور قابل‌توجهی بیشتر در قلب تجمع می‌یابند [50].

۶-۲-۲ خواص سطحی (شامل بار)

سطح و به‌ویژه پوشش NPs می‌توانند تا حدی از طریق اصلاح بار سطحی بر روی توزیع NP تأثیر گذارند. از آنجا که سلول‌های مختلف می‌توانند بار غشایی متفاوتی داشته باشند، که به وضعیت اکسایش- کاهش آنها بستگی دارد، NPs دارای بار سطحیِ مشخص توسط همه سلول‌ها با کارایی برابر دریافت نمی‌شوند [51]. برای NPs پوشش‌داده شده با درخت‌سانان، علاوه‌بر تأثیر اندازه آنها همان‌گونه که در بالا توضیح داده شد، الگوی توزیع ارگان نیز تحت‌تأثیر بار سطحی قرار دارد، زیرا درخت‌سانان دارای بار مثبت توزیع بیشتری را در کلیه نشان دادند، درحالی‌که درخت‌سانان خنثی و بدون بار و درخت‌سانان ۵ نانومتری دارای بار منفی تمایل داشتند که ترجیحاً در کبد و طحال توزیع شوند [45]. مشاهدات مشابهی در مورد نانوافزاره‌های چندسازه طلا/درخت‌سان[1] انجام شده‌است [52]. مطالعات توزیع‌زیستی برای نقاط کوانتومی (QDs)[2] نشان داد که CdSe/ZnS QDs منفی و خنثی، ترجیحاً در کبد و طحال توزیع می‌شود، درحالی‌که نقاط کوانتومی مثبت عمدتاً در کلیه و مغز رسوب می‌کنند [53]. از این مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که یک بار سطحی مثبت، مهاجرت به کلیه را ترجیح می‌دهد.

همچنین به‌خوبی شناخته شده‌است که پوشش نانوذرات و یا نانومیله با پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG)[3] بر نیمه- عمر در خون تأثیر می‌گذارد [31]، [54]، [55]. این امر احتمالاً بیشتر یک اثر فضایی است تا اثر بار. این امر به‌عنوان مثال در پلیمریزه‌شدن با پلی‌اتیلن‌گلیکول[4] روی سطح نانومیله‌های طلا، نانوذرات طلا و نانولوله‌های آلی نشان داده شده‌است [55]، [56]، [57]، [58]. سطوح بالاتر پیوند PEG برای جلوگیری از تاثیر سیستم بیگانه‌خوار تک‌هسته‌ای، افزایش نفوذپذیری و احتباس (EPR)[5] در سایت‌های تومور و برای سرکوب تجمع نانومیله‌های طلای در گردش، سودمند است [56]. برای PEG-Au-NPs، تزریق داخل وریدی نانوذرات، ۴ نانومتری و ۱۳ نانومتری، مدت زمان طولانی گردش خون را تا ۷ روز نشان داد [۵۷]. این روندهای کینتیکی با الگوهای توزیع بافت به‌ویژه در کبد، طحال و گره لنفاوی وابسته به روده‌بند[6] همبستگی همبستگی خوبی داشتند. سیستم بیگانه‌خوار تک‌هسته‌ای از دریافت ذرات پلیمریزه شده PEG که به پروتئین‌های کمی متصل می‌شوند، اجتناب کرده، بنابراین مدت زمان بیشتری در خون گردش می‌کنند [59]

1- Gold/dendrimer composite nanodevices
2- Quantum dots
3- Polyethyleneglycol
4- PEGylation
5- Enhancing Permeability and Retention
6- Mesenteric

[60]. همچنین، در مورد نانوذرات طلای ۱۰ نانومتری درپوش‌داده شده با لیگاند سیترات[1] و نانوذرات طلا ۱۰ نانومتری پلیمریزه‌شده با PEG در شیر مادر، تفاوت در توزیع پس از تزریق داخل وریدی موش‌های شیرده مشاهده شد که حاکی از حضور بالاتر و طولانی‌تر نانوذرات طلای پلیمریزه‌شده با PEG در شیر مادر است [61].

برای سه اندازه مختلف نانوذره نقره (۱۰ نانومتر، ۴۰ نانومتر، ۱۰۰ نانومتر) هیچ تفاوتی در توزیع بین نانوذرات نقره پوشش‌داده‌شده با سیترات یا پلی وینیل پیرولیدون وجود نداشت [46].

چندین استاندارد برای توصیف روش‌های تعیین مشخصات سطح NMs و NPs در دسترس است، از جمله: استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۲۰۶: سال ۱۳۹۵ و استانداردهای ISO/TS 14101:2012 ISO/TR 14187:2011 و ISO 20579-4:2018. برای شیمی سطح مستحکم نیز مسائل مربوط به قابلیت تولید مجدد NPs به‌دلیل تنوع ذاتی آنها از اهمیت برخوردار است. مجموعه‌ای مناسب از روش‌های مشخصه‌یابی که به‌طور مداوم در مواقع حساس به‌کار گرفته می‌شود، می‌تواند ابزار مفیدی برای ارزیابی و تعیین تجدیدپذیری و منابع تغییرپذیری باشد [62].

۶-۲-۳ تاج پروتئینی[2]

پس از تماس با هر نوع محیط زیستی، نانوذرات بلافاصله با مولکول‌های زیستی حاضر در ماتریس زیستی اطراف، پوشانده می‌شوند [59]. این لایه اغلب پروتئینی است و به‌طور کلی تحت عنوان «تاج پروتئینی» نامیده می‌شود. با وجود حضور حدود ۳۷۰۰ پروتئین در پروتئوم پلاسمای کامل و حتی دیگر پروتئین‌های موجود در سایر مایعات، واضح است که ترکیب‌بندی شیمیایی تاج پروتئینی در اطراف یک نانوذره می‌تواند بسیار متفاوت باشد و بر روی توکسیکوکینتیک نانوذره و شناسایی توسط سلول‌ها تأثیر گذارد [59]، [63]، [64]، [65]. حتی سرم ممکن است مدل کاملی برای محیط خون *درون‌تنی* نباشد، زیرا فاکتورهای انعقادی خون را از دست داده‌است [44].

یکی از تأثیرات مهم شناخته‌شده برای تاج پروتئینی که به ترکیب‌بندی آن بستگی دارد، به‌عنوان مثال، پایداری یک نانوذره است. آلبومین موجود در آب و یا محیط‌کشت (DMEM)[3] نشان داده‌است که بسیاری از نانومواد را پایدار کرده و در برابر کلوخگی محافظت می‌کند. مایع لاواژ برونکوآلوئولار اثر معکوس القاء می‌کند و باعث افزایش کلوخگی می‌شود. دومین اثر مهم تاج پروتئینی این است که برخی از پروتئین‌ها

1- Citrate-Ligand-Capped
2- Protein corona
3- Dulbecco’s Modified Eagle Medium

(اوپسونین‌ها)[۱] منجر به شناسایی توسط ماکروفاژها می‌شوند. والکی[۲] و همکاران [44] دریافتند که فعال‌ترین ترویج‌کنندگان ارتباط سلولی (که احتمالاً می‌توانند به عنوان اوپسونین درنظر گرفته شوند) پروتئین‌هایی هستند که در اتصال به هیالورونان[۳]، یکی از اجزای اصلی سطوح سلولی، نقش دارند. بنابراین اوپسونیزه‌شدن[۴] اغلب موجب دریافت سریع ماکروفاژها شده و منجر به کاهش سریع نانوذرات در گردش خون [59] [66]، انتقال سریع و تمرکز در ارگان‌های دارای سیستم بیگانه‌خوار تک‌هسته‌ای [که پیش از این سیستم رتیکولواندوتلیال (RES)[۵] نامیده می‌شدند]، مانند کبد و طحال می‌شود. در مقابل، عدم اوپسونیزه‌شدن (آلبومین[۶]، آپولیپوپروتئین[۷] A-I، A-IV، C-III و H) تمایل نانومواد را به MPS کاهش می‌دهند. برخلاف عملکرد آلبومین، فتوئین[۸] آنالوگ جنینی آن، منجر به جذب نانوکره‌های پلی‌استایرن[۹] ۵۰ نانومتری توسط ماکروفاژهای کبدی (سلول‌های کوپفر[۱۰]) شده‌است [13].

والکی و همکاران [44] دریافتند که نسبت پروتئین‌های سرم در تاج، فراوانی نسبی پروتئین‌ها در خود سرم را منعکس نمی‌کند. بنابراین، خواص نانومواد بر ترکیب‌بندی تاج تأثیر می‌گذارند. کاملا واضح است که مشخصات سطح نانوذرات که شامل تمایل و یا عدم تمایل به اوپسونیزه‌شدن است بر توکسیکوکینتیک آنها تأثیر زیادی می‌گذارد. سطح خنثی و آب‌دوست نانومواد تمایل به اتصال اوپسونین‌ها ندارد. والکی و همکاران [44] دریافتند که ارتباط سلولی قوی‌تری در نانوذرات طلای دارای کاتیون فعال نسبت به نانوذرات طلای خنثی و آنیونی در همان اندازه نشان داده می‌شود (همه دارای تاج‌های پروتئینی بودند). در مقابل، تفاوت‌های اندکی در تاج ذرات متعدد گرمخانه‌گذاری شده[۱۱] با مایع لاواژ برونکوآلوئولار (BALF)[۱۲] وجود داشت، اگرچه احتمالاً برخی از پروتئین‌های سلولی و سرمی نیز به دلیل تنش[۱۳] بافت ریه به سبب برداشته‌شدن BALF شناسایی شده‌اند [67]. BALF مورداستفاده، از بیماران مبتلا به پروتئینوزیس[۱۴] آلوئولار ریوی که غنی از لیپید و پروتئین‌های همراه با مواد سطح فعال[۱۵] است، به‌دست آمد.

1- Opsonin: مولکولی است که سلولهای ایمنی (مانند ماکروفاژها) را برای فاگوسیت کردن یک آنتی‌ژن تحریک می‌کند
2- Walkey
3- Hyaluronan
4- Opsonisation
5- Reticuloendothelial system
6- Albumin
7- Apolipoprotein
8- Fetuin
9- Polystyrene
10- Kupffer Cells
11- Incubated
12- Bronchoalveolar Lavage Fluid
13- Agitation
14- Proteinosis
15- Surfactant

این نکته نیز مشخص شده‌است که تاج‌های پروتئینی پویا هستند و با گذشت زمان ترکیب‌بندی آنها تغییر می‌کنند. در اولین تماس، پروتئین‌های فراوانی که در محیط ذرات هستند، به ذره متصل می‌شوند و پروتئین‌هایی که پیوند آنها از نظر انرژی مطلوب‌تر است، به‌موقع جایگزین می‌شوند [68] [69]. پروتئین‌هایی که قوی‌ترین پیوند را دارند، به اصطلاح تاج «سخت»[1] نامیده می‌شوند، درحالی‌که پروتئین‌هایی که با محیط خود تبادل پویایی دارند، تاج «نرم»[2] نامیده می‌شوند [68]. هنوز تأثیر تاج پروتئین بر فرآیندهای زیستی ناشناخته است. هرچند، تاج پروتئینی، خود از مولکول‌های زیستی درون‌زاد[3] تشکیل شده‌است که می‌تواند حاوی واحدهای اتصالی تکراری[4] باشد که توسط سلول‌ها قابل‌تشخیص است [65].

اهمیت نسبی ترکیب‌بندی تاج پروتئینی با مدل‌سازی والکی و همکاران نشان داده شده‌است [44]. یک کتابخانه از اثرانگشت تاج پروتئینی، ۱۰۵ نانوذره طلای اصلاح‌شده سطحی، پیش‌بینی بیشتری از ارتباط سلول A549 (آلوئولار) نسبت به مدل ترکیبی اطلاعات در مورد اندازه هسته (اندازه‌گیری‌شده به‌وسیله TEM[5])، محیط دی‌الکتریک (اندازه‌گیری‌شده به وسیله AS[6])، قطر هیدرودینامیکی (اندازه‌گیری‌شده به‌وسیله DLS[7]) و پتانسیل زتا[8] ارایه می‌دهد. علاوه‌بر این، اثرانگشت، قابلیت بیشتری در پیش‌بینی مقدار کل کل پروتئین جذب‌شده دارد که نشان‌دهنده اهمیت ترکیب‌بندی تاج پروتئینی است. نکته جالب توجه آن است که مدل مربوط به اثرانگشت تاج پروتئینی نانوذرات طلا نسبت به ارتباط سلولی آنها، نمی‌تواند ارتباط سلول را در اثرانگشت تاج پروتئینی نانوذرات نقره با برخی از لیگاندهای سطح یکسان که برای نانوذرات طلا مورداستفاده قرار گرفته بود، پیش‌بینی کند. واضح است که خودِ هسته نانوذره تأثیری ناشناخته بر روی ارتباط سلولی دارد. این نکته نیز مشخص شد که ماده هسته (نقره یا طلا)، تأثیر بیشتری بر روی ترکیب‌بندی تاج پروتئینی (تفاوت بیشتر در ترکیب‌بندی)، نسبت به لیگاندهای متصل به سطح نانوذره دارند. شاید ویژگی‌های هسته نانوذره بر اتصال پروتئین‌ها تأثیر می‌گذارد و چگالی، نوع آرایش[9] و جهت‌گیری[10] لیگاندها را تعیین می‌کند [44].

1- Hard corona
2- Soft corona
3- Endogenous
4- Binding motifs
5- Transmission Electron Microscopy
6- Absorbance spectrophotometry
7- Dynamic Light Scattering
8- Zeta potential
9- Arrangement
10- Orientation

آگراوال[1] و همکاران [59] در مورد جنبه‌های مختلف تاج پروتئینی و پوشش نانوذرات ، از جمله تأثیرات تاج پروتئینی بر توزیع زیستی نانوذرات، بررسی کاملی را ارائه کرده‌اند.

تأثیر ترکیب‌بندی تاج پروتئینی، این سؤال را ایجاد می‌کند که آیا این ترکیب‌بندی در گونه‌های معمول مورداستفاده در آزمون‌های حیوانی متفاوت است یا خیر؛ به‌عنوان مثال، در موش صحرایی[2]، آلفا-فتوپروتئین[3] آلفا-فتوپروتئین[3] در پروتئین سرم، بالاتر از انسان تشخیص داده شده‌است [70]. احتمالاً این امر می‌تواند منجر به تفاوت بین گونه‌ای در توکسیکوکینتیک نانوذرات شود. هنگام انجام آزمون‌های برون‌تنی ممکن است ترکیب‌بندی تاج پروتئینی تا حد زیادی با ترکیب‌بندی در انسان‌ها متفاوت باشد، همانطور که محیط کشت دارای ترکیب‌بندی متفاوتی از مایعات مختلف بدن است. حصول اطمینان از این‌که ترکیب‌بندی محیط اهمیت زیادی ندارد، از یافته‌های والکی و همکاران به‌دست آمده‌است [44]. آنها نشان دادند که ترکیب‌بندی تاج، نسبت سرمی را که نانوذرات در معرض آن قرار دارند، منعکس نمی‌کند. با این وجود، تا زمانی که اطمینان حاصل شود ترکیب‌بندی پروتئین محیط، ترکیب‌بندی تاج بر روی نانوذره را تحت‌تأثیر قرار نمی‌دهد، می‌توان تاج پروتئینی را در هنگام انجام مطالعات در شرایط برون‌تنی و برای برون‌یابی بین گونه‌ها درنظر داشت و به‌طور جایگزین، نانوذرات می‌توانند پیش از اضافه شدن به آزمون برون‌تنی، در ابتدا در معرض یک مایع شبیه‌سازی‌شده فیزیولوژیکی[4] قرارداده شوند.

۴-۲-۶ شکل

درمورد نانوذرات طلا، مشخص شده‌است که نانوذرات کروی ساده‌تر از ذرات میله‌ای شکل توسط سلول‌های MCF-7[5] برداشته[6] می‌شوند [۵۱]. علاوه‌بر این، مقدار کمتری از نانوذرات طلای میله‌ای شکل بلندتر نسبت نسبت به نانوذرات طلای کوتاه‌تر با بارهای سطحی مشابه برداشته می‌شوند. به‌نظر می‌رسد که دریافت کمتر از ذرات میله‌ای‌شکل (بلندتر) منجر به حذف کمتری از سلول‌ها می‌شود، علاوه‌بر این، به همان اندازه تجمع بالاتری گزارش شده‌است. هنگام استفاده از آنتی‌بادی هدفمند برای مولکول‌های چسبنده[7] و نشانگرهای بیان بیان عروق جدید[8] روی سلول‌های اندوتلیال[9]، نانومیله‌های پوشش‌داده‌شده طلا، در مقایسه با نمونه‌های

1- Aggarwal
2- Rats
3- Alpha-fetoprotein
4- Physiologically-mimicking fluid
5- MCF-7 is a breast cancer cell line
6- Taken up
7- Adhesion molecules
8- Neovascular expression markers
9- Endothelial cells

کروی آنها، یک تجمع اختصاصی بالاتر و غیراختصاصی کمتری را تحت‌تاثیر شرایط جریان ریزسیال[1] نشان می‌دهند [71]. مشاهدات مشابهی در دو سیستم جریان برون‌تنی از یک شبکه ریزعروقی مصنوعی[2] و درون‌تنی در موش‌ها انجام شده است [71].

مشاهده شده‌است که به واسطه خمیدگی ذرات کروی، اندازه بر شکل تأثیر می‌گذارد، اتصال مولکول‌های زیستی به سطح نانوذرات طلا تحت‌تاثیر قرار می‌گیرد [69].

همان‌گونه که در زیربند ۶-۱ نشان داده شده‌است، همچنین، شکل بر سرعت انحلال نیز تأثیر می‌گذارد که می‌تواند بر دریافت هم موثر باشد؛ زیرا توکسیکوکینتیک‌ها پس از آن نسبتا به وسیله مواد حل‌شده کنترل می‌شوند.

۷ چالش‌های آنالیزی

۷-۱ کلیات

برخلاف مطالعات مخاطره، مطالعات توکسیکوکینتیک به آنالیز شیمیایی کمّی ماده موردآزمون در ماتریس‌های مختلف و پیچیده از جمله بافت‌ها نیاز دارند. برای تأیید صحت مقادیر اندازه‌گیری‌شده، نیاز است یک تعادل جرمی[3] انجام شود که در آن سطوح ماده موردآزمون در همه ماتریس‌ها جمع زده می‌شود؛ اگر مقدار کل اندازه‌گیری‌شده به ≤ ٪ ۹۰ کل مقدار تجویزشده برسد، در این صورت توزیع در تمام ماتریس‌ها درست[4] در نظر گرفته شده‌است. درصورت هدررفت قابل‌توجه نسبت به دُز خارجی، تعیین دُز جذب‌شده قطعیت کمتری خواهد داشت. از همین رو، مطالعات توکسیکوکینتیکی می‌توانند به چالش‌های آنالیز حدود تشخیص و نمونه‌های پیچیده زیستی، با چالش‌های اضافی خاص در تعیین کمیت نانومواد منتهی شوند. علاوه‌بر این، هر نوع روش آنالیزی نیاز است تا به‌صورت خاص، حساس و تجدیدپذیر باشد و داده‌هایی را تولید کند که خطی بودن را در طیف وسیعی از نانوذره و یا غلظت‌های عنصر موردانتظار نشان دهد. استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۶۱۱: سال ۱۳۹۶، فنونی را برای مشخصه‌یابی و کمّی‌سازی نانومواد فهرست می‌کند. جدول ب-۱ در پیوست **ب** اطلاعاتی را در خصوص روش‌های کمّی‌سازی از جمله مزایا و محدودیت‌های آنها ارائه می‌کند.

1- Microfluidic
2- Synthetic microvascular network
3- Mass balance
4- Accurate

شاید نیاز باشد تا نمونه‌هایی از ماتریس‌ها برای آنالیز حذف مواد مداخله‌گر و یا بهبود کمّی‌سازی آماده شود. به‌عنوان مثال، ممکن است نیاز باشد پیش از آنالیز، نمونه‌های ارگان‌هایی که انتظار می‌رود در آنها خون باقیمانده احتمال توزیع کمی داشته باشد، پرفیوز[1] شود تا خون را از سیستم عروقی خارج کند. به‌همین ترتیب، ممکن است داده‌ها به دلیل وجود خون باقیمانده اصلاح شوند [28] [72] [73]. هرچند، طبق دانش فعلی در مورد توکسیکوکینتیک نانومواد، آنها خیلی سریع از خون خارج می‌شوند، بنابراین احتمال هرگونه آلودگی از طریق خون باقیمانده بسیار کم است.

۲-۷ آنالیز عنصری

روش‌های آنالیزی کمّی اندکی برای تعیین غلظت نانوماده از بافت‌ها وجود دارند. آنالیز نانوذرات فلزی (نقره، طلا، TiO_2، آهن و مس) از سایر نانومواد ساده‌تر است، زیرا سوزاندن بافت که یکی از شکل‌های آماده‌سازی نمونه است، ذره را تخریب نمی‌کند. برای فلزات و اکسیدهای فلزات، مانند نانوذرات Au، TiO_2 و SiO_2، میزان عنصر Au یا Ti را می‌توان با استفاده از پلاسمای جفت‌شده القایی- طیف‌سنجی جرمی (ICP-MS) تعیین کرد [474]. هرچند، پس از انحلال کامل نمونه موردآزمون، آنالیز عنصری در یک محیط اسیدی با ICP-MS، حضور ذرات (نانو) نشان داده نمی‌شود. اما به‌ویژه برای نانوذراتی که تجزیه و/یا انحلال را نشان نمی‌دهند، وجود فلز عنصری نشان‌دهنده وجود نانوذرات است. برای نانوذراتی مانند نقره که در یک محیط آبی حل می‌شوند، اندازه‌گیری عنصری ممکن است غلظت نانوذرات نقره را بیش از حد برآورد کند، زیرا یون‌های نقره بهتر شناسایی می‌شوند. بنابراین، لازم است این امر در طول آنالیز موردتوجه قرار گیرد.

یکی از چالش‌های ICP-MS، غلبه بر تداخل‌های طیفی ناشی از اجزای موجود در ماتریس مانند اجزای آلی، کانی و اسیدهای هضم مورداستفاده است که می‌توانند نتایج را تضعیف کنند [75]. یونش واجذبی لیزری/طیف‌سنجی جرمی (LDI-MS)[2] در قالب تصویربرداری توسعه یافته‌است تا شیمی سطح نانوذرات که تعیین‌کننده توزیع داخلی- ارگان با یک قابلیت شناسایی و تصویربرداری در سطوح مولی نانوذرات، تقریباً بدون هیچ‌گونه تداخلی با مولکول‌های زیستی است، بررسی شوند [76].

برای نانوذرات با پایه کربن، آنالیز شیمیایی بسیار چالش‌برانگیزتر است، زیرا آماده‌سازی نمونه می‌تواند شامل سوزاندن نمونه باشد و شناسایی نانوذرات با پایه کربن در یک محیط کربنی دشوار خواهد بود. مطالعات کمی به‌طور مستقیم پاکسازی و کینتیک نانولوله‌های چنددیواره MWCNTs اولیه[3] را بررسی کرده‌اند، زیرا این

1- Perfused
2- Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry
3- Pristine

آنالیزها مبهم[1] هستند. برای این منظور، آنالیز کبالت کاتالیزوری توسط پالوهن[2] انجام شده‌است [77]. هرچند، یون‌های فلزی کاتالیزوری می‌توانند از نانولوله‌های کربنی جدا شده و به‌طور مستقل به سایر اعضای بدن منتقل شوند [78]. آنالیز ^{14}C برای ^{14}C-taurine-MWCNT که توسط دنگ[3] و همکاران [79] و کزارنی[4] و همکاران [80] انجام شد، نشان داد که ^{14}Cدر ارگان‌ها در واقع با حضور MWCNT در ارگان‌های مختلف همراه است. از آنجا که نشان‌دار کردن مولکولی می‌تواند ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و زیستی را تغییر دهد [81] [82] [83]، کینتیک و سمیت نانولوله کربنی نشان‌دارشده می‌تواند با نانولوله‌های کربنی اصلی متفاوت باشد [84]. علاوه‌بر این، چون میزان کلوخگی بر روی حساسیت سلولی (یعنی سمیت سلولی) ناشی از نانولوله کربنی تأثیر می‌گذارد، پاکسازی می‌تواند برای ذراتی که به خوبی پراکنده شده‌اند، تسریع‌یافته یا تأخیر یابد [40]. از همین رو، شینوهارا[5] [85] از روشی استفاده کرد که توسط تامورا[6] و همکاران [83] تهیه شده بود و شامل آنالیز فروسرخ ناپراکنده (NDIR)[7] از CO_2 تولیدشده از تجزیه MWCNTs اولیه بود که از طریق هضم اسیدی و پیش‌عمل‌آوری گرمایی از بافت‌ها جدا شده‌بود. این روش با میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) جهت مشاهده ذرات MWCNT در بافت تلفیق شد.

طیف‌سنجی جذب اتمی (AAS) را می‌توان برای تشخیص عناصر نیز مورداستفاده قرار داد. به‌عنوان مثال، توزیع جرمی نقره از طریق تعیین غلظت نقره با طیف‌سنجی جذب اتمی کوره گرافیتی [86] تصدیق می‌شود و AAS برای تعیین نانومواد ZnO:EU (اکسید روی دوپ[8] شده با یوروپیم) در بافت‌ها پس از تجویز خوراکی خوراکی مورداستفاده قرار گرفت [87]. طیف‌سنجی جذب اتمی برقی گرمایی[9] برای شناسایی آلاینده‌های محیطی مانند انواع فلزات سنگین که از MWCNT به‌عنوان جاذب آنها استفاده شده‌است، به‌کار می‌رود و آلودگی سرب (Pb) در محصولات غذایی را می‌توان با نانو TiO_2 استخراج کرد [88]. طیف‌سنجی جذب اتمی برای تعیین میزان پلاتین یک سیستم انتقال داروی نانوپزشکی برای دیامین (دی‌کلرو) پلاتینیم[10] نیز مورداستفاده قرار می‌گیرد [90]. استفاده از طیف‌سنجی جذب اتمی برای مطالعات توزیع‌زیستی محدود است، زیرا برای فلزات و اکسیدهای فلزی عمدتاً از ICP-MS و یا انواع مختلف آن (به‌عنوان مثال، ICP-OES،

1- Problematic
2- Pauluhn
3- Deng
4- Czarny
5- Shinohara
6- Tamura
7- Non-Dispersive Infrared Analysis
8- Doped
9- Electrothermal atomic absorption spectrometry
10- Diamine (dicholoro) Platinum

طیف‌سنجی پلاسمای جفت‌شده القایی- طیف‌سنجی نشر نوری) برای آنالیزهای عنصری مورداستفاده قرار می‌گیرند.

۳-۷ آنالیز عنصری با نشانگر رادیواکتیوی یا نشانگر فلورسانسی

با توجه به ویژگی نانوذرات درجابه‌جایی در هر شرایط مواجهه، مطالعات ردگیری[1] توزیع نانومواد در سناریوهای واقعی مواجهه درون‌تنی ضروری است، اما از نظر فنی چالش‌برانگیز نیز خواهند بود. نشانه‌گذاری[2] نانومواد امکانات خوبی را برای چنین مطالعاتی ارائه می‌کند، اما می‌تواند با مشکلات تجربی خاصی همراه باشد.

با استفاده از ایزوتوپ‌های رادیواکتیو به‌عنوان نشانگرهای رادیواکتیوی یا رنگ‌های فلوئورسنت، می‌توان نشانه‌گذاری خاصی از نانومواد را انجام داد تا سرنوشت آنها در شرایط *درون‌تنی* دنبال شود. این کار را می‌توان با افزودن نشانگر به نانوماده با پیوندی خاص و/ یا با استفاده از رادیو-ایزوتوپ خودِ نانومواد انجام داد. یکی ازمعایب نشانه‌گذاری خاص این است که نشانگر می‌تواند از نانوماده جدا شود [91] [92]. در این حالت نشانگر اندازه‌گیری می‌شود، درحالی‌که از نانومواد جدا شده و در نتیجه نتایج نادرستی از توزیع نانوذرات به‌دست می‌آید. بنابراین، هنگام استفاده از هر نوع روش خاص نشانه‌گذاری، ارزشیابی دقیق یکپارچگی ترکیب نشانگرـ نانوذره لازم است. استفاده از نانوذرات دارای نشانگر رادیواکتیوی امکان شناسایی آسان و سریع مقادیر کلی ماده اصلی منشاء[3] و متابولیت‌ها[4] را در یک بافت در زمان نمونه‌گیری فراهم می‌کند [93].

[93].

به جای ایزوتوپ‌های رادیواکتیو می‌توان از ایزوتوپ‌های فلزی که بخشی از نانوماده است، استفاده کرد (برای مثال طلا یا نقره). به‌عنوان مثال، نانوطلایی که نشانگر خاص رادیواکتیوی نانوذرات طلای آن از طریق فعال‌سازی رادیواکتیوی (یعنی با فعال‌سازی تابش نوترونی در یک راکتور هسته‌ای تحقیقاتی) مؤلفه فلز Au به‌دست آمده است و کاهش رادیواکتیوی اتم‌های Au فعال (^{198}Au) ($^{197}Au\ (n,\gamma)$) تعیین می‌شود [94]. با استفاده از این رهیافت، قطعیتی از شناسایی خودِ نانوذرات حاصل می‌شود، اگرچه در مورد نانوذرات نقره هنوز عدم اطمینان در مورد آزاد شدن یون‌های نقره وجود دارد. علاوه‌بر این، می‌توان از ایزوتوپ‌های پایدار طبیعی برای نشان دادن دریافت از محلِ استعمال استفاده کرد [95]. با استفاده از ZnO NPs غنی‌شده از ایزوتوپ طبیعی ^{68}Zn، نشان داده شده‌است که Zn موجود در ZnO NPs در فرمول‌بندی‌های ضد آفتاب از

1- Tracking
2- Labelling
3- Parent substance
4- Metabolites

محل استعمال پوستی برداشته می‌شوند [95]. در خون و ادرار افراد داوطلب ^{۶۸}Zn قابل‌شناسایی بود. از آنجا که ^{۶۸}Zn با استفاده از اندازه‌گیری ICP-MS موردارزیابی قرار گرفت، مشخص نیست که ^{۶۸}Zn به صورت ذرات ZnO و یا Zn محلول یا هر دو جذب شده‌است. همچنین، در ارگان‌های داخلی موش از جمله کبد، حضور ^{۶۸}Zn مشاهده شده‌است، اما در اینجا نیز نفوذ خودِ ZnO NPs را هم نمی‌توان اثبات کرد [96]. هموستاز[1] Zn تا حد زیادی حفظ شده و وجود ذرات ZnO در کرم ضد آفتاب، اثر زیستی نامطلوبی ایجاد نمی‌کند [96].

همان‌گونه که در بالا ذکر شد، یکی از مسائل اصلی در ارتباط با مطالعات ADME با نانومواد دارای نشانگر، اطمینان از این امر است که نشانگر با نانوذرات پس از تجویز و ورود به بدن باقی می‌ماند. مسئله مهم دیگر اطمینان از این امر است که ذره نشانگر، رفتار نانوذرات را تغییر نمی‌دهد [81] [82] [83]، به‌ویژه از آنجا که تغییرات در شیمی سطح نانوذره می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی بر خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات و در نتیجه، پروفایل[2] توکسیکوکینتیک و سمیت نانوذرات تأثیر گذارد [4]. علاوه‌بر این، نشانه‌گذاری نانومواد به دلیل در دسترس‌پذیری[3] و پی‌آمدهای ایمنی نانومواد دارای نشانگر رادیواکتیوی، محدود است. به‌ویژه برای آزمون‌های سمیت استنشاقی، استفاده از نانومواد دارای نشانگر رادیواکتیوی، به دلیل آلودگی حاصل از تجهیزات گران‌قیمت، مشکلاتی را ایجاد می‌کند.

۴-۷ تعیین ذرات

نانوذرات می‌توانند از تعداد مختلفی از مولکول‌ها بسته به اندازه واقعی یک نانوذره تشکیل شوند. هرچند این کل ذره است که از طریق تاج پروتئینی و یا پوشش روی یک نانوذره با گیرنده روی سلول یا اندام، برهم‌کنش دارد و نه مولکول‌های مجزا در ساختار نانوذره. بنابراین، بسته به اندازه واقعی (یعنی تعداد مولکول‌های موجود در یک NP) یک سلول در معرض دُز مولکولی نسبتاً کم یا زیاد قرار می‌گیرد. این مولکول‌ها در دُز کل تجویزشده سهیم هستند، به‌ویژه اگر این دُز در واحدهای جرمی بیان شود. هرچند، اطلاعات مربوط به دُز فقط در واحدهای جرمی کافی نیست. همچنین لازم است اطلاعات مربوط به دُز بیان‌شده در قالب تعداد ذرات و/یا مساحت سطح درنظر گرفته شوند.

طیف گسترده‌ای از فنون برای دیداری‌سازی[4] نانوذرات در بافت‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرند. به‌ویژه میکروسکوپ الکترونی به‌طور گسترده برای این منظور استفاده می‌شود، اگرچه سایر فنون میکروسکوپی از

1- Homeostasis
2- Profile
3 -Availability
4- Visualising

جمله تصویربرداری طیفی و طیف‌سنجی رامان نیز در حال توسعه هستند (به‌عنوان مثال، به مقاله مروری استروسکی[1] و همکاران مراجعه شود [97]). استفاده از این روش‌ها برای برآورد «دُزهای عددی ذرات» در سلول‌ها (به‌عنوان مثال، مرجع [98]) و بافت‌ها (به‌عنوان مثال، مرسر[2] و همکاران [99] میزان CNT تشخیص داده‌شده در پنج اسلاید رتبه‌بندی‌شده[3] را به کل ارگان برون‌یابی کردند) امکان‌پذیر است؛ هرچند این روش‌ها، به‌ویژه در دُزهای پایین، مستلزم کار زیادی[4] هستند و درستی نتایج به جزئیات فنی و رویکرد امتیازدهی بستگی دارد. بنابراین بعید است که بتوان آنها را برای تعیین دُزهای عددی ذرات برای مطالعات توکسیکوکینتیک بدون توسعه قابل‌توجه عملیات خودکار به‌کاربرد. هرچند، رویکردهای ترکیبی با ارزیابی‌های جرمی (به‌عنوان مثال ICP-MS) با فنون دیداری‌سازی هدفمند محدود می‌توانند در این زمینه مورداستفاده قرار گیرند، به‌ویژه اگر با فنون مناسب آنالیز ذرات برای تایید مشخصه‌های اساسی ذرات شناسایی‌شده (به‌عنوان مثال طیف‌سنجی پرتوایکس بر اساس تفکیک انرژی[5]) ترکیب شوند. فنون پیشرفته‌ای مانند پرتونگاری مقطعی پرتوایکس ریز- محاسبه‌ای[6] [100] می‌توانند استخراج دُزهای کل ذرات را در بافت‌ها امکان‌پذیر کنند، اما به تجهیزات ویژه‌ای نیاز دارند و بنابراین بعید است که به‌طور گسترده‌ای برای مطالعات توکسیکوکینتیک مورداستفاده قرار گیرند. در حال حاضر، به نظر می‌رسد که امیدوارکننده‌ترین روش برای تعیین کمیت مستقیم دُزهای ذرات بافتی (sp-ICP-MS) آنالیز تک‌ذره با ICP-MS[7] باشد.

ذرات مجزای فلزات و اکسیدهای فلز را می‌توان با استفاده از sp-ICP-MS حتی در ماتریس‌هایی همچون غذا و بافت‌های انسانی اندازه‌گیری کرد (به‌عنوان مثال، مراجع [101] و [102]). sp-ICP-MS به عنوان روش آنالیزی امیدوارکننده برای تشخیص و مشخصه‌یابی نانوذرات در غلظت‌های کم درنظر گرفته می‌شود، زیرا امکان تعیین هم‌زمان توزیع براساس اندازه ذره و تعداد آن و به‌طور هم‌زمان تمایز بین آنالیت‌های محلول و ذرات را فراهم می‌کند [101] [103] [104] [105]. هرچند، ممکن است برای تصویربرداری از توزیع اندازه نانوذره در بافت‌ها مورداستفاده قرار نگیرد، زیرا روش معرفی نمونه در آن، آنالیز تصویربرداری از نمونه‌های جامد را محدود می‌کند. همچنین ممکن است این روش برای تصویربرداری کمّی برای نانوذرات داخل سلولی و بافتی استفاده نشود. از همین رو، یونش واجذب فرسایشی لیزری (LA)[8] جفت شده با sp-ICP-MS توسعه توسعه یافته‌است تا امکان تصویربرداری کمّی از نانوذرات داخل سلولی را فراهم کند [106]. استفاده از sp-

1- Ostrowski
2- Mercer
3- Scored slides
4- Intensive
5- Energy-dispersive x-ray spectroscopy
6- Micro-computed xray tomography
7- Single particle ICP-MS (sp-ICP-MS)
8- Laser Ablation

ICP-MS در مطالعات همه‌گیر شناختی ممکن است بینشی در مورد اثرات احتمالی و طولانی مدت بیماری به دلیل تجمع نانومواد در ارگان‌ها را نیز فراهم سازد. وجود ذرات مختلف در ارگان‌های مختلف از جمله ریه، جریان خون، کبد و طحال گزارش شده‌است [102] [107] [108].

یک مطالعه بین آزمایشگاهی بین‌المللی برای تعیین تکرارپذیری و تجدیدپذیری تعیین اندازه ذره میانه و غلظت عددی ذرات Ag NPs در گوشت مرغ انجام شده‌است [109]. تعیین اندازه ذره انحراف‌های استاندارد ٪ ۲ و ٪ ۵ برای تکرارپذیری و انحراف‌های استاندارد برای تجدیدپذیری ٪ ۱۵ و ٪ ۲۵ را به ترتیب برای دو گوشت همگن اسپایک‌شده[1] به Ag NPs تثبیت‌شده با پلی وینیل پیرولیدون (PVP)[2] نشان داده بودند. هرچند، تعیین تعداد ذره در نمونه‌های آزمون تغییر بیشتری را با انحراف‌های استاندارد تکرارپذیری ٪ ۷ و ٪ ۱۸ و انحراف‌های استاندارد تجدیدپذیری ٪ ۷۰ و ٪ ۹۰ نشان دادند. نتیجه‌گیری شد که روش sp-ICP-MS برای تعیین میانگین قطر ذره با انحراف استانداردهای قابل‌قبول تا ٪ ۲۵ نویدبخش است که برای چنین اندازه‌گیری‌هایی غیرمعمول نیست. نتیجه‌گیری شد که در حال‌حاضر تعیین غلظت‌های عددی ذرات و کسر جرمی، نه تجدیدپذیر است و نه به اندازه کافی برای کاربرد در نمونه‌های پیچیده دنیای واقعی درست است [109]. این امر ممکن است به نانومواد بستگی داشته باشد، مانند نتایج تجدیدپذیری TiO_2 NPs که برای تعداد TiO_2 NPs و نیز مقدار جرم Ti به‌دست آمده‌است [102].

روش‌های اندازه‌گیری نانولوله‌های کربنی و سایر نانومواد بر پایه کربن در بافت‌ها نیز در حال توسعه هستند، اما حساسیت بسیاری از روش‌ها، از جمله طیف‌سنجی رامان و فلوئورسانس فروسرخ- نزدیک، در حال حاضر کم است [110].

۵-۷ حد تشخیص

حد تشخیص (LOD)[3] و حد کمیت‌سنجی (LOQ)[4] تعیین‌کننده‌های مهم در مطالعات توکسیکوکینتیک محسوب می‌شوند. این دو کمترین مقدار نانوماده را که می‌توان به‌طور قابل‌اعتمادی نانوماده و یا اجزای نانوماده را (به‌عنوان مثال فلز عنصری) در بافت‌ها و/یا خون تشخیص داد، تعیین می‌کنند. به‌طور کلی، LOD میانگین به‌علاوه ۳ تا ۵ برابر انحراف استاندارد نمونه‌های کنترل شاهد و LOQ میانگین به‌علاوه ۱۰ برابر انحراف استاندارد است. برای همه نمونه‌های آزمون، LOD/LOQ یکسان نیست، زیرا ارگان‌های مختلف ممکن است LOD و LOQ متفاوتی داشته باشند. در حالت ایده‌آل، LOD/LOQ را می‌توان برای هر ارگان

1- Spiked
2- Poly Vinyl Pyrrolidone
3- Limit of Detection
4- Limit of Quantification

به‌طور مستقل با استفاده از نمونه‌های ارگان شاهد تعیین کرد [111] [112]. یک روش تشخیص حساس با یک LOD پایین، برای بررسی میزان دریافت نانوماده از سدهای زیستی بسیار مهم است، همچنان‌که جذب معمولاً پایین نانومواد در صورت وجود LODs نسبتاً بالا، می‌توانند درنظر گرفته نشوند.

پلاسمای جفت‌شده القایی- طیف‌سنجی نشر نوری (ICP-OES)[1] با حدود تشخیص گزارش‌شده در محدوده µg/L، مرتبه بزرگنمایی بالاتری از حد ممکن آنها با آنالیز ICP-MS را نشان می‌دهد [113] [114]. در مقابل، sp-ICP-MS می‌تواند به‌صورت مستقیم اندازه ذره، جرم و توزیع‌های عددی را در غلظت‌هایng/L با استفاده از هضم شیمیایی با باز قوی هیدروکسید تترا متیل آمونیم (TMAH)[2] اندازه‌گیری کند [115].

۸ موضوعات مربوط به شرایط تجویز دُز

۸-۱ کلیات

همان‌گونه که برای مواد حل‌شده شناخته شده‌است، شرایط تجویز دُز تأثیر زیادی بر نتیجه نهایی مطالعات توکسیکوکینتیک با نانومواد دارد. اول آنکه، وضعیت پراکنش ماده موردآزمون در ماتریس دُز بر میزان انبوهگی و کلوخگی نانوذرات تأثیر می‌گذارد. این اندازه، همان‌گونه که پیش از این در زیربند ۶-۲ مورد بحث و بررسی قرار گرفت، توسط سلول‌ها و هر گونه انتقال پاراسلولار[3] (یعنی در- بین سلول‌ها) بر دریافت ماده تأثیر خواهد گذاشت. برای مطالعات استنشاقی، پراکنش هواسُل و اندازه‌های ذره انبوهه/کلوخه تعیین می‌کند که آیا بخش‌های آلوئولار در ریه که می‌توانند قابل‌دستیابی باشند احتمالا بر جذب سیستمیک موثر هستند. از همین‌رو، پروتکل‌های دقیق و سخت‌گیرانه پراکنش شامل مشخصه‌یابی مناسب، لازم است در هر دستورالعمل برای مطالعات توکسیکوکینتیک با نانومواد لحاظ شود. علاوه‌بر این، بخشی از دُز به‌کاررفته به دلیل جذب سطحی[4] (چسبیدن) در وسایل آزمایشگاهی مورداستفاده می‌تواند از دست برود [72]. بنابراین، در مطالعات توکسیکوکینتیکی لازم است یک کنترل بر روی دُز واقعی تجویزشده لحاظ شود.

دوم آنکه، دُزهای انتخاب‌شده یا غلظت‌های آزمون می‌توانند بر نتیجه نهایی یک مطالعه توکسیکوکینتیک تأثیر گذارند. برای مواد حل‌شده، اشباع[5] آنزیم یا ناقل می‌تواند منجر به دریافت، دفع یا تشکیل متابولیت متفاوتی در دُزهای بالاتر نسبت به دُزهای پایین‌تر شود. در مورد نانومواد، دُزها یا غلظت‌های بالا می‌توانند

1- Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy
2- Tetramethylammonium hydroxide
3- Paracellular transport
4- Adsorption
5- Saturation

منجر به اضافه بار[۱] ماکروفاژها (قابل مقایسه با اشباع آنزیمی) و ژله‌ای‌شدن[۲] در روده‌ها (احتمالاً مربوط به کلوخه‌شدن ذرات است) شوند که میزان امکان جذب روده‌ای را کاهش می‌دهد [116] و تشکیل لایه‌های نانوذره روی سد بافت پوششی، مانع از انتقال هر ماده‌ای می‌شود. کوئنمن[۳] و همکاران [117] دریافتند که درصد TiO_2 NPs (۴۰nm >) که از طریق یک تک‌لایه Caco-2 (با سلول‌های M و یا با سلول‌های گابلت[۴]) جابه‌جا می‌شود، به دُز بستگی داشته است، دُزهای بالاتر درصد کمتری از جابه‌جایی را نشان می‌دهند. این امر می‌تواند به دلیل ژله‌ای شدن/انبوهگی/کلوخگی باشد، اما همچنین می‌تواند ناشی از اشباع مسیر منتهی به جابه‌جایی باشد که بسیار شبیه عبور میان‌سلولی، ترانس‌سیتوز[۵] است.

اضافه بار ماکروفاژها در ریه‌ها (که معمولاً «اضافه بار ریوی[۶]» نامیده می‌شود) منجر به این پیشنهاد توسط صنعت شده‌است که دُزهای منجر به چنین شرایطی را نمی‌توان در مطالعات مخاطره، آزمون کرد؛ زیرا نمایانگر مواجهه‌های واقعی در طول زندگی نیستند [26] [118] [119]. به‌طور مشابه، برای مواد حل‌شده، به دلایل رعایت رفاه حیوانات، پیشنهاد شده‌است که دُز تجویزشده در نقطه عطف نمودار دُز ــ AUC به‌عنوان حداکثر دُز (حداکثر دُز ناشی از کینتیک) درنظر گرفته شود (به‌عنوان مثال به مرجع [18] مراجعه شود). هرچند، لازم است دُزهای آزمون‌های مخاطره، دُزهای واقعی و همچنین دُزهای بالا را پوشش دهند تا بتوانند هرگونه مخاطره بالقوه را شناسایی کنند. آزمون با توجه به رویکرد محک‌زدن[۷] با دُزهای بیشتر و با تعداد حیوانات کمتر، می‌تواند یک گزینه باشد [120]. برای آن‌که بتوان این نتایج را به خوبی تفسیر کرد، دُزهای مطالعات کینتیک نیز ترجیحاً این طیف از دُزهای واقع‌بینانه و بالا را پوشش می‌دهند که در آن هرگونه تغییر در کینتیک در دُزهای بالاتر می‌تواند نمایان شود. از آنجا که همه تأثیرات سطح دُز بر روی کینتیک یک نانودره جدید در ابتدا مشخص نیست و این تأثیرات می‌توانند منجر به برآورد بالا و پایین مخاطره در دُزهای پایین شود، انتخاب یک دُز در بدترین حالت[۸] به‌عنوان وسیله‌ای برای ارزیابی محافظه‌کارانه ریسک با حداقل آزمون امکان‌پذیر نیست.

سوم آنکه مسئله تجویز دُز که بر نتایج توکسیکوکینتیک تأثیر می‌گذارد، انتخاب استفاده از یک تک‌دُز[۹] یا دُز دُز مکرر[۱۰] است. برای نانومواد‌ی که ظرف ۲۴ ساعت از ریه پاکسازی نشده‌اند و یا در بافت‌های داخلی در طی

1- Overloading of macrophages
2- Gelation
3- Koeneman
4- Goblet cells
5- Transcytosis
6- Lung overload
7- Benchmark approach
8- Worst case dose
9- Single dose
10- Repeated dosing

۲۴ ساعت کاملاً حل نمی‌شوند، دُز مکرر روزانه به‌ترتیب منجر به تجمع مواد در ریه و/یا بافت‌های داخلی می‌شود. این امر منجر به افزایش سطح بافتی می‌شود که در مطالعات دُز مکرر نسبت به مطالعات تک‌دُز در همان سطح دُز یافت شده‌است. زمان موردنیاز برای رسیدن به غلظت‌های بافتی ثابت به‌خصوص برای نانومواد با انحلال‌پذیری کم می‌تواند طولانی باشد. مشخص شده‌است که توزیع مجدد نانوذرات از کبد به طحال پس از تجویز داخل وریدی اتفاق می‌افتد (به‌عنوان مثال به مرجع [17] مراجعه شود)، اما از آنجا که این امر می‌تواند در طی دوره بازیابی[1] بعد از یک تک‌دُز نیز اتفاق بیفتد، آزمایش دُز مکرر که بتواند شامل هرگونه توزیع مجدد باشد، لازم نیست. نکته مهم‌تر در این رابطه، زمان مشاهده[2] بعد از تجویز NP است.

گزارش شده‌است که مواجهه نانوذرات بر اتصالات محکم[3] سلول‌های بافت پوششی روده‌ای تأثیر می‌گذارد [121] و به‌طور بالقوه باعث افزایش انتقال بین‌سلولی[4] و در نتیجه جذب سیستمیک کلی نانوذرات در مواجهه‌های بعدی می‌شود. کوئنمن و همکاران [117] نیز دریافتند که مواجهه‌های مکرر (۱۰ روز) موجب کاهش در یکپارچگی لایه سلولی Caco-2 شده‌است (اندازه‌گیری‌شده به‌وسیله مقدار TEER[5])، درحالی‌که یک تک‌مواجهه این اثر را ندارد. در چنین مواردی، مطالعات انجام‌شده بر روی دُز مکرر ممکن است منجر به مقادیر جذب بالاتری نسبت به مطالعات انجام‌شده بر روی تک‌دُز، شود. بنابراین، هنگامی که هدف از اطلاعات توکسیکوکینتیک حاصل از یک مطالعه، کمک به ارزیابی ریسک مواجهه‌های مزمن باشد، مطالعات کینتیک دُزهای مکرر اطلاعات بهتری را ارائه می‌کنند.

در مطالعات حیوانی، به دلایل عملی، دُز ماده معمولاً به‌صورت یکباره[6]، یعنی کل دُز روزانه در یک حجم منفرد، حجم کوچکی از مایع (معمولاً) یک بار در روز تجویز می‌شود. این امر منعکس‌کننده مواجهه‌های انسانی از طریق: به‌عنوان مثال رژیم غذایی، هوای استنشاق‌شده در محل کار یا روی پوست از طریق مواد آرایشی استفاده‌شده، جایی که در آن مواجهه در طول روز پخش می‌شود، نیست. در همان دُز روزانه کل، یک دُز یکباره در مقایسه با یک دُز پیوسته[7] موجب یک مواجهه بالا[8] (در طی یک زمان کوتاه) و تأثیرات توصیف‌شده در بندهای قبل برای دُزهای بالاتر می‌شود. دُز پیوسته را می‌توان به‌صورت دُز مکرر در طول روز تلقی کرد، که منجر به لحاظ کردن تأثیراتی می‌شود که در بندهای قبلی برای دُز مکرر توصیف شده‌است.

1- Recovery time
2- Observation time
3- Tight Junctions
4- Paracellular Translocation
5- Transepithelial/Transendothelial Electrical Resistance
6- Bolus
7- Continuous dosing
8- Higher peak exposure

در مورد مواجهه‌های ریوی، دُزهای یکباره که به‌صورت تجویز داخل نایی[1] استفاده می‌شوند، دارای معایب بیشتری هستند. اول آنکه، قرار دادن یک حجم کم مایع با نانوذرات در نای لزوماً منجر به مواجهه قسمت‌های عمیق و بخش‌های آلوئولار ریوی نمی‌شود. دوم آنکه، نشان داده شده‌است که دُزاژ[2] داخل نایی نانوذرات منجر به توزیع نابرابر نانوذرات در دو لوب ریوی می‌شود [85] [122]. انتخاب یک لوب ریه فقط برای مثال برای هیستوپاتولوژی[3] و لوب دیگر برای تعیین بار ریه، می‌تواند منجر به اشتباه در نتایج شود. تجویز دُزهای چندگانه، تغییر قابل‌ملاحظه‌ای در توزیع (توزیع در مقیاس کوچک[4]) ریوی نامتوازن[5] نانوذرات نانوذرات تجویزشده به داخل نای، ایجاد نمی‌کند، اما تجویز دُزهای چندگانه موجب کاهش تغییرات در محتوی TiO_2 در هر لوب ریه می‌شود [123]. به‌نظر نمی‌رسد که انتخاب وسیله (تجویز) دُز داخل نایی (سوزن گاواژ[6] یا میکروافشانه[7]) بر توزیع بین لوب‌های ریه تأثیرگذار باشد: با استفاده از هر دو دستگاه، لوب راست از لوب چپ حاوی مقادیر بالاتری از ماده است [124]. علاوه‌بر این، از نظر محتوای نانوذره که به لوب‌های ریوی می‌رسد، تفاوتی بین این دستگاه‌ها وجود ندارد، درحالی‌که هنگام استفاده از دستگاه میکروافشانه یک تغییر کوچک حاصل می‌شد [124].

در مورد مواجهه‌های خوراکی، گنجاندن نانوذرات در رژیم غذایی می‌تواند از طریق اجزای رژیم، بر پراکنش و تاج پروتئینی نانوذرات تأثیر گذارد. همان‌گونه که در بالا توضیح داده شد، پراکنش و تاج پروتئینی می‌تواند توکسیکوکینتیک ناشی از آن را تحت‌تأثیر قرار دهد. از آنجا که آنالیز خواص نانوماده، از جمله تاج پروتئینی، در رژیم غذایی دشوار است، این امر اطلاعات مربوط به دُز را محدود می‌کند.

به‌طور خلاصه، هنگامی که هدف از اطلاعات توکسیکوکینتیک حاصل از یک مطالعه، کمک به ارزیابی ریسک مواجهه‌های پیوسته باشد، ترجیحاً مواجهه‌های پیوسته از طریق رژیم غذایی، هوای استنشاق‌شده و یا کاربردهای پوستی در مطالعه مورداستفاده قرار می‌گیرند. هرچند، مزیت دُز تزریقی واحد (با گاواژ، تزریق یا داخل وریدی) این است که دُز مصرفی کاملاً شناخته شده‌است.

۸-۲ دُزسنجی

دُزسنجی متداول در توکسیکولوژی، جرم ماده در واحد جرم یا حجم محیط مواجهه، بافت یا وزن بدن است (به‌عنوان مثال mg/kg رژیم غذایی، ng/m^3 هوا و یا mg/kg وزن بدن در روز). برای مواد محلول، این

1- Intratracheal instillations
2- Dosage
3- Histopathology
4- Microdistribution
5- Uneven
6- Gavage needle
7- Microsprayer

دُزسنجی برای توکسیکوکینتیک (به‌عنوان مثال mg/g کبد، ng/mL خون) و یا گاهی تعداد مول‌ها (به‌عنوان مثال mmol/g آنزیم، nmol/mL خون)، به‌ویژه در مورد تبدیل‌های آنزیمی، استفاده می‌شود. از آنجا که خواص مختلف نانومواد در مقایسه با ذرات بزرگ‌تر می‌تواند ناشی از مساحت سطح بالاتر آنها باشد، مساحت سطح نیز می‌تواند مهم‌ترین معیار برای برخی از رفتارهای توکسیکوکینتیکی و سمیت باشد. در این حالت‌ها، کل مساحت سطح تجویزشده از نظر تئوری، معیار دُز بهتری نسبت به جرم نانوماده خواهد بود. در واقع، باراکوویس[1] و همکاران [125] دریافتند که مساحت سطح در توصیف رابطه دُزـ پاسخ برای سمیت ریوی نانوذرات نقره، معیار دُز بهتری نسبت به جرم است. هنگام استفاده از مساحت سطح، تأثیر اندازه نانوذرات مختلف که بر روی منحنی دُزـ پاسخ آزمایش شدند، تقریباً به‌طور کامل ازبین رفت.

از آنجا که برهم‌کنش با بافت‌ها و/یا سلول‌ها با خودِ ذرات اتفاق می‌افتد، صرف‌نظر از اندازه آنها و یا تعداد مولکول‌های موجود در یک ذره، تعداد ذرات نیز می‌تواند به‌عنوان معیار دُز درنظر گرفته شود. هرچند، با توجه به این‌که بحث در مورد مناسب‌ترین معیارهای دُز هنوز هم ادامه دارد، معمولاً توصیه می‌شود که اطلاعات کافی در مورد فرمولاسیون نانوماده جمع‌آوری شود تا بیان دُز در جرم، مساحت سطح و تعداد ذرات امکان‌پذیر شود.

۹ جذب نانومواد

۹-۱ کلیات

سه مسیر عمده مواجهه برای نانومواد وجود دارد: از طریق پوست (مواجهه پوستی)، از طریق دستگاه گوارش (GI)[2] (مواجهه خوراکی) و از طریق دستگاه تنفسی (مواجهه استنشاقی). برای داروهای نانو نیز باید روش تجویز تزریقی (به‌عنوان مثال داخل وریدی، داخل عضلانی و سایر موارد) درنظر گرفته شود که عبور از سدهای طبیعی برای مهاجمان خارجی پوست، دستگاه تنفسی و دستگاه گوارش را تسهیل می‌کند. جذب مواد شیمیایی و دارویی مورداستفاده در مطالعات رایج توکسیکوکینتیک وابسته به گرادیان غلظت است، درحالی‌که جذب نانومواد نمی‌تواند وابسته به گرادیان باشد، اما به سد وابسته است. در بسیاری از موارد، انبوهگی و کلوخگی نانومواد می‌تواند مانع عبور از سدهای زیستی شود.

در مدل‌های برون‌تنی پوست، ریه و روده، می‌توان جذب را به لحاظ سازوکار، بیشتر از طریق آزمون‌های درون‌تنی بررسی کرد. اگرچه یک آزمون برون‌تنی مجزا می‌تواند شباهت کمتری به وضعیت پیچیده

1- Braakhuis
2- Gastrointestinal tract

درون‌تنی داشته باشد، هرچند ترکیبی از مطالعات غیرحیوانی را می‌توان برای یافتن اطلاعات مربوطه مورداستفاده قرار داد. به‌علاوه، مقررات در بسیاری از حوزه‌های حقوقی، استفاده از حیوانات را فقط به‌عنوان آخرین چاره ضروری می‌دانند. گوردون[1] و همکاران [126] مروری بر مدل‌های غیرحیوانی سدهای مختلف بافت پوششی از جمله پوست، روده و ریه را که در حال‌حاضر استفاده می‌شود، فراهم کرده‌اند. به‌هرحال، چالش‌های آزمون‌های برون‌تنی با نانومواد نیز لازم است درنظر گرفته شوند.

در مطالعات حیوانی می‌توان میزان جذب را با آنالیز تمام بافت‌ها برای سطح نانوماده موردمطالعه و مقایسه مقدار کل موجود در ارگان‌ها به دُز خارجی (اعمال‌شده) از طریق یک تعادل جرمی تعیین کرد. با یک روش جایگزین دیگر، جذب را می‌توان با مقایسه سطوح ارگان‌های به‌دست آمده پس از دُز وریدی با سطوح ارگان‌های به‌دست آمده پس از تجویز دُز از طریق مسیر مواجهه موردنظر، تعیین کرد. بنابراین لازم است این نکته درنظر گرفته شود که بسته به مسیر تجویز، اختلافاتی در تاج پروتئینی به‌دست آمده، ممکن است رخ دهد که می‌تواند بر روی سطوح نسبی ارگانی تأثیر گذارد.

در بندهای بعدی، دانش فعلی در مورد جذب نانوذرات برای هر مسیر مواجهه و همچنین مزایا و معایب شناخته‌شده سامانه‌های آزمون برای تعیین میزان جذب به‌صورت خلاصه بیان می‌شود.

۹-۲ پوست

۹-۲-۱ مدل‌های آزمون

نفوذ پوستی را می‌توان با ارزیابی میزان نفوذ پوستی در شرایط برون‌تنی ارزیابی کرد که برای آن می‌توان از پوست بسیاری از گونه‌های پستانداران، از جمله انسان استفاده کرد. مدل‌های برون‌تنی برای جذب پوستی در راهنمای آزمون OECD 428 توصیف شده‌اند، درحالی‌که مطالعات جذب پوستی در شرایط درون‌تنی در راهنمای آزمون OECD 427 شرح داده شده‌اند. هرچند، این رهنمودهای آزمون برای مواد شیمیایی توسعه یافته‌اند و برای نانوذرات طراحی نشده‌اند. مدل‌های غیرحیوانی شامل پوستِ برداشته‌شده از انسان، موش صحرایی و/یا خوک، مدل‌های بازسازی‌شده پوست انسان، جایگزین‌های مصنوعی پوست و مدل‌های درون رایانه‌ای[2] می‌شود [126]. کمّی‌سازی نانوذرات در این مطالعات، به‌ویژه با توجه به این واقعیت که نفوذ پوستی نانوذرات به‌طور کلی کم بوده یا وجود ندارد، همچنان یک مشکل باقیمانده است [127] [128] [129] [130].

1- Gordon
2- In silico models

۹-۲-۲ دانش موجود در مورد جذب نانوذرات از طریق پوست

به‌طور کلی نفوذ نانوذره در پوست محدود به اولین لایه‌های سلولی از لایه شاخی[1] است [127]. پس از ارزیابی طیف وسیعی از مطالعات توسط کمیته علمی اروپا برای ایمنی مصرف‌کننده (SCCS)[2]، نتیجه‌گیری شد که TiO_2 NPs از طریق پوست به‌هیچ‌وجه جذب نمی‌شوند، اما ممکن است در فولیکول‌های مو وجود داشته باشند [131]. هرچند، به‌نظر می‌رسد برای برخی از نانومواد، دریافت سیستمیک محدودی از طریق مسیر پوستی وجود دارد. به‌عنوان مثال، هنگامی که ZnO NMs (۲۰ nm) در فرمولاسیون کرم ضدآفتاب به‌کار رفت و بر روی پوست استعمال شد، Zn مشاهده شده در خون از ZnO موجود در کرم ضدآفتاب نشأت گرفته بود [95]. اگرچه این امر اثبات نشد که جذب ذرات ZnO اتفاق افتاده‌است، ولی با استفاده از ایزوتوپ ^{68}Zn طبیعی ثابت شد که Zn آشکارسازی‌شده از ZnO NPs نشأت می‌گیرد. به‌علاوه، نابشی[3] و همکاران [132] جابه‌جایی پوستی نانوذرات سیلیس ۷۰ نانومتری و نقاط کوانتومی را در موش‌ها، پس از ۲۸ روز استفاده مکرر، با آشکارسازی این ذرات در پوست در محل استعمال (گوش)، در غدد لنفاوی آن بخش، در کبد و مغز گزارش کردند. هرچند گزارش نشد که آیا موش‌ها قادر به لیسیدن محل استعمال بودند یا خیر و بنابراین مواجهه خوراکی با ذرات ممکن است به راحتی منجر به مواجهه کبدی شده‌باشد.

برای نفوذ و جذب پوست، کیفیت پوست از نظر آسیب پوستی مانند خراشیدگی و آسیب UVB[4] (آفتاب‌سوختگی)، عوامل استرس‌زای مکانیکی (فشرده‌شدن[5] پوست) و تأثیرات حلال‌ها و وسایل مورداستفاده می‌توانند بر نفوذ پوستی تأثیر بگذارند [128] [133] به‌عنوان مثال، در یک سامانه آزمون برون‌تنی با استفاده از پوست انسان در مواجهه با Ag NPs، یک جابه‌جایی کم در سیال گیرنده[6] یافت شد که در پوست آسیب‌دیده پنج برابر افزایش یافت [134]. هرچند، روش آشکارسازی مورداستفاده (طیف‌سنجی جذب اتمی برقی گرمایی) نمی‌تواند بین یون‌های نقره و ذرات نقره تمایز قائل شود، بنابراین جابه‌جایی خودِ نانوذرات اثبات نمی‌شود. در بیماران سوختگی تحت درمان با پانسمان‌های زخم حاوی نانوبلور نقره، افزایش سطح سرمی نقره در خون مشاهده شد که نشان‌دهنده دریافت نقره است [135]. میزان نقره در خون، برای بیماران، غیرسمی شناخته شد [135]. مشاهدات مشابهی برای پوست انسان انجام شده‌است که در آن هیچ

1- Stratum corneum
2- European Scientific Committee for Consumer Safety
3- Nabeshi
4- Ultraviolet Beam
5- Flexing
6- Receptor fluid

نفوذی[1] از Ag NPs به اپیدرم (روپوست) زنده[2] پس از استعمال بر روی پوست سالم مشاهده نشده‌است، درحالی‌که Ag NPs با یک سوختگی نسبی، به اپیدرم زنده در پوست انسان رسیده‌است [133].

از طرف دیگر، خواص فیزیکی- شیمیایی نانوماده می‌تواند بر جذب تأثیر بگذارد. در یک بررسی اخیر نشان داده‌شد که برای برخی از نانوذرات (نسبتاً) کوچک، نفوذ پوستی به خصوص برای نانوذرات فلزی و اکسید فلزی ممکن است امکان‌پذیر باشد [136]. یک نفوذ پوستی وابسته به اندازه را می‌توان تشخیص داد: NPs ≥ ۴ nm می‌توانند به پوست سالم نفوذ و نشت[3] کنند، نانوذرات با اندازه بین ۴ نانومتر و ۲۰ نانومتر می‌تواند به‌طور بالقوه به پوست سالم و آسیب‌دیده نفوذ کند، اندازه نانوذرات بین ۲۱ نانومتر و ۴۵ نانومتر فقط می‌تواند به پوست آسیب‌دیده نفوذ و نشت کنند، نانوذرات با اندازه بزرگتر از ۴۵ نانومتر نمی‌توانند به پوست نفوذ کنند. این یافته‌ها با نتایج نابشی[4] و همکاران [132] برای نانوذرات سیلیس ۷۰ نانومتری که در بالا توضیح داده شد، در تضاد است.

علاوه‌براین، انحلال نیز باید درنظر گرفته شود، زیرا یون‌های محلول می‌توانند برداشته شده و باعث تأثیرات موضعی و سیستمیک شوند. بر روی پوست بدون موی موش نشان داده‌شد که شکل نانوذرات نقره میزان نفوذ پوستی را تعیین می‌کند [137]. فیلون[5] و همکاران برای ارزیابی ریسک بالقوه جذب پوستی در مصرف‌کنندگان و کارکنان در مواجهه با نانوذرات، یک درخت تصمیم‌گیری را پیشنهاد کردند [136].

۹-۳ دستگاه گوارش (GI)

۹-۳-۱ مدل‌های آزمون

برای بررسی عبور از میان سلول‌های روده‌ای، مدل‌های برون‌تنی برای دستگاه گوارش مانند سیستم کشت سلولی ترانسول[6] که با استفاده از سلول‌های Caco-2 مورداستفاده قرار می‌گیرد، در دسترس هستند [36] [138] [139] [140] [141]. این مدل‌های سلولی در شرایط برون‌تنی می‌توانند انتقال کم، متوسط یا زیاد را نشان دهند، اگرچه به‌خصوص تعیین جابه‌جایی کم می‌تواند با توجه به محدودیت‌های حساسیت روش اندازه‌گیری، مشکل باشد. تعیین مقدار جذب کمّی، مانند درصد جابه‌جایی دُز افزوده نانوذرات پلی‌استایرن، متفاوت و بین ٪ ۱٫۶ و ٪ ۱۲٫۳ گزارش شده‌است [138] [142] و این مدل‌های ساده روده‌ای قابل‌اطمینان

1- Penetration
2- Viable epidermis
3- Permeate
4- Nabeshi
5- Filon
6- Transwell®

نیستند. سلول‌های Caco-2 سلول‌های کولون (پس‌روده)[1] هستند که انتظار می‌رود کارکردهای دیگری به‌غیر از کارکردهای سلول‌های روده کوچک داشته باشند.

برای تعریف یک مدل مناسب برون‌تنی روده برای مطالعات جذب نانوذره، لازم است ساختار فیزیولوژیکی روده، همان‌گونه که در مرجع [121] به‌خوبی توضیح داده شده‌است، درنظر گرفته شود: «بافت پوششی روده از انتروسیت‌ها که مسئول جذب مواد مغذی و حداکثر ٪ ۲۴ از سلول‌های گابلت ترشح‌کننده مخاط تشکیل شده‌است [143]. مخاط از سلول محافظت می‌کند و سد فیزیکی کارآمدی در برابر عوامل بیماری‌زا است [144].

پلاک‌های پی‌یر[2] در دورترین قسمت ایلئوم[3] حضور داشته و مسئول ایمنی روده است. این قسمت بافت پوششی مرتبط با فولیکول (FAE)[4] نیز نامیده می‌شود؛ این قسمت از انتروسیت‌ها[5] و سلول‌های میکروفولد[6] میکروفولد[6] (سلول‌های M) تشکیل شده‌است. سلول‌های M در جذب و جابه‌جایی مولکول‌های بزرگ، باکتری‌ها و ویروس‌ها از مجرای روده به سلول‌های ایمنی، تخصص دارند. دریافت ذرات ریز کانی[7] (به‌عنوان مثال nm ۱۰۰ >) در روده عمدتاً از طریق سلول‌های M اتفاق می‌افتد، درحالی‌که نانوذرات (یعنی < ۱۰۰ nm) همچنین از طریق انتروسیت‌ها و سلول‌های گابلت برداشت می‌شوند [145] [146] [147] [148] [149] [150]. در واقع غشای پلاسمایی فوقانی[8] انتروسیت بالغ اساساً قادر به انجام اندوسیتوز[9] (درون‌بری) نیست؛ ریخت‌شناسی ریزپرز[10] به خودی‌خود[11] به‌صورت فضایی مانع از غلاف‌شدگی[12] وزیکول‌های[13] بزرگ اندوسیتیک[14] (درون‌بر) می‌شود. درنتیجه، انتروسیت‌های بالغ قادر به تجمع و جابه‌جایی ذرات ریز یا درشت از طریق ترانس‌سیتوز[15] نیستند [151]. در موارد نادر رویدادهای اندوسیتوتیک در لایه‌های انتروسیت، یعنی در بخش‌های میکروکریپت[16] بین ریزپرزهای مجاور، آندُزوم‌ها[17] معمولاً در سیتوپلاسم فوقانی، درست در زیر

1- Colon
2- Peyer’s patches
3- Ileum
4- Follicle-Associated Epithelium
5- Enterocytes
6- Microfold cells
7- Mineral microparticles
8- Apical
9- Endocytosis
10- Microvilli
11- Per Se
12- Invagination
13- Vesicles
14- Endocytic
15- Transcytosis
16- Microcrypt
17- Endosomes

ریزپرز نگه‌داشته می‌شوند [151]. سلول‌های گابلت قادر به تحمل اندوسیتوز هستند و در نتیجه نانو و میکروذرات را جمع می‌کنند، اما توانایی آنها در انتقال میکروذرات از طریق ترانس‌سیتوز گزارش نشده‌است». افزوده‌شدن سلول‌های M به کشت‌های Caco-2 بیشتر مشاهده می‌شود [36] [121] [152] و ورود آنها در مدل برون‌تنی روده به وضوح می‌تواند به‌عنوان مدلی ضروری برای مطالعات جذب نانوذرات تعریف شود [153].

بافت‌های سه‌بعدی گوارشی معرفی‌شده، به‌عنوان مثال با ایجاد جریان متوسط در امتداد سلول‌های Caco-2 تولید می‌شوند که سپس قطبی شده و به یک ساختار پرز مانند به وسیله خودشان تبدیل می‌شوند [154]. مزیت چنین کشت‌های سلولی و تشکیلات برون‌تنی برای مطالعه جذب گوارشی نانوذرات باید نشان داده‌شود.

یکی دیگر از خصیصه‌های مهم مدل‌های روده‌ای، وجود اتصالات محکم بین سلول‌های بافت پوششی است. این سلول‌ها در عملکرد سد تک‌لایه و حد جابه‌جایی مواد بین دو طرف فوقانی و تحتانی[1] از طریق مسیرهای مسیرهای پاراسلولی نقش دارند. تک‌لایه‌های Caco-2 دارای اتصالات چسبنده نیز هستند که از مولکول‌های چسبنده سلول مانند کادهرین[2] تشکیل شده‌است [141]. اتصالات چسبنده‌ها با تنظیم بیان کلودین[3] نقش مهمی در حفظ اتصالات محکم دارند [155]. در تک‌لایه‌های Caco-2، اتصالات محکم در نزدیکی سمت فوقانی فضاهای بین سلولی قرار دارند و اتصالات چسبنده‌ها بیشتر در فضاهای بین سلولی[4] سمت تحتانی قرار دارند [156] [157]. بنابراین، وقتی سمت فوقانی تک‌لایه‌های Caco-2 مواجهه پیدا می‌کنند برهم‌کنش نانومواد با کادهرین دشوار خواهد شد، زیرا اتصالات محکم، ورود نانومواد به فضای بین سلول را محدود می‌کند. در مقابل، هنگامی که سمت تحتانی تک‌لایه‌ها مواجهه می‌یابند، این امکان وجود دارد که نانومواد مستقیماً با کادهرین برهم‌کنش داشته باشند. هرچند، گزارش شده‌است که مواجهه با نانوذرات اتصالات محکم را مختل می‌کند (به‌عنوان مثال، به مراجع [117]، [121] و [141] مراجعه شود)؛ بنابراین نانوذرات می‌توانند به گیرنده کادهرین در سمت تحتانی دسترسی پیدا کنند.

خواص غشا (به‌عنوان مثال، ماده، اندازه منافذ) می‌توانند بر سرعت جابه‌جایی نانوذرات ازمیان سلول‌های قطبی‌شده[5] تأثیر بگذارند [158] [159]. بستر غشایی[6] با حفره‌های بزرگ‌تر باعث افزایش جابه‌جایی در مقایسه با حفره‌ها با اندازه‌های کوچک‌تر می‌شوند. از طرف دیگر، کاهش جابه‌جایی به دلیل جذب نانوذرات در

1- Basolateral
2- Cadherin
3- Claudin
4- Intercellular spaces
5- Polarized cells
6- Membrane inserts

غشا نیز می‌تواند اتفاق بیفتد [140]. بنابراین، برای اندازه‌گیری قابل‌اعتماد عبور از بافت پوششی[1]، انجام آزمایشات انتقال‌دادن بدون سلول ضروری است تا ممانعت یا عدم ممانعت از داخل شدن نانوذرات توسط خود بستر غشایی ارزیابی شود.

به‌ویژه برای دستگاه گوارشی، برهم‌کنش بالقوه‌ای که ممکن است با تمام اجزا و مایعات دستگاه گوارش رخ دهد، می‌تواند یک ارزشیابی اختصاصی‌تری از این برهم‌کنش‌ها را تضمین کند [36]. نحوه رفتار نانوماده در مایعات مختلف دستگاه گوارش مانند دهان، معده، روده‌های کوچک و بزرگ را می‌توان در یک مدل بررسی کرد. مدل‌های غیرسلولی برون‌تنی مختلفی وجود دارند [160] [161] [162] [163] [164]. برخی از این مدل‌ها ایستا[2] و بدون عبور هستند اما مدل‌های پویا[3] نیز با محدودیت‌های خاص خود در دسترس هستند [۳۶].

۹-۳-۲ دانش فعلی در مورد جذب نانوذرات در دستگاه گوارش

هنوز کمبود دانش در مورد این موضوع وجود دارد که تا چه اندازه ذرات منفرد، انبوهه‌ها/کلوخه‌های کوچک‌تر، انبوهه‌ها/کلوخه‌های بزرگ‌تر می‌توانند از طریق بافت پوششی مجاری گوارشی جابه‌جا شوند. همچنین فعل‌وانفعال بالقوه نانوماده با اجزای مختلف غذایی و فرآوری مواد غذایی عامل مداخله‌گر دیگری محسوب می‌شود. تماس با اجزای غذا می‌تواند منجر به تغییر تاج پروتئینی نانومواد شود [36]. مسئله دیگر می‌تواند تولید نانوساختارهای مختلف باشد. همچنین لازم است تا این موضوع موردتوجه قرار گیرد که مواد غذایی خود حاوی نانوساختارهای متعددی (به‌عنوان مثال، میسل‌ها[4]، قطرات چربی و سایر موارد) است.

دریافت از لوله گوارش برای چندین نانومواد نشان داده شده‌است (به‌عنوان مثال به مراجع [28]، [145]، [148]، [165]، [166] و [167] مراجعه شود)، اما عدم برداشت نانوذرات نیز مشاهده شد (به‌عنوان مثال به مراجع [168]، [169] و [170] مراجعه شود). با مطالعه دقیق‌تر این گزارش‌های متناقض برای TiO_2 NPs (اطلاعات تکمیلی مرجع [21]) نتیجه‌گیری می‌شود که جذبِ کم گزارش‌شده توسط برخی مطالعات (< ۱٪) ممکن است به دلایل زمینه‌ای دیگری در خوراکِ مورد استفاده [171] یا ملزومات قفسه[5] [172]، روش‌های آنالیزی با حساسیت کمتر و/یا استفاده از یک تک‌دُز به جای دُزهای مکرر و تجمع‌یافته، قابل‌آشکارسازی نباشد[21]. علاوه‌براین، همان‌گونه که در بند ۷ مورد بحث و بررسی قرار گرفته‌است، استفاده از دُزهای بالا ممکن است به دلیل ژله‌ای‌شدن و یا سایر فرآیندها، باعث کاهش جذب شود. همچنین، تعلیقه‌های دُز ممکن

1- Transepithelial passage
2- Static
3- Dynamic
4- Micelles
5- Cage enrichers

است اصلاً پایدار نباشند (منجر به کلوخگی شده و در نتیجه برداشت دشوارتر می‌شود) و یا بخشی از دُز مصرفی به دلیل جذب در تجهیزات آزمایشگاهی از بین برود [72]. به‌طور کلی، هریگنا[1] و همکاران [21] دریافتند که شواهد نشان‌دهنده جذب TiO_2 توسط روده بسیار کم است. این امر با یافته‌های TiO_2 NPs با نشانگر رادیواکتیوی تأیید شد [28].

در یک مطالعه داوطلبانه انسانی، نانونقره (با اندازه حدوداً ۶۰ نانومتر) به‌صورت خوراکی تا ۱۴ روز داده‌شد [173]. غلظت سرمی نقره در ٪ ۴۲ افراد دریافت‌کننده، ۱۰۰ میکروگرم در روز و در ٪ ۹۲ افراددریافت‌کننده ۴۸۰ میکروگرم در روز مشاهده شد، اما از طریق ادرار قابل‌شناسایی نبود [173]. غلظت نقره به‌وسیله ICP-MS تعیین شد و فرض بر این مبنا قرار گرفت که بخش عمده‌ای از نقره به‌عنوان یون‌های نقره وجود داشته، بنابراین دریافت نانوذرات را نمی‌توان اثبات کرد. این مثال، چالش‌های مطالعات نانوذرات را نشان می‌دهد که به‌راحتی حل می‌شوند.

به‌طور کلی مشخص شده‌است که ذرات کوچک‌تر دریافت بیشتری دارند که برای TiO_2 در آزمون درون‌تنی [148]، Ag در آزمون درون‌تنی [167] و Ag در آزمون برون‌تنی [141] نشان داده شده‌است. با این وجود، ذرات بزرگ TiO_2 (>100 nm) هم حتی می‌توانند جذب شوند [145]. در مقابل، مشخص شد که Au NPs بزرگ‌تر توسط سلول‌های Caco-2 تا حد زیادی نسبت به Au NPs کوچک‌تر درونی می‌شوند [141]. هرچند، تمام اندازه‌های Au NPs به میزان مشابهی به سمت تحتانی جابه‌جا می‌شوند. این نتایج نشان می‌دهد که دریافت توسط سلول‌های بافت پوششی روده به‌طور خودکار منجر به جابه‌جایی از سدهای بافت پوششی نشده و این‌که دریافت وابسته به اندازه برای هر ترکیب‌بندی هسته نانوذرات، متفاوت است. همان‌طور که نشان داده شده‌است، Au NPs، تاج پروتئینی متفاوتی را نسبت به Ag NPs جمع‌آوری می‌کنند [44] که می‌تواند این تفاوت‌های مشاهده‌شده را توضیح دهد. مشخص شد که نانوذرات پلی‌استایرن[2] از میان مدل‌های سد روده‌ای در شرایط برون‌تنی جابه‌جا می‌شوند و این حالت توسط یک پوشش مشتق‌شده از پلی‌اتیلن گلیکول[3] بر روی ذرات افزایش می‌یابد [138] [139] که نشان می‌دهد که تغییرات سطح می‌تواند بر روی جذب نیز اثر داشته باشد.

اختلاف در جذب روده‌ای بین موش‌های بالغ و موش‌های نوزاد برای نانوذرات نقره و همچنین یون‌های دریافتی نقره گزارش شده‌است [61]. این نتیجه با این فرض که نفوذپذیری روده در نوزادان انسان بیشتر از بزرگسالان است، قابل‌قبول به نظر می‌رسد [174] [175]، اما در مورد این نتایج احتیاط نیز وجود دارد، زیرا

1- Heringa
2- Polystyrene
3- Polyethylene glycol

اطلاعات ارائه‌شده در این استاندارد نمی‌تواند این نکته را لحاظ کند که آیا یون‌های نقره به جای نانوذرات نقره اندازه‌گیری شده‌اند یا خیر.

۹-۴ دستگاه تنفسی

۹-۴-۱ مدل‌های آزمون

جذب ریوی می‌تواند با استفاده از مدل‌های حیوانی یا مدل‌های درون‌تنی بررسی شود. استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۴۸۰: سال ۱۳۹۵، به‌تفصیل بیان نمی‌کند که چگونه مواجهه از طریق استنشاق لازم است انجام شود؛ بلکه بر ارزیابی کینتیک از طریق مطالعه مواجهه خوراکی تمرکز دارد. درمقابل، ملاحظات مربوط به دُز مصرفی را از رهنمودهای مطالعه استنشاقی مانند OECD TG 412 [۱] و OECD TG 413 [۲] می‌توان پیگیری کرد. همان‌طور که پیش از این بیان شد، استنشاق صحیح نسبت به دُز ریزش تدریجی[۳] داخل نای ارجحیت دارد (به زیربند ۸- ۱مراجعه شود). مواجهه استنشاقی صحیح می‌تواند فقط از طریق مواجهه فقط- بینی و مواجهه کل بدن انجام شود، درجایی که مواجهه فقط- بینی ترجیح داده می‌شود؛ زیرا مواجهه کل بدن می‌تواند منجر به مواجهه همزمان خوراکی از طریق نهشت ذرات بر روی خز[۴] حیوان شود که لیسیده می‌شود.

رده‌های سلولی نامیرای مختلفی برای ریه در دسترس هستند که بیشتر آنها از راه‌های تنفسی مرکزی نشأت می‌گیرند و همان‌گونه که توسط گوردون[۵] و همکاران بررسی شده‌است، فقط یک (A549) از یک آدنوکارسینوم سلول‌های پوششی آلوئولار[۶] وجود دارد. کشت‌های آلوئولی برای مطالعات جذب ریوی ترجیح داده می‌شوند، زیرا این ناحیه به لحاظ فیزیولوژیکی جایی است که بیشترین جذب در آن انجام می‌شود. چون رده سلولی A549 به دلیل داشتن نشتی[۷] در اثر عدم ایجاد اتصالات محکم، برای مطالعات جذب مناسب نیست. هر نوع مدل جذب به‌کاررفته در شرایط برون‌تنی لازم است یک عملکرد سدی مانند وضعیت

۱- استاندارد ملی ایران شماره ۱۸۶۹۸: سال ۱۳۹۳، آزمون سمیت مواد شیمیایی سمیت تحت حاد تنفسی- بررسی ۲۸ روزه- راهنما، براساس OECD TG 412: 2009 تدوین شده‌است.

۲- استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۸۶۷: سال ۱۳۹۴، آزمون سمیت مواد شیمیایی سمیت تحت مزمن تنفسی- بررسی ۹۰ روزه- راهنما، براساس OECD TG 413: 2009 تدوین شده‌است.

3- Instillation
4- Fur
5- Gordon
6- Alveolar epithelial adenocarcinoma
7- Leakiness

درون‌تنی را در انسان‌ها داشته باشد. به‌عنوان یک روش جایگزین، سلول‌های اولیه را می‌توان مورداستفاده قرار داد که به راحتی به‌دست نمی‌آیند و یا ممکن است بافت‌های تهیه‌شده از سلول‌های اولیه از تأمین‌کنندگان تجاری خریداری شود [126]. هرچند، به‌صورت تجاری، هنوز هیچ بافت آلوئولی در دسترس نیست، اما کماکان در حال توسعه است.

۹-۴-۲ دانش فعلی در مورد جذب نانوذرات پس از استنشاق

جابه‌جایی NPs در ریه در درجه اول در عمق ریه اتفاق می‌افتد که به نهشت[1] ذرات در آلوئول‌های بخش تنفسی ریه بستگی دارد. این نهشت به اندازه آیرودینامیکی هواسُل‌ها یا ذرات بستگی دارد و می‌تواند با (مدل‌های) کمیسیون بین‌المللی حفاظت رادیولوژیکی (ICRP)[2] و/یا مدل‌های دُزیمتری ذرات مسیر- چندگانه (MPPD)[3] محاسبه شود. مدل ICRP مدل نسبتاً ساده‌ای است که کسری از نهشت در نواحی مختلف را براساس اندازه ذرات نشان می‌دهد [176] [178]، درحالی‌که مدل MPPD می‌تواند نسبت نهشت ذرات را در هر لوب ریه برآورد کند [177]. اخیراً، مدل ICRP 1994 [176] به یک مدل چندبخشی پیچیده‌تر، روزآمد[4] شده‌است [178]. کسر رسوبی آلوئولار برای نانوذرات بیشتر از ذرات بزرگ‌تر است (به‌عنوان مثال، ۰٫۲- ۰٫۳ برای ۱۰ نانومتر تا ۱۰۰ نانومتر ذرات فولرن C_{60} و ۰٫۰۵ تا ۰٫۲ برای ۱۰۰ نانومتر تا ۱۰۰۰ نانومتر ذرات در موش‌های صحرایی [179]).

کسرهایی[5] از ذرات که در آلوئول‌ها نهشت داده نشده‌اند، دوباره بازدم می‌شوند و یا در راه‌های هوایی فوقانی و و میانی نهشت می‌کنند. از اینجا، نانوذرات می‌توانند به داخل مجاری گوارشی بلعیده شوند، میزان آنها در مدفوع افزایش‌یافته و به‌طور بالقوه منجر به جذب در گردش سیستمیک می‌شود. این قسمت‌های فوقانی و میانی راه‌های هوایی (بافت پوششی بینی و نای/نایژه) مژک‌دار[6] هستند و امکان انتقال ذرات نهشت‌یافته به مری را توسط مژک‌ها دارند، جایی‌که ذرات در نهایت بلعیده می‌شوند. ذرات نهشت‌یافته بر روی نایژه‌ها و نایژک‌ها را می‌توان توسط بالابر موکوسیلیاری[7] نایژه‌ای طی ۵ دقیقه پاک‌سازی کرد، زیرا طول نایژه (گلو تا نایژک انتهایی) در موش‌ها تقریبا ۵۳ میلی‌متر است [180] و سرعت حرکت مژکی ۷٫۵ میلی‌متر در دقیقه تا ۱۳٫۶ میلی‌متر در دقیقه است [181]. از آنجایی که بخش قابل‌توجهی از نانوذرات استنشاق شده، بنابراین

1- Deposition
2- International Commission on Radiological Protection
3- Multiple-Path Particle Dosimetry
4- Updated
5- Fractions
6- Ciliated
7- Mucociliary escalator

می‌توانند از مسیر خوراکی در دسترس باشند (به‌عنوان مثال به مرجع [182] مراجعه شود). در یافته‌های سیستمیک از مطالعات استنشاقی همواره لازم است احتمال مواجهه خوراکی را نیز در نظر داشت.

برای نانوذراتی که در آلوئول‌ها نهشت کرده‌اند، نه تنها کسری که از طریق بافت پوششی ریه برداشته شده و به گردش خون منتقل می‌شود از نظر توکسیکولوژی مرتبط است (همان‌گونه که برای سایر مسیرهای مواجهه نیز وجود دارد) بلکه، توزیع مجدد ذراتی که در فضای بینابینی و یا غدد لنفاوی ریوی تخلیه می‌شوند، می‌توانند تأثیرات موضعی ایجاد کنند. علاوه‌بر این، کسری که در آلوئول‌ها باقیمانده است، بسته به پایداری، می‌تواند تأثیرات سمی نیز ایجاد کند. پایداری هر نوع ذرات، شامل نانوذرات می‌تواند منجر به آسیب مزمن ناشی از استرس شود و در نهایت موجب فیبروز ریه و تومورهای قفسه‌سینه‌ای می‌شود [85]. بنابراین اطلاعات توکسیکوکینتیک به‌دست آمده از مطالعات استنشاقی می‌تواند شامل جابه‌جایی به گردش خون سیستمیک و نیز جابه‌جایی به فضای بینابینی و گره‌های لنفاوی موضعی و پایداری ذرات باقیمانده در ریه شود.

برای مواجهه ریوی، همچنین پتانسیل نانوذرات برای مهاجرت‌کردن در امتداد عصب بویایی از بینی به مغز (پیاز بویایی) لازم است درنظر گرفته شود [183] [184].

۹-۴-۳ پایداری در ریه

مسیر اصلی پاکسازی ماده ذره‌ای نهشت‌یافته بر روی سطح آلوئولار فرآیند بیگانه‌خواری توسط ماکروفاژهای آلوئولار است که می‌تواند با انتقال به حنجره [185] [186] [187] و متعاقبا مواجهه مجاری گوارشی ادامه پیدا کند. این ماکروفاژها می‌توانند به غدد لنفاوی موضعی مهاجرت کنند و مسیر دیگری از پاکسازی ریوی را از طریق ماکروفاژها فراهم کنند. مسیر دوم، مسیر خارج از ماکروفاژهای ریوی، از طریق نفوذ به سد سلولی بافت پوششی، ورود به سلول‌های بافت پوششی، نفوذ به فضای بینابینی ریوی و متعاقبا پاکسازی از طریق غدد لنفاوی و یا ورود به گردش سیستمیک از طریق لایه سلولی اندوتلیال است. این مسیر اصلی دوم (عبور از سد بافت پوششی) بسیار کندتر از مسیر اول (دریافت ماکروفاژی و متعاقبا انتقال به خارج از ریه) درنظر گرفته می‌شود [188]. فرآیند بیگانه‌خواری ذرات نهشت‌یافته طی ۶ ساعت تا ۱۲ ساعت پس از نهشت نانوماده رخ می‌دهد. هرچند، پاکسازی بعدی بسیار کندتر است (به مرجع [189] مراجعه کنید).

پاکسازی از ریه و بالعکس و پایداری در ریه را می‌توان در یک مطالعه درون‌تنی از طریق اندازه‌گیری مقدار نانوماده در ریه در نقاط زمانی مختلف بعد از آخرین تجویز، تعیین کرد. هنگام استفاده از روش‌های آنالیزی که بین ذرات و ماده حل‌شده تمایزی قائل نمی‌شوند، این مقدار در ریه می‌تواند از هر دو شکل تشکیل شود.

درآن‌صورت، دانستن سرعت انحلال در مایع لیزوزومی مصنوعی (pH ۴٫۵) و یا محلول گمبل (pH ۷٫۴) می‌تواند به تخمین کسر NP در مقدار اندازه‌گیری‌شده کمک کند.

متعاقب تعیین سرعت پاکسازی[1] ازطریق بار اندازه‌گیری‌شده ریوی در یک مطالعه درون‌تنی، می‌توان مدل‌سازی کینتیکی را به‌کار برد. مدل‌های یک‌بخشی[2] در اغلب موارد برای ارزشیابی پاکسازی ریه مورداستفاده قرار می‌گیرند [190] [191]. ثابت‌های سرعت پاکسازی مرتبه اول مشتق‌شده از چنین مدل‌هایی برای مواد بسیار ماندگار اغلب با افزایش دوره مشاهده، کاهش می‌یابند. بنابراین، ثابت‌های سرعت پاکسازی مرتبه اول که با استفاده از یک مدل یک‌بخشی در دوره‌های مختلف مشاهده برآورد می‌شوند، با یکدیگر نمی‌توانند مقایسه شوند. علاوه‌بر این، یک مدل یک‌بخشی با بار اندازه‌گیری‌شده چندان تطابق ندارد. سرعت پاکسازی (k) از ریه را می‌توان از طریق اندازه‌گیری بارهای ریوی و غده لنفاوی[3] تعیین کرد [39].

گزارش شده‌است که یک مدل دوبخشی، برازش[4] بهتری را در بار اندازه‌گیری‌شده فراهم می‌کند و می‌تواند برای ارزشیابی دو مسیر از پاکسازی، یعنی پاکسازی سریع پس از نهشت بر روی سطح ریه و پاکسازی آهسته پس از باقیماندن در بافت پوششی مورداستفاده قرار گیرد [188]. در چنین مدل دوبخشی برای دفع ریوی، سطح آلوئول و فضای بینابینی به ترتیب دو بخش را تشکیل می‌دهند. یک مدل مشابه مدل دوبخشی توسط گرگوراتو[5] و همکاران [192]، تحت عنوان به‌سازی مدل ICRP در ۱۹۹۴ توسعه یافت. در این مدل، مسیرهای پاکسازی از سطح آلوئول و فضای بینابینی آلوئول، به‌ترتیب، بالابرنده موکوسیلیاری نایژک‌ها از طریق نایژه‌ها و جابه‌جایی به غدد لنفاوی مرتبط با ریه از طریق فضای بینابینی درنظر گرفته شده‌است [193] [194] [195]. برای انسان‌ها، مدل دوبخشی ICRP نشان داد که تقریباً ٪ ۴۰ از نهشت آلوئولار به فضای بینابینی وارد[6] شده است، درحالی‌که کسر باقیمانده از طریق راه‌های هوایی مژک‌دار در زمان حدوداً ۳۰۰ روزه (نصف زمان پاکسازی کامل)[7] پاکسازی شده‌است [195]. هرچند، پیشنهاد شد که می‌توان پاکسازی‌ها توسط بالابرنده موکوسیلیاری نایژک از طریق نایژه‌ها را پس از بیگانه‌خواری ماکروفاژ و جابه‌جایی به غدد لنفاوی قفسه‌سینه‌ای به‌عنوان پاکسازی از سطح آلوئول توصیف کرد [196]. سپس، می‌توان فضای بینابینی آلوئولار را به‌عنوان یک بخش ریوی که ذرات در آن جمع می‌شوند و نه یک بخش فضای بینابینی برای پاکسازی آهسته ذره درنظر گرفت. تجمع در فضای بینابینی آلوئولار ممکن است از نظر فیزیولوژیکی

1- Clearance rate
2- One-compartment models
3- lymph node burdens
4- Fit
5- Gregoratto
6- Sequestered
7- A half time of about 300 d

مربوط به ماکروفاژهایی باشد که نانوذرات را فاگوسیتوز کرده‌اند و متعاقباً در این فضای بینابینی وارد شده‌اند، هرچند که عبور نانوذرات غیرفاگوسیته‌شده از بافت پوششی را نمی‌توان لحاظ نکرد [197].

تفاوت‌های گونه‌ای در باقیماندن آلوئولی ذرات وجود دارد. مدل‌ها برای موش‌های صحرایی، نهشت در آلوئول‌ها را نشان می‌دهند. هنگام ارزیابی باقیمانده ذرات در موش‌های صحرایی و میمون‌های سینومولگوس[1]، موش‌های صحرایی یک بخش بیشتری را در مجرای آلوئول نگه‌می‌دارند، درحالی‌که در پریمات‌ها[2] بخش بیشتری در فضای بینابینی ریه نگه‌داشته می‌شود [۱۹۸]. تفاوت مشابهی در مورد موش‌های صحرایی قرارگرفته در معرض ذرات اگزوز موتورهای گازوئیل سوز (٪ ۸۲ تا ٪ ۸۵ در بخش آلوئولار باقیماندند) و کارگرانی که به‌طور مزمن در معرض مواد ذره‌ای قراردارند (٪ ۵۷ تا ٪ ۹۱ در فضای بینابینی یافت شد) مشاهده شده‌است [199]. درصد ذرات در فضای بینابینی انسان با افزایش دُز (غلظت مواجهه، سال‌های مواجهه، و/یا بار ریوی) افزایش می‌یابد [199].

به‌نظر می‌رسد که (نانو) ذرات با انحلال ضعیف در ریه بسیار ماندگار هستند. نیمه- زمان[3] حذف از ریه برای هردو (نانو) ذرات ریز و بسیارریز در موش‌های صحرایی ۲۹ روز تا ۲۰۲ روز گزارش شده‌است که براساس محتوای ذره‌ای ریه است [200] [201]. در یک مطالعه با هفت نوع مختلف از ذرات TiO_2 [202]، ریه‌ها پس از ۹۱ روز ٪ ۹٫۰ تا ٪ ۱۸ از TiO_2 بدون پوشش تجویزشده را برای دُزهای ۰٫۳۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن تا ۲٫۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن و ٪ ۲۱ تا ٪ ۳۷ برای دُزهای ۳٫۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن تا ۶٫۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن باقیماندند. درنتیجه، همان‌گونه که توسط شینوهارا[4] و همکاران در سایر مطالعات و پائولوهن[5] و همکاران نیز مشاهده شده‌است، دُزهای بالاتر منجر به باقیمانده بیشتر شده‌اند [39] [196] [201] [202]. اندازه اولیه ذره (۶ نانومتر تا چند صد نانومتر)، مساحت سطح (۶ متر مربع در گرم تا ۳۰۰ متر مربع در گرم)، اندازه کلوخه (۶۹ نانومتر تا ۴۰۰ نانومتر)، شکل (کروی، دوکی- شکل، شبه- سوزنی) و شکل بلورین (روتیل[6] و آناتاز[7]) به‌نظر نمی‌رسد که بر پاکسازی ریوی ذرات TiO_2 تأثیرگذار باشند. عدم وجود تأثیر شکل بلورین در تضاد با آن چیزی است که توسط مؤلفان مرجع [203] کشف شده‌است. آنها گزارش کردند که TiO_2 بی‌شکل و TiO_2 آناتاز می‌توانند به درون سلول‌ها نفوذ کنند، درحالی‌که TiO_2 روتیل نمی‌تواند نفوذ کند و این نتیجه را با دریافت این نکته که TiO_2 بی‌شکل و TiO_2

1- Cynomolgus monkeys
2- Primates
3- Half- times
4- Shinohara
5- Pauluhn
6- Rutile
7- Anatase

آناتاز به‌طور مشابه در ذرات کوچک‌تر از TiO_2 روتیل، انبوهه می‌شوند (TiO_2 بی‌شکل: ۲۰۰ نانومتر، TiO_2 آناتاز: ۴۰ نانومتر تا ۹۰ نانومتر، TiO_2 روتیل: ۱۲۰۰ نانومتر) توضیح دادند. هرچند، شینوهارا و همکاران [202] دریافتند که شکل بلوری، اندازه‌های کلوخه مواد TiO_2 آنها را دیکته نمی‌کند و پیشنهاد کردند که تفاوت در پاکسازی که توسط ایسماگیلوف[1] و همکاران یافت شده‌بود [203] بیشتر به دلیل اختلاف اندازه کلوخه بوده‌است که هم‌زمان با تفاوت‌های شکل بلوری در مورد آنها اتفاق افتاده است.

همچنین، تأثیر دیگری از شکل این بود که ذرات شبه- لیفی[2] در مقایسه با ذرات کروی آهسته‌تر پاکسازی می‌شوند [188] [202] [204] [205]. در مقابل، ثابت‌های سرعت پاکسازی ریوی برای نانوذرات NiO سیمی‌شکل[3] بسیار بیشتر از نانوذرات NiO کروی و شکل نامنظم هستند [39].

بر خلاف مطالعه شینوهارا و همکاران [202]، سایر مطالعات در موش‌های صحرایی نشان می‌دهند که پاکسازی توسط ماکروفاژها برای نانوذره در مقایسه با ذرات بزرگ‌تر، از کارآمدی کمتری برخوردار است. به‌عنوان مثال، فقط حدود ٪ ۰٫۱ از TiO_2 NPs در طی ۲۴ ساعت پس از استنشاق هواسُل توسط ماکروفاژها درونی[4] شده‌اند، میکروذرات در مقایسه در همین شرایط در طی یک ساعت، ۱۰۰ برابر بیشتر درونی شده‌اند [206]. زدایش[5] آهسته نانوذرات با ماکروفاژهای آلوئولار (در نتیجه انتقال موکوسیلیاری) احتمال دریافت آنها آنها توسط سلول‌های بافت پوششی و انتقال آنها به گردش سیستمیک یا غدد لنفاوی را می‌تواند افزایش دهد [91]. برای باقیماندن ریوی TiO_2 NPs کوچک‌تر (۲۱ نانومتر) نسبت به ذرات بزرگ‌تر (۲۵۰ نانومتر) زمان طولانی‌تر گزارش شد که همراه با یک انتقال ترجیحی ذرات کوچک‌تر به فضای بینابینی است [207] [208] که همچنین با ذرات کربن سیاه نیز مشاهده می‌شود [209]. نتایج متفاوت مطالعه شینوهارا و همکاران [202] با اینکه که از اندازه‌های ذرات مشابه استفاده کرده‌بودند (۶ نانومتر تا چند صد نانومتر) ممکن است به‌دلیل استفاده آنها از روش متفاوت مواجهه (تزریق داخل نایی در مقابل استنشاق) و اوج[6] بار ریوی متفاوت به‌دست آمده‌باشد (۰٫۰۹ تا ۱٫۵ میلی‌گرم در ریه در مقابل ۵٫۲ میلی‌گرم در ریه).

نیمه- عمر فولرن C_{60} تزریق‌شده داخل نای (۱۸ نانومتر تا ۲۹ نانومتر) ۱۵ روز تا ۲۸ روز بود [188] که کوتاه‌تر از نیمه- عمر گزارش‌شده ذرات کربن سیاه در ریه‌های موش صحرایی در مرجع [209] بود (GM[7]، ۱۴ نانومتر تا ۷۰ نانومتر؛ ۶۴ روز). بر اساس دو مسیر شبیه‌سازی مدل پاکسازی، تخمین زده شد که بیش از

1- Ismagilov
2- Fiber-like
3- Wire shape
4- Internalized
5- Removal
6- Peak
7- Graphen material

٪ ۹۰ از ذرات تزریق‌شده C_{60} از طریق مسیر پاکسازی سریع، یعنی از طریق فاگوسیتوز توسط ماکروفاژها، مهاجرت ماکروفاژها به نای و نایژه و متعاقبا پاکسازی نای‌ـ نایژه‌ای (یعنی بالابرنده موکوسیلیاری) حذف می‌شوند. در ۶ ماه پس از تزریق داخل نای، تخمین زده شد که بیش از ٪ ۹۹ از بار ریه برای دوره طولانی در سلول‌های بافت پوششی آلوئولار بوده‌اند، زیرا C_{60} NPs در فضای بینابینی ریوی مشاهده نشدند، بلکه در سیتوپلاسم سلول‌های بافت پوششی آلوئولار با استفاده از TEM مشاهده شدند.

برای MWCNTs گزارش شده‌است که ٪ ۹۰ از آنچه که یک روز پس از مواجهه استنشاقی در ریه یافت شد، شش ماه بعد [77] و یا حتی ۳۶۴ روز بعد از تزریق ریوی نیز وجود داشت [85]، اما بار ریه همچنین پس از تزریق داخل نایی پس از ۲۸ روز از٪ ۷۸ در ابتدا به٪ ۲۸ کاهش یافت. C_{60} NPs کروی بسیار سریع‌تر از MWCNTs از ریه‌ها پاکسازی شدند (نیمه- عمر کمتر از یک ماه [188])؛ هر چند که هر دو آلوتروپ‌ها کربن بوده و هر دو دارای یک ساختار گرافنی بودند. برای سایر الیاف با انحلال ضعیف، پاکسازی ریوی به همان نسبت MWCNTs آهسته بود، به‌عنوان مثال، نیمه- عمر کروسیدولیت[1] و آموزیت[2] بیشتر از ۱۳ ماه [210]؛ ویسکر کاربید سیلیکون[3]، نیمه- عمر ۱۶ ماه [211].

در مورد شکل‌های لیف مانند، نسبت‌های منظری بالا (یعنی طول زیاد لیف نسبت به عرض) باعث اختلال فاگوسیتوز توسط ماکروفاژها در ریه (به‌عنوان مثال در مورد آزبست) و در نتیجه پایداری ریوی می‌شود. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که الیاف با طول بیش از ۱۵ میکرومتر نمی‌توانند به‌طور کامل فاگوسیته شوند و این امر موجب ایجاد سمیت سلولی می‌شود [212] [213]. این امر نمی‌تواند میزان باقیماندن طولانی مدت ۳۶۴ روز مشاهده‌شده با MWCNTs را با مرجع [85] توضیح دهد، هرچند، طول آنها کوتاه‌تر بود (به‌طور میانگین ۲٫۴ میکرومتر، فقط با ٪ ۱٫۱ از لوله‌های بزرگ‌تر از ۱۵ میکرومتر). علاوه‌بر این، آنالیز TEM آنها نشان داد که ماکروفاژهای آلوئولار MWCNTs تزریق‌شده را درونی‌کرده و هیچ کدام از MWCNTs دیواره سلول ماکروفاژ را سوراخ نمی‌کنند. این ماکروفاژها حداقل ۳۶۴ روز در ریه باقی ماندند. نکته جالب توجه این بود که MWCNTs در هسته یا سایر اندامک‌های داخل سلولی یافت نشدند.

علت دیگر باقیماندن طولانی‌مدت در ریه، به‌ویژه هنگامی که در موش‌های صحرایی مشاهده می‌شود، می‌تواند اضافه بار در ریه باشد: دُزهای آلوئولار آنقدر زیاد است که ظرفیت ماکروفاژها اشباع می‌شود و بنابراین پاکسازی به میزان قابل‌توجهی به تأخیر می‌افتد، در نتیجه موجب احتباس طولانی‌مدت ذرات در دُزهای بالاتر در مقایسه با دُزهای پایین‌تر می‌شود. پیشنهاد شده‌است که آستانه اضافه بار ریوی در موش‌های

1- Crocidolite
2- Amosite
3- Silicon carbid whisker

صحرایی در دُزهای ذرات بالاتر از یک میلی‌گرم در گرم ریه رخ دهد [200] [214]. برای MWCNTs درهم پیچیده، حداقل اضافه بار ریوی در ۰٫۱ میکرولیتر در گرم تا ۰٫۳ میکرولیتر در گرم در ریه (۰٫۱ میلی‌گرم در متر مکعب) مشاهده شد و اضافه بار کامل ریه در ۱٫۲ میکرولیتر در گرم تا ۱۲ میکرولیتر در گرم در ریه رخ داد. (۱٫۵ میلی‌گرم تا ۶٫۰ میلی‌گرم در متر مکعب) [77]. شینوهارا و همکاران [85] محاسبه کردند که MWCNT اولیه تجویزشده آنها فقط به دُز ۰٫۱۲ میکرولیتر در گرم در ریه رسیده‌است، درحالی‌که آنها دریافتند هنوز هم زمان نگه‌داشت طولانی (بیش از ۳۴۶ روز) است. این تفاوت نشان می‌دهد که ممکن است آستانه بروز اضافه بار ریوی آنقدر واضح نباشد و در عوض ممکن است به ویژگی‌های ذرات (اندازه، شکل و غیره) و/یا روش تجویز بستگی داشته باشد (زیرا این امر می‌تواند منجر به دُزهای مختلف موضعی شود). علاوه‌بر این، ممکن است مدل‌های محاسبه برای تخمین دُز آلوئولار به اندازه کافی و یا حداقل برای همه انواع ذرات دقیق نباشد.

۹-۴-۴ جابه‌جایی نانوذرات از طریق ریه

جابجایی نانوذرات از آلوئول به غدد لنفاوی یا گردش سیستمیک و سپس به سایر ارگان‌ها برای بسیاری از نانومواد گزارش شده‌است: TiO_2 (به‌عنوان مثال مرجع [73])، Au (مراجع [94] [215]) و MWCNTs (به‌عنوان مثال مرجع [85]). نانوذرات نقره نیز پس از استنشاق، در بافت‌های سیستمیک (ریه، کبد، طحال و جفت) با میکروسکوپ الکترونی عبوری همراه با طیف‌سنجی پرتوایکس تفکیک انرژی و با طیف‌سنجی جرمی- پلاسمای جفت‌شده القایی تک- ذره، شناسایی و کمیت سنجی شد و نشان داد که این ذرات به‌عنوان ذرات و نه به‌عنوان یون‌های نقره جابه‌جا می‌شوند هرچند، فقط ٪ ۰٫۰۲ از مقدار Ag در جفت[1] به‌عنوان NP وجود داشت [216]. بنابراین، همان‌گونه که توسط ون در زند[2] مشاهده شده‌است، این NPs ممکن است از یون‌های محلول نقره دوباره و از نو تشکیل شده‌باشند. به همین دلیل، مشخص نیست که آیا نانوذرات نقره به‌عنوان ذرات جذب می شوند یا خیر.

کسرهای جابه‌جاشده بسیار کم بوده و معمولاً کمتر از ٪ ۱ از نظر جرمی هستند و بخش عمده‌ای از نانوذرات در ریه باقی می‌مانند. کسرهای جابه‌جاشده ممکن است آنقدر کم باشند که در برخی از روش‌ها قابل‌شناسایی نباشند، به‌عنوان مثال: < ٪ ۰٫۲ (کبد) و ٪ ۰٫۰۲ (مغز) دُز تزریق‌شده از فولرن‌های C_{60} [188].

1- Placenta
2- Van Der Zande

مشاهده یک افزایش وابسته به دُز در سرعت جابه‌جایی، نشان می‌دهد که بر خلاف پاکسازی ریوی، جابه‌جایی به غدد لنفاوی قفسه‌سینه‌ای در دُزهای بالاتر نانوذرات افزایش یافته‌است [196]. بنابراین، این افزایش‌ها نشان می‌دهند که مسیر پاکسازی غدد لنفاوی قفسه‌سینه‌ای در اضافه بار ریوی، مشارکت ندارد.

در مطالعه‌ای با هفت نانوماده TiO_2، که عمدتاً در اندازه و شکل تفاوت داشتند و فقط یکی دارای یک پوشش بود، تفاوت‌های معنی‌داری به‌جز در مورد ذره پوشش‌داده‌شده، در مقادیر جابه‌جایی به غدد لنفاوی قفسه سینه‌ای پس از تجویز داخل نای موش‌های صحرایی، مشاهده نشد [202]. این امر نشان می‌دهد که اندازه و شکل، بر جابه‌جایی از ریه تأثیر نمی‌گذارد. جابه‌جایی NiO NPs از ریه‌ها به غدد لنفاوی قفسه‌سینه‌ای در حالت وابسته به زمان و دُز برای سه نانوذره کروی و نامنظم NiO افزایش یافت، اما برای نانوذرات سیمی‌شکل NiO این‌گونه نبود [39] که نشان می‌دهد شکل در هر حال می‌تواند مؤثر باشد. هرچند، عدم جابه‌جایی به دلیل انحلال نسبتاً سریع این NiO NPs سیمی‌شکل بوده است.

بر خلاف مطالعه شینوهارا و همکاران [202]، سایر مطالعات نشان دادند که هم اندازه ذرات اولیه و هم اندازه کلوخه‌ها بر جابه‌جایی در ریه تأثیر می‌گذارند. در موش‌های صحرایی، نانوذره کوچک‌تر آناتاز (۲۱ نانومتر) به راحتی در فضای بینابینی ریوی نسبت به ذرات بزرگ‌تر (۲۵۰ نانومتر) در جرم معادل، هر دو بعد از ۱۲ هفته استنشاق و بعد از تزریق داخل نای، نفوذ کرده‌اند [207]. در مطالعه‌ای با نانوذرات ایریدیم ۲۰ نانومتر در مقابل انبوهه‌های ۸۰ نانومتری متشکل از همان اندازه اولیه (۲ نانومتر تا ۴ نانومتر)، جابه‌جایی بیشتر از ریه‌ها، توزیع گسترده‌تر و تجمع بیشتر در ارگان‌های ثانویه برای انبوهه‌های کوچک‌تر از انبوهه‌های بزرگ‌تر یافت شد [48]. در یک مطالعه با مواجهه استنشاقی با کلوخه‌های هوابرد نانوذرات طلا (Au NPs) با توزیع اندازه یکسان و غلظت عددی مشابه، اما قطر اولیه متفاوت (۷ نانومتر یا ۲۰ نانومتر)، کلوخه‌های حاوی نانوذرات طلا ۷ نانومتری موجب بالاترین نهشت بر اساس غلظت جرمی در ریه‌ها و پس از آن بخش‌های مغزی از جمله پیاز بویایی[۱]، هیپوکامپ[۲]، جسم مخطط[۳]، قشر پیشانی[۴]، قشر آنتروئینال[۵]، سپتوم[۶]، مخچه[۷]، آئورت[۸]، مری[۹] و کلیه شد [184]. هرچند، این نکته درنظر گرفته می‌شود که مقادیر یافت‌شده در ارگان‌های

1- Olfactory bulb
2- Hippocampus
3- Striatum
4- Frontal cortex
5- Entorhinal cortex
6- Septum
7- Cerebellum
8- Aorta
9- Oesophagus

ارگان‌های ثانویه در این مطالعات می‌توانند از دریافت از طریق دستگاه گوارش یا عصب بویایی به جای دریافت از طریق ریه نشأت گرفته باشند.

همان‌گونه که در بالا گفته شد، جابه‌جایی در فضای بینابینی از میان بافت پوششی آلوئولار، در گونه‌های بزرگ‌تر (سگ، پریمات‌های غیرانسانی) نسبت به جوندگان، هم در مورد ذرات ریز [218] و هم در ذرات بسیار ریز (یعنی نانوذرات) برجسته‌تر است [198] [199] . بنابراین، منطقی است که تصور کنیم جابه‌جایی زیاد نانوذره که در موش‌های صحرایی مشاهده شده‌است، ممکن است در انسان‌ها نیز رخ دهد [189]. این امر البته ممکن است به نانوذره مورداستفاده بستگی داشته‌باشد و برای انواع دیگر نانوذره متفاوت باشد. علاوه‌بر این، ممکن است تفاوت در جابه‌جایی ریوی به دلیل تفاوت‌های جنسیتی و در ریه‌های آسیب‌پذیر[1] (مثلاً مدل‌های مستعد[2]) رخ دهد.

۱۰ توزیع

۱۰-۱ کلیات

به دنبال جابه‌جایی در مدخل ورودی، توزیع برخی از نانوذرات به ارگان‌ها و بافت‌های مختلف می‌تواند از طریق خون یا سیستم لنفاوی اتفاق بیفتد. همان‌گونه که توسط سطوح بالایی از نانوذرات تجویزشده درون وریدی به کبد و طحال نشان داده شده‌است، به‌طور کلی هنگامی که نانوذرات به‌صورت سیستمیک در دسترس باشند، جداسازی سریع توسط سلول‌های سیستم بیگانه‌خوار تک‌هسته‌ای (MPS) اتفاق می‌افتد [12] [17] [29] [219]. نانوذرات به‌صورت فعال و شبه- برگشت‌ناپذیر[3] توسط سلول‌های فاگوسیته‌کننده MPS از خون خارج می‌شوند که وابسته به غلظت نیست. علاوه‌بر سلول‌های MPS، گرانولوسیت‌ها نیز برای برداشت نانوذرات مشاهده شده‌اند. بسته به سویه[4] موش (پاسخ‌دهنده Th1 یا Th2)، گرانولوسیت‌ها حتی ممکن است در مقایسه با ماکروفاژها دریافت بیشتری داشته باشند [30]. غلظت خون پس از مواجهه درون وریدی به سرعت کاهش می‌یابد، به‌عنوان مثال در ۱۵ دقیقه به کمتر از ٪ ۱ دُز تجویزشده می‌رسد [219]. بنابراین، غلظت در خون یا پلاسما به‌طور کلی ارزش کمی برای تخمین دُز داخلی دارد، زیرا غلظت در ارگان‌ها به غلظت خونی بستگی ندارد. بنابراین، همان‌گونه که اغلب در مورد توکسیکوکینتیک رایج مشاهده می‌شود غلظت پلاسمایی یک نانوذره نشان‌دهنده غلظت بدنی نانوذره نیست. پارامترهای توکسیکوکینتیک

1- Compromised lungs
2- Susceptibility models
3- Quasi-irreversibly
4- Strain

رایج مانند AUC خونی، V_d[1]، C_{max}[2] و غیره متعاقباً هیچ ارزش کاربردی در توکسیکوکینتیک نانوماده ندارند.

۲-۱۰ توزیع ارگانی

حذف سریع از خون به دلیل دریافت بیگانه‌خواری توسط مونوسیت‌ها (ماکروفاژها) در ارگان‌های غنی از این نوع سلول‌ها (یعنی MPS) اتفاق می‌افتد: کبد، طحال، مغز استخوان، غدد لنفاوی و ریه. در میان این ارگان‌ها، نانوذرات شامل MWCNTs بیشتر در کبد و طحال یافت می‌شوند [13] [59] [165] [220] [221] [222] [223] [224] [225]، [80] [99]. همچنین TiO_2 NPs در کبد و طحال انسان گزارش شده‌است [102]. با این وجود، آنها در مغز، کلیه‌ها، بیضه‌ها و قلب نیز یافت شده‌اند [116] [166] [217] [219].

توزیع می‌تواند به مسیر مواجهه بستگی داشته باشد: پس از استنشاق یا تجویز داخل نایی TiO_2 NPs، تیتانیم در ریه‌ها و غدد لنفاوی مرتبط با ریه تشخیص داده شده‌است، اما در سایر ارگان‌ها از جمله کبد، طحال، کلیه و مغز زیر حد تشخیص باقی مانده‌است [190] [191] [222] [226]. فقط هنگام استفاده از یک روش بسیار حساس، Ti نیز در کبد [73] [196] و سایر ارگان‌ها [80] [99] تشخیص داده‌شد، هرچند، مقدار جابه‌جایی کم بود، بسیار کمتر از غدد لنفاوی مرتبط با ریه. پس از مواجهه خوراکی با TiO_2 NPs، تیتانیم در کبد و طحال شناسایی شده و مقدار کمی به ریه‌ها منتقل می‌شود [221] [222] [223]. برای NiO NPs الگویی مشابه بعد از تزریق داخل نای مشاهده شد؛ همان‌گونه که برای TiO_2 NPs نیز مشاهده شده بود: بار کبدی کمی افزایش یافت، اما هیچ‌گونه افزایش قابل‌توجهی در سطح NiO کلیه، طحال و مغز مشاهده نشد [39]. در ۹۰ روز پس از تجویز وریدی، علائم توزیع مجدد برای TiO_2 NPs با کاهش در کبد و افزایش در سطح طحال مشاهده شد [17]، درحالی‌که برای MWCNT کاهش مداوم در ریه و افزایش مداوم در ارگان‌های مختلف در ۳۶۰ روز پس از تنفس حلقی مشاهده شد [80].

نانوذرات محلول می‌توانند توزیع متفاوتی از نانوذرات غیرمحلول را نشان دهند. برای نانونقره یک افزایش وابسته به دُز محتوی Ag در مغز، کلیه‌ها، کبد، ریه‌ها، معده و بیضه‌ها پس از تجویز خوراکی وجود داشت [166] [217]. جابه‌جایی Ag از دستگاه گوارش را می‌توان به‌طور عمده به مهاجرت یون‌های Ag^+ نسبت داد [217]. تجویز خوراکی Ag-NP منجر به یک حضور گسترده از Ag در ارگان‌های مختلف می‌شود که به‌طور عمده در طی هشت هفته از ارگان‌ها به استثنای مغز و بیضه پاکسازی می‌شوند. محتوای Ag ارگانی همبستگی زیادی با حضور یون‌های Ag^+ در تعلیقه Ag-NP دارد که نشان می‌دهد یون‌های Ag^+ و به میزان کمتری Ag NP از روده‌ها عبور می‌کنند. نکته قابل‌توجه این بود که Ag NPs می‌توانند در حیوانات تحت

1- Volume of distribution
2- Maximum concentration

درمان با محلول $AgNO_3$ نشان داده‌شوند که نشان‌دهنده شکل جدیدی از نانوذرات از Ag^+ در داخل بدن است. نتیجه‌گیری می‌شود که مواجهه با نانوذرات نقره به‌نظر با مواجهه داخلی مانند مواجهه با نمک‌های نقره مشابه است [۲۱۷]. بنابراین، توزیع Ag و سایر نانوذرات محلول می‌توانند منعکس کنند توزیع یون‌های آنها، به جای نانوذرات آن باشد.

توانایی اندازه‌گیری دُز داخلی یک نانوذره در بافت‌ها در شناسایی ارگان‌های هدف بالقوه برای آزمون سمیت و در ساخت یک رابطه مناسب دُز- پاسخ، ضروری است. این امر بخصوص در مورد نانوذراتی که می‌توانند با گذشت زمان در بافت‌ها تجمع یابند، بسیار صدق می‌کند. بار TiO_2 کبدی و طحالی پس از قطع مواجهه به سختی کاهش نشان می‌دهد، درحالی‌که بار TiO_2 در ریه، کلیه، قلب و خون با گذشت زمان کاهش یافت [219]. همچنین، سایر محققان نشان دادند سطح TiO_2 در کبد و طحال ثابت است و حتی افزایش سطح طحالی با گذشت زمان نشان‌دهنده توزیع مجدد نانوماده است [17]. این امر الگوی نوینی در توکسیکولوژی را ارایه می‌دهد، بخصوص برای ارگان‌هایی که به‌طور معمول در برابر ورود ذرات بزرگ‌تر محافظت می‌شوند. این امر همچنین روابط دُز- پاسخ را برای نانوذراتی که در ارگان‌های هدف متعدد مشخص می‌شوند، ضروری می‌کند که شامل برخی از مواردی است که در ردیف اول ملاحظات ارزیابی ریسک مواد حل‌شده قرار ندارند.

مواجهه خوراکی و داخل وریدی نانوذرات طلا در اندازه‌های مختلف، منجر به افزایش توزیع ارگانی با کاهش اندازه ذرات در موش‌ها و موش‌های صحرایی می‌شود [12] [227].

مرسر[1] و همکاران [99] دریافتند که بافت‌های دور فقط حاوی MWCNTs منفرد هستند، درحالی که کلوخه‌ها تقریباً ٪ ۵۴ از بار ریه را (پس از مواجهه استنشاقی) به خود اختصاص می‌دهند. آنها پیشنهاد کردند که MWCNTs جابه‌جا شده و به شکل منفردشان توزیع می‌شوند. هرینگا[2] و همکاران [102] گزارش کردند که TiO_2 که آنها در کبد و طحال انسان شناسایی کرده بودند، با میکروسکوپ به‌صورت کلوخه/انبوهه قابل‌مشاهده است، اما اندازه ذرات شناسایی‌شده با sp-ICP-MS (۸۵ نانومتر تا ۷۲۰ نانومتر) نشان می‌دهد که ذرات منفرد نیز می‌توانند وجود داشته باشند.

۳-۱۰ انتقال از طریق جفت، سد خونی- مغزی و ارگان‌های تولید مثل

در یک بررسی اخیر، هوگارد[3] و همکاران [۱۴] امکان مهاجرت نانوذرات به جفت و جنین را ارزشیابی کردند. علاوه بر حیوانات (با استفاده از تزریق داخل وریدی) مدل‌های جفت برون‌تنی و خارج از بدن[4] نیز، هم از

1- Mercer
2- Heringa
3- Hougaard
4- Ex vivo

منشاء حیوانی و هم انسانی در دسترس هستند. مهاجرت نانوذرات به جفت و نوزادان محتمل تشخیص داده‌شد، درحالی که به‌طور کلی می‌دانیم که گونه‌هایی با وزن مولکولی بالا (۱۰۰۰ Da)[1] با انتشار غیرفعال به جفت نفوذ نمی‌کنند [228]. برای انواع مختلف نانوذرات (به‌عنوان مثال، TiO_2، SiO_2، Ag، فولرن‌های C_{60}) مهاجرت به جفت و نوزادان تا حد کمی نشان داده شده‌است [14] [216] [229]. در توضیح انتقال فراجفتی[2] نانوذرات انتظار می‌رود آنها مستقیماً به سد خونی- جفتی آسیب رسانند و یا به‌طور فعال از طریق آن منتقل شوند.

به‌نظر می‌رسد که انتقال ذرات از میان جفت محدود به اندازه است: نانوذرات nSP70[3] (ذرات سیلیس ۷۰ نانومتری) در تروفوبلاست‌های[4] جفت، کبد جنین و مغز جنین پیدا شدند، درحالیکه پس از مواجهه با nSP300 (ذرات سیلیس ۳۰۰ نانومتری) و یا mSP1000[5] (ذرات سیلیس ۱۰۰۰ نانومتری) هیچ ذره‌ای در این مکان‌ها دیده نمی‌شود [228]. اصلاح سطح ذرات nSP70 با گروه‌های عاملی COOH یا NH_2 توانایی آنها در انتقال از میان جفت و رسیدن به جنین را تغییر نداد، اصلاح ذرات بر وزن رحم، وزن جنین و سرعت جذب دوباره جنین تأثیر ندارد.

نانوذرات سیلیس (۷۰ نانومتر) در سلول‌های مردانه در بیضه تشخیص داده شده‌اند [230] که نشان می‌دهد چنین نانوذراتی می‌توانند از سد خون- بیضه عبور کنند. عبور میان‌سلولی (ترانس‌سیتوزیس)[6] سازوکاری است که از طریق آن نانوذرات سیلیس، پس از دریافت توسط سلول‌ها، می‌توانند از طریق سد خون- بیضه منتقل شوند [229]. همان‌طور که گزارش شده‌است، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم با تأثیر بر روی پروتئین‌های ساختاری اتصالات چسبنده بین سلول‌ها مانند کادهرین اندوتلیال عروقی، از اتصالات شکاف‌دار[7] عبور کرده و و آنها را سست می‌کنند، نانوذرات سیلیس نیز می‌توانند با افزایش نفوذپذیری بافت پوششی به بیضه‌ها مهاجرت کنند [229]. عبور به هسته‌های بویایی مغز می‌تواند پس از استنشاق و مهاجرت در امتداد عصب بویایی رخ دهد (به زیربند ۹-۴ جابه‌جایی نانوذرات از طریق ریه مراجعه کنید). بنابراین، افزایش سطح نانوذرات در مغز در مطالعات با مواجهه استنشاقی یا تزریق داخل نایی یا داخل بینی، نشان‌دهنده عبور از سد خونی- مغزی (BBB)[8] نیست. هرچند، نمی‌توان عبور سد خونی- مغزی را پس از دریافت ریوی به‌دلیل

1- Dalton
2- Transplacental
3- Silica particles 0f 70 nm
4- Torphoblasts
5- Silica particles 0f micro size
6- Transcytosis
7- Gap junctions
8- Blood-Brain Barrier

دریافت معده‌ای- روده‌ای پس از پاکسازی از ریه توسط آبشار[1] موکوسیلیاری، به‌طور کامل حذف کرد. برخی از مطالعات خوراکی و داخل وریدی افزایش سطح مغزی را گزارش کرده‌اند که نشان‌دهنده عبور از سد خونی‌ـ مغزی است، مانند Ag [166]، TiO_2 [17] و Au NPs [232] که در مورد نانوذرات طلا، نانوذره با اندازه کوچک‌تر، در مغز درصد بالاتری از دُز را نشان می‌دهند. در حقیقت، درحال‌حاضر، کپسوله‌سازی داروها در نانوذره به‌عنوان روشی برای رساندن داروها به‌خصوص به مغز دیده می‌شود. با توجه به بررسی ژو[2] و همکاران [233] این امر را می‌توان از طریق سازوکارهای مختلف تحقق بخشید. تصور می‌شود که Ag NPs با ایجاد یک پاسخ التهابی که در آن سیتوکین‌های[3] تولیدشده نفوذپذیری مویرگی را افزایش می‌دهند، اتصال محکم بین سلول‌های پوششی را مختل می‌کنند. مشخص شد که Au NPs بدون پوشش توسط کانال‌های یونی منتقل می‌شوند (زیرا مسدودکننده‌های کانال یونی باعث کاهش دریافت آنها به مغز می‌شوند). Au NPs پوشش‌دار مانند نقطه کوانتومی مزدوج با کربن، لیپوزوم‌ها و نانوذرات پلیمری هنگامی که یک پروتئین یا لیگاند دیگری برای پوشاندن یا مزدوج شدن با آنها استفاده شود، می‌توانند از طریق آندوسیتوز با واسطه گیرنده برداشته شوند (آنها توسط گیرنده‌های موجود در سد خونی‌ـ مغزی مانند ترانسفرین[4] یا PEG شناخته می‌شوند). بنابراین شیمی سطح و بار (غشای سلول‌های پوششی بار منفی دارند [233]) از خواص مهم حاکم بر عبور از سد خونی‌ـ مغزی هستند.

۱۱ سوخت‌وساز/تجزیه

سوخت‌وساز به‌طور معمول درگیر تجزیه آنزیمی شامل فاز I و II تبدیل‌زیستی[5] است. تخریب آنزیمی مشابهی نشان داده شده‌است که در نانولوله‌های کربنی رخ می‌دهد. تاکنون، شواهد اندکی در مورد چنین تبدیل‌زیستی برای سایر نانومواد با انحلال ضعیف مانند SiO_2، TiO_2، NPs طلا و غیره وجود دارد. به‌طور کلی، سوخت‌وساز آنزیمی فلزات و اکسیدهای فلز نانوذرات بسیار کم یا صفر درنظر گرفته می‌شود. سازوکارهایی که توسط آنها نانوذرات می‌توانند توسط تبدیل‌زیستی تخریب شوند، کاملاً شناخته نشده‌اند، اما سازوکارهای دیگری غیر از تخریب آنزیمی می‌توانند درگیر باشند. به‌عنوان مثال، سطوح طلا می‌توانند یون‌های طلا را پس از گرمخانه‌گذاری با ماکروفاژها [234] و در مایعات اسیدی [235] آزاد کنند. برای انحلال نیز به زیربند ۶-۱ مراجعه کنید. ابعاد مختلف تخریب و انحلال احتمالی ذرات در استاندارد ISO/TR 19057: 2017 ارائه شده‌است.

1- Cascade
2- Zhou
3- Cytokines
4- Transferrin
5- Biotransformation

نانولوله‌های کربنی توسط مایلوپراکسیداز[1] نوتروفیلی و یا ردیش پراکسیداز اسبی[2] تجزیه می‌شوند [51] [236]. مواجهه با C_{60} منجر به تشکیل سه پیک اضافی در عصاره[3] بافت ریه می‌شود که مشخص شد یکی متعلق به $C_{60}O$ بوده و بقیه قابل‌شناسایی نیستند [188]. هامانو[4] و همکاران [237] گزارش دادند که C_{60} به وسیله سامانه مدل شیمیایی سیتوکروم P-450 مصنوعی، اکسید شده‌است. هرچند، بولارد- دیلارد[5] و همکاران [224] $C_{60}O$ را در بافت‌های موش تشخیص ندادند. اگر C_{60} به $C_{60}O$ و/یا به ترکیبات ناشناخته متابولیزه شود، میزان متابولیزه آن احتمالاً اندک است [188].

۱۲ دفع

پس از تجویز/مواجهه خوراکی و حتی پس از مواجهه استنشاقی (به‌دلیل بالابرنده موکوسیلیاری)، دفع جذب‌نشده از طریق مدفوع از دستگاه گوارش اتفاق می‌افتد (به‌عنوان مثال مرجع [182]). هیچ سطح افزایش‌یافته قابل‌توجهی در مدفوع و ادرار پس از مواجهه داخل وریدی با نانوذرات TiO_2 P25 یافت نشد که نشان می‌دهد که هیچ دفع قابل‌توجهی از طریق کلیه و صفرا وجود ندارد [219]. هرچند، نشان داده شده‌است که NiO NPs از طریق ادرار دفع می‌شوند، ذرات سیمی شکل در ۲۴ ساعت اول پس از تجویز به میزان بیشتری نسبت به ذرات کروی یا شکل نامنظم دفع می‌شوند [39]. ذرات سیمی شکل دارای SSA بالاتر و سرعت انحلال بیشتری نسبت به سایر اشکال ذرات هستند. همچنین، دفع از طریق ادرار برای نانوذرات سیلیس ۲۰ نانومتری و ۸۰ نانومتری پس از تجویز وریدی نانوذرات سیلیس مشاهده شده‌است [238].

توزیع نانوذرات و سپس دفع آن از طریق شیر مادر به‌طور منظم گزارش شده‌است، به‌عنوان مثال برای NPs TiO_2 [122]، فولرن‌ها [239]، Ag [240]، Au [35]. میزان توزیع Ag NPs پوشش داده‌شده با لیگاند سیترات (۱۰ نانومتر، ۵۰ نانومتر، و ۱۰۰ نانومتر) با تجویز درون وریدی در شیر مادر، با کاهش اندازه ذرات ظاهراً افزایش می‌یابند، اما هنگام درنظر گرفتن غلظت خونی، Ag بزرگ‌تر نسبت به نانوذرات کوچک‌تر و Ag^+ به‌راحتی در شیر مادر توزیع می‌شود [35]. احتمالاً هم غلظت‌های خونی و هم انتقال آن به شیر مادر در واقع توسط یون‌های نقره ایجاد شده‌است نه توسط نانوذرات نقره، زیرا روند در این بافت‌ها با درصد

1- Myeloperoxidase
2- Horse radish peroxidase
3- Extract
4- Hamano
5- Bullard-Dillard

یون‌های آزادشده مطابقت دارد. نانوذرات نقره در اوایل دوره شیردهی نسبت به اواخر دوره شیردهی به میزان بیشتری در شیر مادر توزیع شدند.

موریشیتا[1] و همکاران [35] نیز دریافتند که دُزهای تجویزشده Ag (نانوذرات یا یون‌ها) هیچ آسیب حاد مشهودی در سد شیرـ خون ایجاد نمی‌کنند، بنابراین به نظر می‌رسد جابه‌جایی مشاهده‌شده توسط آنها ناشی از افزایش نشتی این سد نباشد. تصور می‌شود که مواد موجود در خون با استفاده از مسیرهای ترانس‌سیتوز، انتقال غشایی و انتقال پاراسلولی به شیر مادر منتقل می‌شوند. همان‌گونه که Ag NPs مورد استفاده توسط موریشیتا و همکاران [35] به اندازه کافی کوچک نبودند تا بتوانند از مسیرهای انتقال غشایی یا انتقال پاراسلولی استفاده کنند، ممکن است Ag NPs با استفاده از مسیر ترانس‌سیتوز به شیر مادر منتقل شده‌باشند. آنها برخی شواهد تجربی را پیدا کردند که نشان می‌دهد این انتقال در واقع از طریق یک مسیر غیر پاراسلولی و وابسته به انرژی انجام شده‌است. اما، همان‌گونه که پیش از این برای Ag NP نشان داده‌شد، ممکن است یون‌ها به جای NPs بوده‌اند.

پس از استنشاق Au NPs توسط داوطلبان، Au در خون و ادرار ۱۵ دقیقه پس از استنشاق نشان داده شد، اگرچه میزان دریافت محاسبه‌شده از ریه بسیار کم بود (٪ ۰٫۰۲ دُز تجویزشده) [241] [242].

به‌دلیل سطح پایین دفع، تجمع امکان‌پذیر بوده و برای انواع مختلفی از نانومواد ساخته‌شده و درواقع برای مسیرهای مختلف مواجهه گزارش شده‌است (به‌عنوان مثال، برای TiO_2 در موش‌های صحرایی [17]، برای TiO_2 در محیط [243]، برای Ag در موش‌های صحرایی [29]، و برای SiO_2 در موش‌های صحرایی [244]).

۱۳ نتیجه‌گیری

براساس مشاهدات توضیح‌داده شده در بالا، می‌توان چندین جمع‌بندی و نتیجه‌گیری را انجام داد. مهم‌ترین نتیجه‌ای که گرفته می‌شود این است که توکسیکوکینتیک و توزیع بافتی نانوماده به‌طور قابل‌توجهی با مواد مولکولی/یونی متفاوت است. جدول ۱ یک مرور کلی از تفاوت‌های مهم بین فرآیندهای توکسیکوکینتیک و جنبه‌های مواد حل‌شده (مولکولی/یونی) و نانومواد را نشان می‌دهد. این تفاوت‌ها به دلیل ماهیت ذره‌ای نانومواد است که با ماهیت انحلال‌پذیری مواد حل‌شده در تضاد است. نشانه‌هایی برای اکسیداسیون نانومواد آلی وجود دارد. مشخص نیست که آیا اکسیدهای فلزی سوخت‌وساز می‌شوند یا خیر، اما ممکن است انحلال برخی از فلزات و اکسیدهای فلزی اتفاق بیفتد. برای آن دسته از نانومواد مقداری انحلال نشان می‌دهند، مانند نانونقره، اکسید روی و نانومواد اکسید مس، در توکسیکوکینتیک و توزیع بافت نیز نیاز است تا

1- Morishita

کسرهای محلول آنها درنظر گرفته شود. برای مولکول‌های حل‌شده که از نانومواد نشأت می‌گیرند، توکسیکوکینتیک مشابه مواد حل‌شده (مولکولی یا یونی) خواهد بود.

با توجه به رفتار توکسیکوکینتیکی غیرمعمول نانوذرات، پارامترهای توکسیکوکینتیک کلاسیک در مورد نانومواد مقادیر خاصی دارند و یا حتی ممکن است قابل‌استفاده نباشند. جدول ۲ خلاصه‌ای از محدودیت‌های اعمال برخی از پارامترهای توکسیکوکینتیک کلاسیک در نانوذرات را نشان می‌دهد.

جدول ۱ـ جنبه‌های کینتیکی متمایزکننده نانوذرات از مواد حل‌شده

جنبه کینتیکی	مواد حل شده (مولکولی/یونی)	نانوذرات
تجمع	امکان‌پذیر، هم در پلاسما و هم در	امکان‌پذیر، فقط در بافت‌ها، به‌سختی در

	بافت‌ها	پلاسما
جذب	٪ ۰ تا ٪ ۱۰۰	اساساً کم (% << ۱۰)
انتقال از سد	ناشی از شیو غلظت[۱] و یا انتقال فعال توسط حامل‌ها	اغلب از طریق اندوسیتوز، برخلاف شیو غلظت امکان‌پذیر است.
مزدوج‌شدن	بله، به دفع کمک می‌کند.	احتمالاً خیر
توزیع	وابسته به سرعت استخراج و جریان	دریافت فعال توسط فاگوسیت‌ها. توزیع اساساً در بافت‌هایی با ظرفیت فاگوسیت‌کنندگی (MPS)
دفع	کلیوی، کبدی و غیره	پاکسازی از بافت به‌طور کلی بسیار کم و احتمالاً مربوط به انحلال است.
برهم‌کنش‌ها ناشی از مواجهه‌های مخلوط	تعدادی از سازوکارها شناخته‌شده‌اند؛ به‌عنوان مثال رقابت برای آنزیم‌های سوخت‌وساز‌کننده	ناشناخته است، هنوز هیچ موردی گزارش نشده‌است.
تفاوت‌های بین گونه‌ها	بر پایه شناخت	ناشناخته است و برخی نشانه‌ها وجود دارند.
هم‌خطی[۲]	کوچک‌تر، بزرگ‌تر و یا مساوی با دُز- نسبی	کوچک‌تر از دُز- نسبی به دلیل کلوخه شدن/انبوهه شدن و/یا اشباع مشاهده‌شده در دُزهای بالاتر
نهشت ریوی	انتشار[۳]	نهشت مربوط به قطر آیرودینامیکی، گیرافتادگی[۴]
سازوکار تجمع	آبگریزی یا اتصال به ساختارهای سلولی یا پروتئین‌ها	بیشتر در وزیکول‌ها
سوخت‌وساز (تخریب آنزیمی)	٪ ۰ تا ٪ ۱۰۰	برای اکسیدهای فلزی اتفاق نمی‌افتد. برای نانوذرات آلی برخی از نشانه‌های اکسیداسیون وجود دارد.
مدل‌های PBPK	پارامترسازی فیزیولوژیکی شناخته‌شده دارند.	پارامترسازی فیزیولوژیکی در دست توسعه است.
پروتئین‌ها	اتصالات پروتئینی، کسر آزاد را کاهش می‌دهد، کسر آزاد، فعالیت را تعیین می‌کند.	تشکیل تاج که ممکن است بر روی کینتیک تأثیر بگذارد.
برون‌یابی مسیر به مسیر	بر پایه شناخت	ناشناخته، کینتیک‌های وابسته به مسیر محتمل به‌نظر می‌رسند، مربوط به تغییرات در تاج پروتئینی است.
اشباع	جابه‌جا کننده‌ها[۵] و آنزیم‌های متابولیک می‌توانند اشباع شوند.	گزارش نشده، ناشناخته

جدول ۱- (ادامه)

جنبه کینتیکی	مواد حل شده (مولکولی/یونی)	نانوذرات
شکل ماده	هم‌شکل	چندشکلی (به‌عنوان مثال، توزیع اندازه)،

		همچنین طی مواجهه درونی
مولکول‌های جابه‌جا کننده	جابه‌جا کننده‌های کلیوی، کبدی	سازوکارهای پاکسازی به‌طور کامل درک نشده‌اند.
دریافت به داخل بافت	ناشی از انتشار، به واسطه حامل	دریافت فعال توسط مونوسیت‌ها (ماکروفاژها)، اندوسیتوز، احتمالاً در بعضی موارد غیر فعال است.

[1] Gradient
[2] Linearity
[3] Diffusion
[4] Impaction
[5] Transporters

جدول ۲ ــ محدودیت کاربرد برخی از پارامترهای توکسیکوکینتیک کلاسیک در نانومواد
(تعاریف برگرفته از http://sepia.unil.ch/pharmacology/ و استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۴۸۰)

پارامتر توکسیکوکینتیک	توضیح	قابلیت کاربرد برای نانومواد
سطح زیر منحنی (AUC)	سطح زیر منحنی نمودار غلظت یک ماده در پلاسما در طول زمان است که مقدار کل ماده جذب‌شده توسط بدن را در یک دوره زمانی از پیش تعیین‌شده، نشان می‌دهد. (همچنین ممکن است برای بافت‌ها به کار رود، AUC بافتی)	برای پلاسما بسیار کم است، زیرا نانومواد به‌سرعت از خون زدایش می‌شوند. هنگامی که براساس غلظت‌های بافتی باشد، می‌تواند بیشتر مرتبط باشد.
فراهمی‌زیستی[۱]	کسری از یک دُز تجویزشده که به گردش سیستمیک راه می‌یابد یا در محل فعالیت فیزیولوژیکی در دسترس قرار می‌گیرد.	بسیار کم است. فراهمی‌زیستی نانومواد ممکن است براساس AUC پلاسمایی دشوار باشد. فراهمی‌زیستی می‌تواند بر اساس غلظت/مقادیر موجود در بافت‌ها محاسبه شود.
C_{max}	حداکثر (اوج) غلظت در خون (پلاسما/سرم) پس از تجویز یا حداکثر (اوج) دفع (در ادرار یا مدفوع) پس از تجویز.	به‌دلیل پاکسازی سریع خونی ممکن است برای NM مناسب نباشد.
پاکسازی	اندازه‌گیری کمّی سرعت زدایش ماده از خون، پلاسما یا یک بافت خاص در واحد زمان.	پاکسازی زیاد از خون، اما این یک مقدار معرف نیست. سرعت کم پاکسازی از بافت‌ها که بیشتر معرف پاکسازی کل بدن است.

جدول ۲- (ادامه)

پارامتر توکسیکوکینتیک	توضیح	قابلیت کاربرد برای نانومواد

کینتیک حذف	مرتبه صفر: حذف یک مقدار ثابت در واحد زمان از مقدار داروی موجود در موجود زنده. مرتبه اول: حذف کسر ثابت در واحد زمان برای مقدار داروی موجود در موجود زنده. حذف متناسب با غلظت دارو است.	ذرات با انحلال ضعیف در ریه از فضای هوای آلوئولار از طریق مرتبه اول به‌وسیله بالابرنده موکوسیلیاری نایژه‌ای حذف می‌شوند. برای فضای بینابینی ریه و سایر بافت‌ها مشخص نیست. به زیربند ۹-۴ نیز مراجعه کنید.
نیمه- عمر ($T_{1/2}$)	زمان لازم برای کاهش غلظت ماده مورد آزمون به نصف (غلظت اولیه) در یک بخش. این امر به‌طور معمول به غلظت پلاسما یا مقدار ماده موردآزمون در کل بدن اشاره دارد.	با توجه به آنکه عموما سریع از گردش خون ناپدید می‌شوند، کینتیک‌های پلاسمایی به سختی اطلاعاتی را در مورد کینتیک ذرات به‌دست می‌دهد. هنگامی که براساس غلظت بافتی است، می‌تواند مرتبط باشد.
پاکسازی کبدی	بخشی از کل پاکسازی ناشی از فعالیت آنزیم کبدی و دفع صفراوی است.	سرعت کم پاکسازی کبدی، احتمالاً نه توسط سوخت‌وساز بلکه به دلیل انحلال یا تغییر مکان است.
پاکسازی کلیوی	بخشی از پاکسازی کل به دلیل دفع از کلیه است.	مشخص نیست، حتی ممکن است اتفاق نیفتد.
T_{max}	زمان رسیدن به C_{max}	به C_{max} مراجعه کنید.
حجم توزیع (Vd)	حجم مایعی که لازم است تا حاوی مقدار داروی موجود در بدن با همان غلظت پلاسمایی باشد.	پارامتری که نشانه‌ای از توزیع در بافت‌ها را فراهم می‌کند، اما ممکن است به دلیل تصفیه سریع خون، یک نشانه انحرافی بدهد.

[1] Bioavailability

یادآوری- بسیاری از اطلاعات مربوط به NM بر اساس فلز، اکسید فلز و نانومواد کربنی است.

این بررسی اجمالی نشان می‌دهد که به جای پارامترهای کینتیکی ذکرشده در جدول ۲، پارامترهای مهم کینتیکی برای تعیین نانوذرات عبارتند از:

- درصد جذب؛

- درصد مقدار موجود در ارگان‌های مربوطه (حداقل کبد، طحال، ریه، مغز، کلیه، غدد لنفاوی در ورودی ارگان و مغز استخوان) در نقاط زمانی مختلف. هنگامی که مسئله توکسیکولوژیکی برای تأثیرات در این ارگان‌ها افزایش می‌یابد، ممکن است بافت‌های اضافی افزوده شوند، به‌عنوان مثال بیضه‌ها و تخمدان‌ها در صورت نگرانی از تأثیرات بر روی باروری؛

- برای نانوذرات آلی: شناسایی متابولیت‌ها و سطح متابولیت‌ها در هر ارگان مربوطه در نقاط زمانی مختلف؛

- سرعت حذف/تجمع از سطوح ارگانی، برداشته‌شده در نقاط زمانی مختلف پس از آخرین دُز.

علاوه‌براین، میزان انحلال در محیط‌های مربوطه نشانه‌ای از انحلال در بدن در طول زمان و در نتیجه وجود یون‌ها یا مولکول‌های بالقوه سمی و احتمال تجمع را فراهم می‌کند. به‌خصوص برای حل‌شدن آرام نانوذرات، وجود مواد یونی نیز لازم است تا در مطالعات توکسیکوکینتیک موردتوجه قرار گیرد.

در پایان، جدول ۳ فاکتورهایی را که می‌توانند نتیجه یک مطالعه کینتیک با نانوذرات را تحت‌تأثیر قرار دهند، به‌طور خلاصه بیان می‌کند، بنابراین لازم است هنگام طراحی چنین مطالعه‌ای این فکتورها به دقت موردبررسی قرار گیرند. خواص فیزیکی- شیمیایی ذکرشده در این جدول به‌طور کلی برای توکسیکوکینتیک تعیین‌کننده هستند، اما هنوز مشخص نیست که خواص فیزیکی- شیمیایی خاص تا چه اندازه بر روی فرآیند توکسیکوکینتیک تأثیر می‌گذارند و این تأثیر به چه روشی است. این امر به تحقیقات بیشتر و نظام‌مندتر نیاز دارد.

جدول ۳ـ عوامل مؤثر بر نتیجه مطالعات توکسیکوکینتیکی با نانوذرات

عامل	چگونگی تاثیر عامل‌ها در حالت کلی بر توکسیکوکینتیک نانوذرات
سرعت انحلال	هرچه سرعت انحلال بیشتر باشد، پتانسیل تجمع کاهش می‌یابد. لازم است تبدیل مولکول‌ها به یون‌های بالقوه سمی درنظر گرفته شود.
اندازه نانوذره	هنوز کاملاً واضح نیست، اما به نظر می‌رسد که ذرات کوچک‌تر به راحتی جذب می‌شوند و به‌راحتی از سدهای داخلی عبور می‌کنند.
شکل/ریخت‌شناسی	هنوز کاملاً مشخص نیست، اما به‌نظر می‌رسد که نسبت‌های منظری بالاتر به پایداری بیشتر در ریه منجر می‌شوند. در مقابل، شکل ممکن است بر سرعت انحلال نیز تأثیر بگذارد، زیرا ذرات سیمی شکل NiO تقریباً کامل حل می‌شوند درحالی‌که ذرات کروی شکل NiO این‌گونه نیستند. به‌نظر می‌رسد که سوخت‌وساز در CNTs تک‌دیواره و نه CNTs چنددیواره رخ می‌دهد، اما این موضوع هنوز تأیید نشده‌است.
بار سطحی	هنوز مشخص نیست، اما یک بارِ مثبت ممکن است از نظر تئوری با غشای سلولی با بار منفی پیوند آسان‌تری داشته باشد، شاید تسهیل‌کننده اندوسیتوز و در نتیجه دریافت و جذب سلولی باشد.
شیمی سطح	برخی از پوشش‌ها و لیگاندها می‌توانند منجر به شناسایی توسط گیرنده‌های غشایی شده و اندوسیتوز و در نتیجه جذب و دریافت سلولی را تسهیل کنند.

جدول ۳- (ادامه)

عامل	چگونگی تاثیر عامل‌ها در حالت کلی بر توکسیکوکینتیک نانوذرات
تاج پروتئینی	پروتئین‌های خاص (اوپسونین‌ها) فاگوسیتوز را افزایش می‌دهند و منجر به توزیع بیشتر در بافت‌های غنی از سلول‌های مونوسیتی مانند کبد و طحال می‌شوند. ترکیب‌بندی پروتئینی همچنین بر دریافت در سلول‌های دیگر و بنابر این به‌عنوان مثال بر جذب تأثیر می‌گذارد.
حساسیت روش آنالیزی	حساسیت کم می‌تواند منجر به ناچیز شماری و یا حتی عدم تشخیص، جذب و توزیع در بافت‌ها شود.
از دست رفتن نشانگر رادیواکتیو از نانوذره	هنگام استفاده از نشانگرهای رادیواکتیوی که از NP در موجود زنده جدا می‌شوند، بسته به نحوه رفتار نشانگر سست، هم تخمین بیش از حد و هم تخمین کمتر از حد معمول در جذب، سطح ارگانی، تجمع و حذف ممکن است نتیجه‌گیری شود.
حالت پراکنش	مخلوط‌هایی که پراکنش ضعیفی دارند، حاوی کلوخه‌ها/انبوهه‌های بزرگ‌تر و بیشتری هستند که انتظار می‌رود دُز رسیدن به آلوئول‌ها را کاهش دهند و برای تمام مسیرهای مواجهه منجر به جذب کمتری شوند.
سطح دُز	گزارش شده‌است که سطح دُز بالا منجر به ژله‌ای شدن در روده می‌شود و به تعبیری باعث می‌شود که NPs برای دریافت در دسترس نباشند. در ریه، سطوح دُز بالا می‌تواند منجر به اشباع ماکروفاژها (اضافه بار ریوی) شود و درصدی را که می‌تواند از طریق ماکروفاژها جذب شود، تغییر دهد.
دُز منفرد در برابر دُز مکرر	تجمع پس از تعیین دُز منفرد قابل‌تشخیص نیست و ممکن است تأثیرات ذرات جذب‌شده روی سازوکارهای دریافت نیز از دست برود.
دُز یکباره در برابر دُز پیوسته	دُز یکباره منجر به دُز بالای موقتی می‌شود و عواقب بالقوه‌ای که در بالا برای سطح دُز توضیح داده شده‌است، وجود دارند. در ریه، دُز یکباره (به‌عنوان مثال تزریق داخل نای) نمی‌تواند به‌طور کامل به عمق ریه برسد و گزارش شده‌است که منجر به تقسیم نامتوازن بار در لوب‌های ریوی می‌شود. بسته به این‌که کدام لوب آنالیز می‌شود، این امر می‌تواند منجر به تخمین کم یا زیاد بار ریوی شود. در روده، یک دُز یکباره (گاواژ) ممکن است به تاج پروتئینی متفاوت از دُز پیوسته منجر شود، به دلیل نوع غذایی که با یک دُز پیوسته مخلوط می‌شود و به‌دلیل این‌که یک دُز یکباره از محیط دستگاه گوارش فوقانی رد می‌شود.

پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

تعاریف مورداستفاده برگرفته از استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۴۸۰: سال ۱۳۹۵

- **جذب**[1]: فرایند(های) دریافت مواد به درون بافت یا بین بافت‌ها. جذب به ترکیب والد و همه متابولیت‌های آن برمی‌گردد.

-**تجمع (تجمع زیستی)**: افزایش مقدار یک ماده در طی زمان در داخل بافت‌ها (معمولاً بافت‌های چربی، به دنبال مواجهه مکرر). اگر ورودی یک ماده به بدن بیشتر از میزان دفع آن باشد، ماده در ارگانیسم تجمع یافته و ممکن است غلظت‌های سمی ماده حاصل شود.

- **ADME**: مخفف «جذب ، توزیع ، سوخت‌وساز و دفع» است.

- **AUC (سطح زیر منحنی غلظت- زمان پلاسما)**: مساحت زیر منحنی در یک نمودار غلظت ماده در پلاسما با گذشت زمان است که مقدار کل ماده جذب‌شده توسط بدن در یک دوره زمانی از پیش تعیین‌شده را نشان می‌دهد. در شرایط خطی، AUC (از زمان صفر تا بی‌نهایت)، صرف‌نظر از میزان جذب، متناسب با مقدار کل ماده جذب‌شده توسط بدن است.

- **اتورادیوگرافی (اتورادیوگرافی کل بدن)**[2]: بررسی کیفی و/یا کمی تمرکز بافتی یک ماده رادیواکتیو است. این روش از فیلم اشعه ایکس یا به‌تازگی تصویربرداری رقمی فسفری برای مشاهده مولکول ها یا بخشی از مولکول‌های نشان‌دارشده با رادیواکتیو استفاده می‌کند که تشعشع ساطع‌شده در ماده مورد بررسی را ثبت می‌کند. اتورادیوگرافی کمی کل بدن، در مقایسه با تشریح ارگان، ممکن است در تخمین توزیع آزمونه و ارزیابی بازیافت کلی و تجزیه ماده رادیواکتیو در بافت‌ها دارای مزایایی باشد. برای مثال ، یک امتیاز مهم این است که می‌تواند در مدل حیوانی رنگی به‌کار رود تا ارتباط احتمالی آزمونه با ملانین که می‌تواند به برخی مولکول‌های خاصی متصل شود، ارزیابی شود. هرچند، این روش درحالی‌که ممکن است بررسی کل بدن را در محل‌های ظرفیت- بالا و تمایل اتصال- پایین تسهیل کند، اما در تشخیص محل‌های هدف خاص همانند محل‌های اتصال‌گیرنده که در آن ثبات بالا و حساسیت زیاد برای ردیابی موردنیاز است، ممکن است محدود باشد. هنگامی که از اتورادیوگرافی استفاده می شود، آزمایش‌هایی که برای تعیین تعادل جرمی ترکیب تجویزشده طراحی شده‌اند می‌تواند به عنوان یک گروه جداگانه یا در یک بررسی جداگانه از آزمایش توزیع بافتی انجام شود، جایی‌که در آن تمام مواد دفع‌شده (که ممکن است شامل هوای خروجی نیز باشد) و کل لاشه همگن شده و به‌وسیله شمارش درخشش مایع موردسنجش قرار گیرند.

- **دفع صفراوی**[3]: دفع از طریق مجاری صفراوی.

1- Absorption
2- Autoradiography (Whole-body autoradiography)
3- Biliary excretion

-**تجمع زیستی**: به عبارت«تجمع» مراجعه کنید.

- **فراهمی‌زیستی**: کسری از یک دُز تجویزشده که به گردش سیستمیک می‌رسد یا در محل فعالیت فیزیولوژیکی قابل‌دسترس می‌شود. معمولاً، فراهمی‌زیستی یک ماده به ترکیب والد اشاره دارد، اما می‌تواند به متابولیت آن نیز اشاره داشته باشد. این فقط یک شکل شیمیایی از ماده را درنظر می‌گیرد. قابل توجه: فراهمی‌زیستی و جذب یکسان نیستند. تفاوت بین به‌عنوان مثال جذب خوراکی (یعنی وجود در دیواره روده و گردش سیاهرگ باب) و فراهمی‌زیستی (یعنی وجود در خون سیستمیک و در بافت ها) می‌تواند نتیجه تجزیه شیمیایی ناشی از سوخت‌وساز دیواره روده یا برگشت با انتقال تراوشی به مجزای روده یا سوخت‌وساز پیش سیستمیک در کبد به همراه سایر موارد باشد. (به مرجع [۱۰] کتابنامه مراجعه شود). فراهمی‌زیستی جزء سمی (ترکیب والد یا یک متابولیت) پارامتر مهمی در ارزیابی ریسک انسانی (برون‌یابی دُز زیاد به کم، برون‌یابی مسیر به مسیر) است برای انحراف یک مقدار فاصله از NOAEL یا BMD خارجی است (دُز به‌کاررفته). برای اثرات کبدی در تجویز خوراکی، جذب خوراکی کفایت می‌کند. هرچند، برای هر اثر دیگری به‌غیر از محل ورود، فراهمی‌زیستی به‌طور کلی یک پارامتر قابل‌اعتماد برای کاربرد بیشتر در ارزیابی ریسک است، نه جذب.

- **پایداری‌زیستی**: به عبارت «پایداری» مراجعه کنید.

- **تبدیل‌زیستی (معمولاً آنزیماتیک)**: تغییرشیمیایی یک ماده موردنظر به یک ماده شیمیایی متفاوت در داخل بدن. مترادف با «سوخت‌وساز» است.

- C_{max}**:** حداکثر (اوج) غلظت در خون (پلاسما/سرم) پس از تجویز یا حداکثر (اوج) دفع (از طریق ادرار یا مدفوع) پس از تجویز.

- **سرعت پاکسازی**: اندازه‌گیری کمّی سرعت حذف یک ماده از خون، پلاسما یا یک بافت خاص در واحد زمان است.

- **بخش**[1]: بخش (یا واحد) ساختاری یا بیوشیمیایی از بدن، بافت یا سلول که از بقیه قسمت‌ها جدا است.

- **مسیرهای سم‌زدایی**[2]: مجموعه‌ای از مراحلی که منجر به حذف مواد سمی از بدن می‌شود که یا با تغییر سوخت‌وساز و یا با دفع است.

- **توزیع:** پراکندگی یک ماده و مشتقات آن در بدن یک موجود زنده.

- **آنزیم‌ها/ایزوزیم‌ها**[3]: پروتئین‌هایی که واکنش‌های شیمیایی را کاتالیز می‌کنند. ایزوزیم‌ها آنزیم‌هایی هستند که واکنش‌های شیمیایی مشابه را کاتالیز کرده اما از نظر توالی اسیدهای آمینه متفاوت هستند.

1- Compartment
2- Detoxification pathways
3- Isozymes

- **پارامترهای آنزیماتیک**[1]: K_m ثابت مایکلئیس[2] و V_{max}: حداکثر سرعت.

- **دفع:** فرآیند (فرآیندهایی) که به وسیله آن یک ماده تجویزشده و/یا متابولیت‌های آن از بدن زدایش می‌شود.

- **برون‌زاد**[3]: القاشده یا تولیدشده در خارج از موجود زنده یا سیستم.

- **برون‌یابی:** استنباط یک یا چند مقدار ناشناخته بر اساس مقداری که شناخته شده یا مشاهده شده‌است.

- **نیمه- عمر** ($t_{1/2}$): مدت زمانی که غلظت آزمونه در یک بخش به نصف کاهش می‌یابد. نیمه- عمر به‌طور معمول به غلظت پلاسما یا مقدار آزمونه در کل بدن اشاره دارد.

- **القاء/القای آنزیم**[4]: سنتز آنزیم در پاسخ به یک محرک محیطی یا مولکول القاکننده.

- **هم‌خطی/کینتیک خطی**[5]: یک فرآیند از نظر کینتیکی زمانی خطی است که همه سرعت‌های انتقال بین بخش‌های آن با مقادیر یا غلظت‌های موجود متناسب باشد، یعنی مرتبه اول باشد. متعاقبا، حجم‌های پاکسازی و توزیع، و همچنین نیمه- عمرها ثابت است. غلظت های به‌دست آمده متناسب با سرعت تجویز دُز (مواجهه) است و تجمع به‌راحتی قابل‌پیش‌بینی است. خطی بودن /غیرخطی بودن را می‌توان با مقایسه پارامترهای مربوطه، به‌عنوان مثال AUC، بعد از دُز های مختلف یا پس از مواجهه با دُز واحد و مکرر ارزیابی کرد. عدم وابستگی به دُز می‌تواند نشانه‌ای از اشباع آنزیم‌های درگیر در سوخت‌وساز ترکیب باشد، افزایش در AUC پس از مواجهه مکرر در مقایسه با مواجهه منفرد ممکن است نشانه‌ای از مهار سوخت‌وساز باشد و کاهش AUC ممکن است نشانه‌ای برای القاء سوخت‌وساز باشد (به مرجع [11] کتابنامه مراجعه کنید).

- **تعادل جرمی**: محاسبه آزمونه‌ای که وارد سیستم شده و از آن خارج می‌شود.

- **تعادل ماده**[6]: به عبارت«تعادل جرم» مراجعه کنید.

- **سازوکار (حالت) سمیت/سازوکار (حالت) عملکرد:** سازوکار عمل به فعل و انفعالات خاص بیوشیمیایی اطلاق می‌شود که از طریق آن یک ماده اثر خود را ایجاد می‌کند. روش عمل به مسیرهای عمومی‌تری اطلاق می‌شود که منجر به سمیت یک ماده می‌شود.

- **سوخت‌وساز**: مترادف با «تبدیل زیستی».

- **متابولیت‌ها:** محصولات سوخت‌وساز یا فرآیندهای متابولیکی.

1- Enzymatic Parameters
2- Michaelis
3- Exogenously
4- Induction/enzyme induction
5- Linearity/linear kinetics
6- Material balance

- **نانومواد:** مواد با دامنه اندازه معمول بین ۱ نانومتر و ۱۰۰ نانومتر که یا در یک، دو یا سه بعد محدود می‌شوند یا دارای ساختار داخلی یا سطحی هستند.

- **جذب خوراکی:** درصد دُز ماده موردآزمون است که از محل تجویز (یعنی: دستگاه گوارش) جذب شده است. این پارامتر مهم را می‌توان برای شناخت کسری از آزمونه تجویزشده که به سیاهرگ باب و متعاقب آن کبد می‌رسد، به‌کار برد.

ضریب تفکیک[1]: همچنین به‌عنوان ضریب توزیع شناخته می‌شود. میزان حلالیت متمایز یک ماده در دو حلال است.

- **اوج مقادیر خونی (پلاسما/سرم)**[2]: بیشینه (اوج) غلظت در خون (پلاسما/سرم) پس از تجویز (همچنین به «C_{max}» مراجعه کنید).

-**پایداری (پایداری‌زیستی):** وجود طولانی مدت یک ماده (در یک سامانه زیستی) به دلیل مقاومت در برابر تجزیه/حذف.

- **بررسی- سراسری**: اطلاعات نقطه پایانی یک یا چند ماده شیمیایی که برای پیش‌بینی نقطه پایانی ماده شیمیایی هدف مورداستفاده قرار می‌گیرد.

- **اتورادیوگرافی میکروسکوپی گیرنده (یا میکروتورادیوگرافی گیرنده)**[3]: این روش ممکن است برای جستجوی واکنش زنوبیوتیک[4] با محل‌های بافتی خاص یا جمعیت‌های سلولی به‌عنوان مثال در مطالعه اتصال اتصال گیرنده یا روش عملکرد خاص که ممکن است به وضوح بالا و حساسیت بالا نیاز داشته باشد و فنون دیگری مانند اتورادیوگرافی کل بدن امکان‌پذیر نیست، مورداستفاده قرار گیرد.

- **راه تجویز**[5] **(خوراکی، تزریق داخل وریدی، پوستی، تنفسی و غیره):** به مسیرهایی که ماده به بدن تجویز می‌شود اطلاق می‌شود (برای مثال خوراکی با گاواژ، خوراکی با رژیم غذایی، پوستی، تنفسی، داخل وریدی و مانند آنها).

1- Partition coefficient
2- Peak blood (plasma/serum) levels
3- Receptor Microscopic Autoradiography (or Receptor Microautoradiography)
4- Xenobiotic
5- Route of administration

- **اشباع:** حالتی که به موجب آن یک یا چند فرآیند کینتیکی (برای مثال جذب، سوخت‌وساز یا پاکسازی) به میزان حداکثر هستند (به عبارت «اشباع‌شده» مراجعه شود).

- **حساسیت:** قابلیت یک روش یا دستگاه برای تمایز بین پاسخ‌های اندازه‌گیری که مقادیر مختلف یک متغیر موردنظر را نشان می‌دهد.

- **وضعیت پایدار سطوح خون (پلاسما)**[1]: وضعیت غیرمتعادل یک سیستم باز که در آن همه نیروهایی که در سیستم عمل می‌کنند دقیقاً با نیروهای مخالف متعادل شده‌اند، به‌طوری‌که همه اجزای آن غلظت ثابت دارند اگرچه ماده در سیستم گردش دارد.

- **مدل‌سازی سامانه‌ها**[2]**(توکسیکوکینتیک مبتنی بر فیزیولوژیک، مبتنی بر فارماکوکینتیک، فارماکوکینتیک مبتنی بر فیزیولوژیک، مبتنی بر زیست‌شناختی و غیره):** مدل خلاصه‌ای که از زبان ریاضی برای توصیف رفتار یک سامانه استفاده می‌کند.

- **بافت هدف:** بافتی که در آن اثرات سوء اصلی از یک ماده سمی بروز می‌کند.

- **توزیع بافتی**[3]: حرکت برگشت‌پذیر یک ماده از محلی در بدن به محلی دیگر. توزیع بافتی را می‌توان با جداسازی ارگان، همگن‌سازی، شمارش احتراقی و درخشش مایع یا با استفاده از اتورادیوگرافی کل بدن کیفی و یا کمی بررسی کرد. مورد اول برای به دست آوردن غلظت و درصد بازیافت از بافت‌ها و لاشه باقیمانده از حیوانات مشابه مفید است، اما ممکن است فاقد تفکیک‌پذیری برای همه بافت‌ها باشد و بازیابی کلی کمتر از ایده آل داشته‌باشد (کمتر از ٪ ۹۰). به تعاریف اخیر در بالا مراجعه کنید.

- $\mathbf{T_{max}}$: زمان رسیدن به C_{max} است.

- **توکسیکوکینتیک (فارماکوکینتیک)**[4]: مطالعه میزان جذب، توزیع، سوخت‌وساز و دفع مواد با گذشت زمان.

- **صحه‌گذاری مدل‌ها**[5]: فرآیند ارزیابی کفایت یک مدل برای توصیف داده‌های توکسیکوکینتیک در دسترس. مدل‌ها ممکن است از طریق مقایسه آماری و بصری به‌وسیله پیش‌بینی‌های مدل با مقادیر تجربی

1- Steady-state blood (plasma) levels
2- Systems Modelling
3- Tissue distribution
4- Pharmacokinetics
5- Validation of models

در برابر یک متغیر مستقل معمول (به‌عنوان مثال زمان) ارزیابی شوند. حوزه ارزیابی باید در رابطه با کاربرد موردنظر از یک مدل توجیه شود.

پیوست ب
(آگاهی‌دهنده)
روش‌های کمیت‌سنجی نانومواد، مزایا و چالش‌ها

جدول ب- ۱- روش‌های اندازه‌گیری ترکیب‌بندی یا غلظت نانواشیاء و انبوهه‌ها و کلوخه‌های آنها (NOAA)

روش	مخفف	ترکیب شیمیایی	غلظت	مزایا	محدودیت‌ها
طیف‌سنجی آکوستیکی			بله	احتیاج به رقیق‌سازی نمونه ندارد؛ برای نمونه‌های غلیظ قابل‌استفاده است. این روش برای مشخصه‌یابی سامانه‌های انبوهه‌شده و یا ساختاریافته مناسب است. اندازه‌گیری‌ها از هم‌زدن و/یا پمپ‌شدن نمونه تاثیر نمی‌پذیرد. روش مطلق؛ نیاز به کالیبر نمودن اندازه ندارد. تصدیق دستگاه با اندازه‌گیری آب با خواص آکوستیکی مشخص انجام می‌شود. نمونه‌ها با پایه حلال(غیرآبی) را می‌توان آنالیز کرد.	فقط برای ذرات حمل‌شده در مایعات قابل‌استفاده است. حد پایین اندازه تقریبا ۱۰ نانومتر؛ حد بالای اندازه تقریبا ۳ میلی‌متر. حد پایین کسر حجمی تقریبا ٪ ۰٫۱ است؛ حد بالای کسر حجمی تقریبا ٪۵۰ است.
طیف‌سنجی الکترونی اوژه (روبشی)[1]	AES	بله	بله	تفکیک‌پذیری فضایی بالا (کوچکتر از ۱ میکرومتر) و سطحی (معادل ۰/۱ نانومتر)[فضایی در این متن به صفحه افقی آنالیز (جهت x-y) و سطح به عمق اشاره دارد]. هنگامی‌که باریکه الکترونی روبشی استفاده شود، نقشه‌نگاری عنصری ممکن است. قابلیت پروفایل‌نگاری عمق هنگامی‌که با کندوپاش یونی ترکیب شوند. حساسیت آشکارسازی بالا؛ توانمندی آنالیز یک جزء از یک تک‌لایه سطحی را دارد.	آنالیزهای نمونه‌های نارسانا می‌تواند به دلیل اثر باردهی سطح ایجاد مشکل کند. آلودگی سطح می‌تواند آنالیز داده را پیچیده کند.

جدول ب- ۱ – (ادامه)

روش	مخفف	ترکیب شیمیایی	غلظت	مزایا	محدودیت‌ها
گرماسنجی روبشی تفاضلی[۲]	DSC	بله		کمترین آماده‌سازی نمونه موردنیاز است. روبش سریع مانع از تجزیه مواد در دماهایی بالا (روبش در ۴۰۰ درجه سلسیوس بردقیقه و سریع‌تر) می‌شود. محدوده‌های دمایی وسیع است. اندازه‌گیری‌ها در اتمسفرهای مختلف قابل انجام است. به‌صورت کیفی می‌توان قدرت اتصال بین پرکننده نانویی و اپوکسی در نانوچندسازه‌ها (قوی یا ضعیف) را مشخصه‌یابی کرده و جزء بی‌شکل صلب[۳] (RAF) سامانه نانوچندسازه را بررسی می‌کند.	بسیاری از دستگاه‌های DSC نمی‌توانند در سرعت ۴۰۰ درجه سلسیوس بردقیقه روبش کنند یا داده را در آن سرعت‌ها جمع‌آوری کنند.
طیف‌سنجی اتلاف انرژی الکترون[۴]	EELS	بله		تفکیک‌پذیری فضایی از مرتبه اندازه باریکه الکترونی هر ماده جامدی می‌تواند آنالیز شود. آنالیز کمی امکان‌پذیر است. سیگنال‌ها حاوی اطلاعات شیمیایی هستند. اطلاعات مستقیم از ساختار جامدات و حالت اکسایش عناصر می‌تواند به‌دست آید.	نیاز به نمونه‌های بسیار نازک کمتر از ۳۰ نانومتر است. شدت ضعیف برای تلفات انرژی بزرگتر از ۳۰۰ الکترون‌ولت. فقط با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) می‌توان انجام داد.
طیف‌سنجی پرتوایکس بر براساس تفکیک انرژی	EDX/EDS/ WDS	بله		EDS قابلیت کنترل نیمه کمی را دارد، یا با کنترل‌ها و آماده‌سازی مناسب نمونه، آنالیز کمی امکان‌پذیر می‌شود. EDS می‌تواند برای تولید نقشه‌های ترکیب‌بندی عنصری چندبعدی پیچیده استفاده شود. WDS نسبت به	نمونه‌ها باید به‌خوبی صیقل داده شده‌باشند و نماینده ماده توده باشند. ممکن است گاهی ضروری باشد که نمونه‌های نارسانا را با یک‌لایه نازک کربن، طلا، یا پلاتین، لایه نشانی کرد. برای کمی‌سازی با صحت بالا استانداردها ممکن است موردنیاز

جدول ب- ۱ – (ادامه)

روش	مخفف	ترکیب شیمیایی	غلظت	مزایا	محدودیت‌ها
				EDS برای عناصر با عدد اتمی پایین حساس‌تر است و توانایی آنالیز کمی را دارد.	باشند.
جزءجزء کردن با جریان میدان[۵]	FFF	بله	بله	نمونه به‌شدت بس‌پراکنده می‌توانند به جمعیت‌های مجزا تفکیک شوند. آشکارسازهای مختلفی می‌توانند به‌کار گرفته شوند مانند شکست‌سنج تفاضلی، جذب فرابنفش/مرئی، فلورسانس، پراکنش نور پویا، پراکنش نور ایستای چندزاویه‌ای، یا طیف‌سنج پلاسمای جفت‌شده القایی- جرمی.	حد پایینی اندازه وابسته به چگالی ذرات و روش FFF مورداستفاده است ولی به‌طورمعمول از پنج نانومتر تا دو نانومتر است. این اندازه را به‌دقت می‌توان با کالیبراسیون، زمان ثبت یا با آشکارسازی ثانویه تعیین کرد. توزیع‌های که در محدوده مقیاس نانومتر تا یک میکرومتر هستند را نمی‌توان به‌طور مناسب جدا کرد، با شویش ذرات بزرگتر از یک میکرومتر جدا می‌شوند. نمونه باید در محیط مایع پراکنده شود.
طیف‌سنجی فلورسانس[۶]	FL		بله	روش حساس، پایین‌تر از سطح فلوئوروفور منفرد. روش سریع برای اندازه‌گیری‌های کیفی. سازگار با اشکال مختلف نمونه‌ها. حساس به تغییرات اندازه و شکل نانوشیء.	برای بعضی نمونه‌ها تداخل حاصل از تداخل فلورسانس پس‌زمینه برای برخی از نمونه‌ها. برای اندازه‌گیری کمی، زمان‌بر بوده و نیازمند استانداردهای کالیبراسیون است. برای اندازه‌گیری‌های کمی نانواشیاء اغلب اصلاحاتی در پراکنش موردنیاز است.
طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه[۷]/ تصویربرداری	FTIR	بله		آنالیز ترکیب‌بندی مخلوط‌های شیمیایی در فاز جامد یا گازی می‌تواند تعیین شود. بازده بالا، نسبت سیگنال به نوفه بالا و دقت بالای طول‌موجی. نمونه‌ها می‌توانند یا در دمای محیط (در هوای پاکسازی‌شده) باشند یا در	به‌دلیل حساسیت این روش به آب، برای مشخصه‌یابی فاز آبی مناسب نیست. این روش به دی‌اکسیدکربن حساس است و باید برای خروج گازهای آب و دی‌اکسیدکربن تجهیزات پاکسازی شوند. به‌دلیل پیچیدگی طیفی، برای

جدول ب- ۱ – (ادامه)

روش	مخفف	ترکیب شیمیایی	غلظت	مزایا	محدودیت‌ها
				شرایط فرامحیطی، مانند خلاء بسیار بالا، دمای بسیار پایین، فشار بالا و دمای بالا باشند. معمولا غیرمخرب است و نمونه نیاز به آماده‌سازی زیادی ندارد. غیرحساس به نور مزاحم. عمق نفوذ بالا؛ می‌تواند برای طیف‌گیری نیم‌رساناهای با کاف نوار (گاف انرژی) پایین هم استفاده شود.	تعیین نوار[۸] مناسب به کاربران باتجربه و دسترسی به کتابخانه طیفی نیاز است.
پلاسمای جفت شده القایی- طیف‌سنجی جرمی	ICP-MS	بله	بله	آنالیز با حساسیت بالا- حدود آشکارسازی برای اکثر عناصر از مرتبه نانوگرم بر لیتر (نانوگرم بر کیلوگرم) یا کمتر است. امکان آنالیز چند عنصری. امکان شناسایی عناصر و تعیین کمی آن معمولا در کمتر از یک دقیقه. محدوده دینامیک خطی گسترده با هشت مرتبه بزرگی (در حالت عادی). امکان ارایه اطلاعات ایزوتوپی. امکان کالیبراسیون رقیق‌سازی ایزوتوپ. امکان تمایز آنالیت‌های ذره‌ای و محلول.	تداخل طیفی زمانی رخ می‌دهد که دستگاه نمی‌تواند بین طیف حاصل از یون اندازه آنالیت و طیف مواد همراه با آنکه دارای همان نسبت اسمی جرم با بار است، تمایز قائل شود. تداخل‌های یونی مولکولی اغلب می‌توانند توسط سل‌های واکنش/برخورد کاهش یابد؛ از هم‌بارهای عنصری اجتناب شود. آلودگی در نمونه‌های شاهد (اسید، آب، و غیره) در برخی موارد می‌توانند کمی‌سازی و شمارش را دچار محدودیت کنند. درصورتی‌که آنالیز مقادیر بسیار کم موردنظر باشد، استفاده از شناساگرهای با خلوص بالا و محیط آزمایشگاهی تمیز ضروری است. درصورتی‌که توزیع اندازه‌های ENM برای نانوذرات تک‌ایزوتوپی فلزی زیر ۱۰ نانومتر باشد، ICP-MS در حالت تک‌ذره ممکن است روش مناسبی برای تعیین تعداد ذرات و

جدول ب- ۱ – (ادامه)

روش	مخفف	ترکیب شیمیایی	غلظت	مزایا	محدودیت‌ها
					غلظت جرمی آنها نباشد. جفت نمودن ICP-MS با تغییر جزءجزء کردن با شارش میدان جریان (FFF) یا سایر روش‌های جداسازی این محدودیت را برطرف خواهد کرد. نمونه باید در مایع پراکنده شود. ذراتی که اندازه‌شان کوچکتر از حدآشکارسازی دستگاه باشد، به‌عنوان یون شناسایی می‌شوند. درحالتی که هیچ اطلاعات اولیه‌ای در مورد اندازه ذرات و میزان غلظت عددی آنها در نمونه دردسترس نباشد، آنالیزهای چندگانه ضروری است.
کروماتوگرافی مایع- طیف‌سنجی جرمی[۹]	LC-MS	بله	بله	به‌طورمعمول در اکثر آزمایشگاه‌ها برای کاربردهای متنوعی استفاده می‌شود. بسته به نیازهای کاربردی، طیف‌سنج‌های جرمی گوناگونی به‌عنوان آشکارساز در دسترس هستند.	فقط مواد آلی را آشکارسازی می‌کند. فقط مایعات/پراکنش‌ها؛ هیچ جامد یا گازی قابل آنالیز نیست. بهترین جداسازی، مستلزم فرآیند بهینه‌سازی پیچیده‌ای است.
طیف‌سنجی جذب نور[۱۰]	UV/Vis/NIR	بله	بله	آنالیز فرابنفش/مرئی جهت ارایه پاسخ فقط به چند ثانیه نیاز دارد. آنالیز محدوده وسیعی از غلظت با تغییر طول راه نمونه. در دستگاه‌های پیشرفته امکان کمی‌سازی وجود دارد. آماده‌سازی کم برای نمونه موردنیاز است یا به آماده‌سازی نیازی نیست. نیاز به تعمیر و نگهداری زیادی ندارد. برای اندازه‌گیری	برای پراکندگی ممکن است اصلاحاتی نیاز داشته باشد. نمونه‌های جامد نیاز به لوازم جانبی بازتابی دارند. مجموعه گسترده‌ای از لوازم جانبی وجود دارد که چندین حالت اندازه‌گیری بازتابی را میسر می‌کند. این شامل بازتاب نسبی، مطلق و پراکنده‌شده نیز می‌شود. حالت واقعی بازتابش موردنیاز توسط آنالیزهای خاصی تعیین شود.

جدول ب- ۱ – (ادامه)

روش	مخفف	ترکیب شیمیایی	غلظت	مزایا	محدودیت‌ها
				ویژگی‌ها در حالت مایع و جامد همانند اندازه‌گیری پراکنش وابسته به زاویه، امکانات گسترده‌ای در دسترس است. خواص جذب برای برخی از نانواشیاء منتج به اطلاعاتی درمورد اندازه ذرات خواهد شد.	
طیف‌سنجی رامان[11]/ تصویربرداری		بله		قابلیت آنالیز شیمیایی مخلوط‌های پیچیده. غیرحساس به آب، بنابراین مناسب برای مشخصه‌یابی نانواشیاء در فاز آبی. مناسب برای اندازه‌گیری‌های درجا در حالت مایع، بخار و جامد و تحت شرایط محیطی متعارف یا غیرمتعارف مانند خلاء خیلی بالا، دمای بسیار پایین، فشار بالا، دمای بالا یا تحت سوگیری الکتریکی به یک‌طرف در یک میدان مغناطیسی قوی، مناسب است. معمولا غیرمخرب بوده و نیاز به آماده‌سازی کم دارد. دستگاه‌های قابل‌حمل میدانی بر پایه الیاف نوری کوچک به‌صورت تجاری در دسترس است. در میکروسکوپ رامان هم‌کانون، طیف می‌تواند از حجم بسیار کوچکی، برای مثال میکرومتر مکعب، جمع‌آوری شود.	پراکنش رامان بسیار ضعیف است و می‌تواند گاهی توسط فلورسانس ناشی از ناخالصی‌های کم در نمونه از بین برود. پیچیدگی طیفی پراکنش رامان اغلب نیاز به کاربر مجرب دارد که دسترسی به کتابخانه طیفی برای تعیین پیوند مناسب را داشته باشد.
				محدوده گسترده بزرگنمایی.	ممکن است نیاز باشد قبل از

جدول ب- ۱ – (ادامه)

روش	مخفف	ترکیب شیمیایی	غلظت	مزایا	محدودیت‌ها
میکروسکوپ الکترونی روبشی	SEM	بله		عمق میدان بزرگ با بهترین تفکیک‌پذیری برای زیر یک نانومتر. کانون ثابت، به این معنی که با تغییر در بزرگنمایی، فاصله کانونی تغییر نمی‌کند. تصویربرداری دو و سه‌بعدی و توپوگرافی با جزییات زیاد. سریع، تکمیل تصویربرداری و آنالیز اغلب در طی چنددقیقه. عملکرد فرود الکترون کم انرژی یا فشار گاز پایین اطراف آزمونه تصویربرداری و اندازه‌گیری نمونه‌های نارسانای الکتریکی را امکان‌پذیر می‌سازد. گاز با فشار پایین اطراف آزمونه امکان حکاکی در مقیاس نانومتری و رسوب مواد را فراهم می‌سازد. با دستگاه‌های مجهز ویژه، آزمونه‌های هیدراته شده، حتی نمونه‌های زنده را نیز می‌توان در فشار بیش از ۶۰۰ پاسکال موردآزمون قرار داد. دمای نمونه می‌تواند از ۷۰ کلوین تا بالای ۱۰۰۰ کلوین متغیر باشد و دستکاری آزمونه در مقیاس نانو امکان‌پذیر است. حالت‌های تصویری مختلف، اطلاعات متفاوتی را ارایه می‌دهند، برای مثال، تصویربرداری الکترون برگشتی حساس به ترکیب‌بندی[۲]،	آزمون نمونه‌های نارسانا با یک لایه نازک کربن لایه‌نشانی شود. دستگاه اندازه‌گیری ممکن است نسبتا بزرگ باشد و نیاز است تا در مکانی مستقر شود که اندازه میدان الکترومغناطیسی و تداخلات مکانیکی در آن محیط به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کم باشد و ممکن است به سیستم گردش آب‌خنک کننده نیاز باشد. برای کار با میکروسکوپ، آموزش تخصصی لازم است، همچنین فرآیندهای آماده‌سازی نمونه، و تشخیص و کمینه‌کردن عیوب ناخواسته مربوط به آماده‌سازی نمونه نیاز به آموزش دارد. در خلا کار می‌کند، که در آن نیاز است که نمونه‌های جامد به اندازه کافی کوچک باشند تا در داخل محفظه خلاء جای‌گیرند. تابش‌دهی الکترونی می‌تواند نمونه را تغییر دهد. ممکن است اندازه‌گیری‌های مربوط به ذرات ریز دارای عدم قطعیت‌های اندازه‌گیری زیاد باشند. ممکن است تشخیص بین ذرات کلوخه و انبوهه دشوار باشد. هنگام استفاده از پراش بس‌پراکنده الکترونی فقط سطوح صیقل داده‌شده می‌توانند موردآزمون قرار گیرند. هنگام استفاده از پراش بس‌پراکنده الکترونی، تعیین بلورینگی فازها با قدرت تفکیک‌پذیری کمتر از ۱۰

جدول ب- ۱ – (ادامه)

روش	مخفف	ترکیب شیمیایی	غلظت	مزایا	محدودیت‌ها
				تصویربرداری الکترونی ثانویه حساس به توپوگرافی. استانداردهای کالیبراسیون تجاری برای (طلا و نقره) برای اندازه دردسترس است. هنگام استفاده از پراش بس‌پراکنده الکترونی، به‌شدت به جهت‌گیری حساس است. هنگام استفاده از پراش بس‌پراکنده الکترونی، از طریق نوع بلور، شناسایی فازی ممکن است.	نانومتر است (سطح مقطع صیقلی نمونه حاوی نانواشیاء مورد آزمون قرار می‌گیرد). برای توزیع اندازه ذره، نیاز است تعداد نسبتا زیادی از تصاویر غیروابسته جمع‌آوری شود تا یک نماینده آماری از نمونه مرتبط به‌دست آید.
طیف‌سنجی جرمی یون ثانویه[۱۳]	SIMS		بله	شناسایی عناصر با مقادیر بسیار کم تا ۲۰۰۰ دالتون با عبوری بزرگتر از ٪ ۱۰، باحساسیت بالاتر از یک قسمت در یک میلیون. (دستیابی به) توزیع عنصری سه‌بعدی با تفکیک‌پذیری عمقی ۱۰ نانومتر در حالت تهیه پروفایل عمقی. (دستیابی به) اطلاعات با جزئیات در مورد نسبت ایزوتوپ شیمیایی، مورداستفاده برای کمی‌سازی دقیق (قابلیت تکرارپذیری نقطه‌به‌نقطه (۱ ثانیه): ۰/۴ بر مایل؛ خطای درونی میانگین (۱ ثانیه): ۰/۳ بر مایل). تصویربرداری شیمیایی از سطوح با تفکیک‌پذیری فضایی حدود ۵۰۰ نانومتر. تهیه پروفایل عمق (مواد) غیرآلی با تفکیک‌پذیری عمق حدود ۱۰	نمونه‌های تحت خلاء آنالیز می‌شوند. آماده‌سازی برای برخی از نمونه‌ها (جاسازی در رزین‌ها و صیقل دادن). آماده سازی نمونه در زمان کاربرد TOF-SIMS لزوما موردنیاز نیست. تعداد عناصر پایش‌شده هم‌زمان می‌توانند محدود شوند، اما یک آنالیزگر TOF توانایی پایش صدها و هزاران یون را برحسب m/e (نسبت جرم به بارالکتریکی) دارد. درنظر گرفته نشدن یک روش آنالیز توده (این روش آنالیز موضعی است). برای به‌دست‌آوردن اطلاعات نانو، شکل، ماده همگن لازم است. برای جلوگیری از آلودگی نمونه حین جابه‌جایی آن مراقبت بسیاری لازم است.

جدول ب- ۱ – (ادامه)

روش	مخفف	ترکیب شیمیایی	غلظت	مزایا	محدودیت‌ها
				نانومتر. NanoSIMS اصطلاحی است که بر استفاده از یک باریکه یونی با ابعاد لکه خیلی کوچک (کمتر از ۵۰ نانومتر) برای ایجاد آنالیزهای با تفکیک‌پذیری فضایی بالا دلالت دارد.	
پراکنش نور ایستا[۱۴]	SLS/SMLS		بله	مناسب برای هواسُل‌ها (فقط روش SLS) و همچنین ذرات پراکنده در مایع. محدوده دینامیکی بسیار وسیع، از ده‌ها نانومتر تا چندین میلی‌متر. امکان اندازه‌گیری قرائت مستقیم را دارد. توانایی اندازه‌گیری وابسته به زمان است. روش‌های اجرایی مدون برای تضمین کیفیت. آنالیز وابسته به زمان امکان‌پذیر است. در روش SMLS، معمولا نیاز به آماده‌سازی نمونه نیست (یعنی برای نمونه‌های بسیار غلیظ نیاز به رقیق‌سازی نیست). در روش SMLS، هنگامی‌که با فناوری روبشی جفت می‌شود، حساس به تغییرات در حالت پراکنش است (به‌عنوان‌مثال انبوهه، کلوخه، و ته‌نشست).	ممکن است خواص نوری (ضریب شکست) ذرات و محیط تعلیق‌کنندگی برای کاربردهای آنالیزهای نظری ویژه (برای مثال RGD) موردنیاز باشد. ممکن است روش SLS جوابگوی آنالیز ذرات با جذب بالا (برای مثال نانوذرات فلزی همراه با اثرات تشدید پلاسمون سطحی[۱۵]) نباشد. محاسبه اندازه با فرض شکل ذرات کروی انجام می‌شود. اگر ضریب شکل مشخص باشد، می‌تواند در آنالیز RGD مشارکت داده شود یا برای تبدیل Rg به شکل یک مدل تعریف‌شده استفاده شود (برای مثال، بیضی‌گون یا استوانه‌ای). در روش SLS بازه اندازه به‌وسیله طول‌موج منبع و بازه زاویه‌ای آشکارساز محدود می‌شود. با استفاده از آنالیز RGD یا تحلیل Guinier در طول‌موج لیزر هلیوم- نئون (۶۳۳ نانومتر)، Rg کوچکتر از حدود ۶۰ نانومتر می‌تواند به‌دست آید. حد بالای غلظت عددی منوط به همزمانی نقطه شروع

جدول ب- ۱ – (ادامه)

روش	مخفف	ترکیب شیمیایی	غلظت	مزایا	محدودیت‌ها
					است. درروش SMLS، کسر حجمی و ضرایب شکست برای محاسبه میانگین اندازه ذره موردنیاز هستند.
روش‌های برهم‌کنش نور- تک‌ذره‌ای[16]			بله	امکان دستیابی به تفکیک‌پذیری بالا. فرضیات توزیع اندازه موردنیاز نیست. اندازه‌گیری به‌صورت قرائت مستقیم انجام می‌شود. قابلیت اندازه‌گیری وابسته به زمان است. روش‌های اجرایی مدون برای تضمین کیفیت.	فقط قابلیت استفاده در نانوذرات حمل‌شده به‌وسیله هوا (هوابرد) یا مایع را دارد. حد پایین اندازه تقریبا ۶۰ نانومتر؛ حد بالای اندازه تقریبا ۱۰۰ نانومتر است. حد بالای غلظت عددی منوط به هم‌زمانی نقطه شروع است.
آنالیز گرما– وزن سنجی[17]	TGA	بله		قابل‌استفاده بودن در اتمسفرهای مختلف است. روبش: از حدود دمای محیط تا ۱۰۰۰ درجه سلسیوس. مطالعات هم‌دما در دمای ثابت برای زمان‌هایی از چند ثانیه تا چندین ساعت امکان‌پذیر است.	نمونه‌هایی بیش از ۱/۵ میلی‌گرم موردنیاز است. نمونه‌هایی که مرطوب هستند لازم است پیش از آنالیز خشک شوند.
میکروسکوپ الکترونی عبوری	TEM	بله		تصویربرداری با تفکیک‌پذیری ۷۰ پیکومتر با بهترین ابزارها وجود دارد. با استفاده از EDS و EELS می‌توان اطلاعات شیمیایی را به‌دست آورد. برای آنالیز شکل سه‌بعدی کامل می‌توان از توموگرافی (برش‌نگاری) استفاده کرد. تصویربرداری در مقیاس کوچکتر از نانومتر. آنالیز تصویر خودکار برای بهبود ارتباط آماری و جریان کار. دردسترس بودن استانداردهای	صرف زمان طولانی برای بدست آوردن آمارهای مناسب برای اندازه‌گیری‌های اندازه موردنیاز است. زمان و هزینه بالای تجهیزات و نگهداری. اساسا محدود به مواد با چگالی بالای الکترونی؛ مواد نرم فاقد تباین کافی هستند (مگر اینکه رنگ شوند) تخریب یا تغییر نمونه به‌وسیله باریکه الکترونی. کالیبراسیون بزرگ‌نمایی برای اندازه‌گیری‌های اندازه دقیق الزامی است. عموما قادر به تمایز

جدول ب- ۱ – (ادامه)

روش	مخفف	ترکیب شیمیایی	غلظت	مزایا	محدودیت‌ها
				کالیبراسیون تجاری طلا و نقره برای اندازه وجود دارد.	قائل‌شدن بین انبوهه، کلوخه و عیوب ناخواسته نیست. آماده‌سازی نمونه برای کسب نتایج خوب الزامی است. با تغییر سامانه عدسی‌ها ممکن است کالیبراسیون تغییر کند.
طیف‌سنجی فوتوالکترون پرتوایکس[۱۸]	XPS	بله	بله	عمق آنالیز از ۱ نانومتر تا ۱۰ نانومتر (بسته به نمونه) را دارد. ناحیه آنالیز می‌تواند به کوچکی ۱۰ نانومتر باشد. اطلاعات در مورد حالت و پیوند شیمیایی را می‌دهد. آشکارسازی همزمان الکترون‌های اوژه می‌تواند در شناسایی عنصری کمک کند.	آلودگی سطح می‌تواند آنالیز کمی و کیفی را پیچیده کند. تخریب سطح انواع خاص نمونه‌ها، ناشی از نوردهی طولانی‌مدت پرتو ایکس ممکن است. قادر به تشخیص هیدروژن و هلیوم نیست. شرایط خلاء بسیار بالا می‌تواند آنالیز انواعی از نمونه‌ها (که قابلیت آنالیز دارند) را محدود کند.

[1] Auger Electron Spectroscopy (scanning)(AES)
[2] Differential Scanning Calorimetry (DSC)
[3] Rigid Amorphous Fraction (RAF)
[4] Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS)
[5] Field Flow Fractionation (FFF)
[6] Fluorescence Spectroscopy (FL)
[7] Fourier Trans-form Infrared Spectroscopy (FTIR)
[8] Band
[9] Liquid Chromatography- Mass Spectroscopy (LC-MS)
[10] Optical Absorbtion Spectroscopy (UV/Vis/NIR)
[11] Raman Spectroscopy
[12] Backscattered
[13] Secondary Ion Mass Spectroscopy (SIMS)
[14] Static Light Scattering (SLS)
[15] Surface Plasmon Resonance
[16] Single Particle Light Interaction Methods
[17] Thermo-Gravimetric Analysis
[18] X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

کتاب‌نامه

[1] EMA. Guideline on the reporting of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling and simulation. 13 December 2018, EMA/CHMP/458101/2016, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). London, United Kingdom 2018. https: //www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-reporting-physiologically-based-pharmacokinetic-pbpk-modelling-simulation _en.pdf

[2] WHO. Characterization and application of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment. 2010

[۳] استاندارد ملی ایران- شماره ۲۱۴۸۰: سال ۱۳۹۵، آزمون سمیت مواد شیمیایی- بررسی توکسیکوکینتیک- راهنما.

[4] OECD. Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials. 2009

[5] Carlander U., Li D., Jolliet O., Emond C., Johanson G. Toward a general physiologically-based pharmacokinetic model for intravenously injected nanoparticles. *Nanomedicine* 2016, **11**, 625 -640

[6] The Royal Society & The Royal Academy of Engineering. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties: ISBN 0 85403 604 0, London, United Kingdom, 2004. https: //royalsociety .org/topics - policy/publications/2004/nanoscience -nanotechnologies/

[7] Asia Pacific Nanotechnology Forum. *Proceedings of the 3rd annual conference of the Asia Pacific Nanotechnology Forum: incorporating 2nd Shanghai international nanotechnology cooperation symposium*. Sydney, Asia Pacific Nanotechnology Forum,Inc.: Shanghai, China, 2005

[8] SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Risks). Modified opinion (after public consultation) on the appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. European Commission: Brussels, 2006

[9] SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Risks). Risk Assessment of Products of Nanotechnologies. consumers, European Commission: Brussels, 2009

[10] NIOSH (The National Institute for Occupational Safety and Health). Centers for Disease Control and Prevention, *Approaches to Safe Nanotechnology. Managing the Health and Safety Concerns Associated with Engineered Nanomaterials*; NIOSH: USA, 2009

[11] Semmler M., Seitz J., Erbe F., Mayer P., Heyder J., Oberdorster G., Kreyling W. G. Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal. Toxicol.* 2004, **16**, 453 - 459

[12] De Jong W. H., Hagens W. I., Krystek P., Burger M. C., Sips A. J., Geertsma R. E. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 2008, **29**, 1912-1919

[13] Landsiedel R., Fabian E., Ma-Hock L., van Ravenzwaay B., Wohlleben W., Wiench K., Oesch F. Toxico-/biokinetics of nanomaterials. *Archives of toxicology* 2012, **86** (7), 1021-1060

[14] Hougaard K. S., Campagnolo L., Chavatte-Palmer P., Tarrade A., Rousseau-Ralliard D., Valentino S., Park M. V., de Jong W. H., Wolterink G., Piersma A. H., Ross B. L., Hutchison G. R., Hansen J. S., Vogel U., Jackson P., Slama R., Pietroiusti A., Cassee F. R. A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* 2015, **56**, 118-140

[15] Li M., Al-Jamal K. T., Kostarelos K., Reineke J. Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles. *ACS Nano* 2010, **4** (11), 6303-6317

[16] Bessems J., Coecke S., Gouliarmou V., Whelan M., Worth A. *EURL ECVAM strategy for achieving 3Rs impact in the assessment of toxicokinetics and systemic toxicity*; JRC96418; EUR 27315 EN; ISBN 978-92-79-49070-5; Joint Research Centre, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2015

[17] Geraets L., Oomen A. G., Krystek P., Jacobsen N. R., Wallin H, Laurentie M., Verharen H.W., Brandon E. F., de Jong W. H. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol* 2014, **11**, 30

[18] Creton S., Saghir S. A., Bartels M. J., Billington R., Bus J. S., Davies W., Dent M. P., Hawksworth G. M., Parry S., Travis K. Z. Use of toxicokinetics to support chemical evaluation: Informing high dose selection and study interpretation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2012, **62**, 241-247

[19] Bessems J. G., & Geraets L. Proper knowledge on toxicokinetics improves human hazard testing and subsequent health risk characterisation. A case study approach. *Regul Toxicol Pharmacol* 2013, **67** (3), 325-334

[20] Creton S., Billington R., Davies W., Dent M. P., Hawksworth G. M., Parry S., Travis K. Z. Application of toxicokinetics to improve chemical risk assessment: implications for the use of animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009, **55** (3), 291-299

[21] Heringa M. B., Geraets L., van Eijkeren J. C., Vandebriel R. J., De Jong W. H., Oomen A. G. Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure, including toxicokinetic considerations. *Nanotoxicology* 2016, **10** (10), 1515-1525

[22] Russel W. M. S., & Burch R. L. *The Principles of Humane Experimental Technique* Methuen: 1959; p 238

[23] De Jong W. H., Van Der Ven L. T., Sleijffers A., Park M. V., Jansen E. H., Van Loveren H, Vandebriel R. J. Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. *Biomaterials* 2013, **34** (33), 8333-8343

[24] Arts J. H., Hadi M., Keene A. M., Kreiling R., Lyon D., Maier M., Michel K., Petry T., Sauer U. G., Warheit D., Wiench K., Landsiedel R. A critical appraisal of existing concepts for the grouping of nanomaterials. *Regul Toxicol Pharmacol* 2014, **70** (2), 492-506

[25] Oomen A. G., Bleeker E. A., Bos P. M., van Broekhuizen F., Gottardo S., Groenewold M., Hristozov D., Hund-Rinke K., Irfan M. A., Marcomini A., Peijnenburg W. J., Rasmussen K., Jimenez A. S., Scott-Fordsmand J. J., van Tongeren M., Wiench K.,

Wohlleben W., Landsiedel R. Grouping and Read-Across Approaches for Risk Assessment of Nanomaterials. *Int J Environ Res Public Health* 2015, **12** (10), 13415-13434

[26] ECHA. Appendix R.6-1 for nanomaterials applicable to the Guidance on QSARs and Grouping of Chemicals. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Version 1.0. 2017

[27] OECD. Toxicokinetics of manufactured nanomaterials: Report from the OECD expert meeting. OECD: Paris, France, 2016

[28] Kreyling W. G., Holzwarth U., Schleh C., Kozempel J., Wenk A., Haberl N., Hirn S., Schaffler M., Lipka J., Semmler-Behnke M., Gibson N. Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats: Part 2. *Nanotoxicology* 2017b, **11** (4), 443-453

[29] Lankveld D. P. K., Oomen A. G., Krystek P., Troost-De Jong A., Noorlander C. W., Van Eijkeren J. C. H., Geertsma R. E., De Jong W. H. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of differents sizes. *Biomaterials* 2010, **31**, 8350 – 8361

[30] Jones S. W., Roberts R. A., Robbins G. R., Perry J. L., Kai M. P., Chen K., Bo T., Napier M. E., Ting J. P., Desimone J. M., Bear J. E. Nanoparticle clearance is governed by Th1/Th2 immunity and strain background. *The Journal of clinical investigation* 2013, **123** (7), 3061-3073

[31]] Lin Z., Monteiro-Riviere N. A., Riviere J. E. A physiologically based pharmacokinetic model for polyethylene glycol-coated gold nanoparticles of different sizes in adult mice. *Nanotoxicology* 2016, **10** (2), 162-172

[32] Bachler G., von Goetz N., Hungerbuhler K. Using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling for dietary risk assessment of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles. *Nanotoxicology* 2015, **9** (3), 373-380

[33] Blanco E., Shen H., Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology* 2015, **13**, 941-951

[34] Rosenblum D., Joshi N., Tao W., Karp J. M., Peer D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nature communications* 2018, **9** (1), 1410

[35] Morishita Y., Yoshioka Y., Takimura Y., Shimizu Y., Namba Y., Nojiri N., Ishizaka T., Takao K., Yamashita F., Takuma K., Ago Y., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Saito S., Matsuda T., Hashida M., Miyakawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. Distribution of Silver Nanoparticles to Breast Milk and Their Biological Effects on Breast-Fed Offspring Mice. *ACS Nano* 2016, **10** (9), 8180-8191

[36] Lefebvre D. E., Venema K., Gombau L., Valerio L. G. J., Raju J., Bondy G. S., Bouwmeester H., Singh R. P., Clippinger A. J., Collnot E. M., Mehta R., Stone V. Utility of models of the gastrointestinal tract for assessment of the digestion and absorption of engineered nanomaterials released from food matrices. *Nanotoxicology* 2015, **9**, 523 - 542

[37] EFSA. Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health. *EFSA Journal* 2018, **16** (7), 5327

[38] Tantra R., Bouwmeester H., Bolea E., Rey-Castro C., David C. A., Dogné J. M., Jarman J., Laborda F., Laloy J., Robinson K. N., Undas A. K., van der Zande M. Suitability of analytical methods to measure solubility for the purpose of nanoregulation. *Nanotoxicology Early Online* 2016, **10**, 173 - 184

[39] Shinohara N., Zhang G., Oshima Y., Kobayashi T., Imatanaka N., Nakai M., Sasaki T., Kawaguchi K., Gamo M. Kinetics and dissolution of intratracheally administered nickel oxide nanomaterials in rats. *Part Fibre Toxicol* 2017, **14** (1), 48

[40] Wick P., Manser P., Limbach L. K., Dettlaff-Weglikowska U., Krumeich F., Roth S., Stark W. J., Bruinink A. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicology letters* 2007, **168** (2), 121-131

[41] Yang S. T., Wang X., Jia G., Gu Y., Wang T., Nie H., Ge C., Wang H., Liu Y. Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. *Toxicology letters* 2008, **181** (3), 182-189

[42] Biener J., Wittstock A., Zepeda-Ruiz L. A., Biener M. M., Zielasek V., Kramer D., Viswanath R. N., Weissmuller J., Baumer M., Hamza A. V. Surface-chemistry-driven actuation in nanoporous gold. *Nat Mater* 2009, **8** (1), 47-51

[43] Gatoo M. A., Naseem S., Arfat M. Y., Dar A. M., Qasim K., Zubair S. Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *BioMed research international* 2014, **2014**, 498420

[44] Walkey C. D., Olsen J. B., Song F., Liu R., Guo H., Olsen D. W., Cohen Y., Emili A., Chan W. C. Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS Nano* 2014, **8** (3), 2439-2455

[45] Balogh L., Nigavekar S. S., Nair B. M., Lesniak W., Zhang C., Sung L. Y., Kariapper M. S. T., El-Jawahri A., Llanes M., Bolton B., Mamou F., Tan W., Hutson A., Minc L., Khan M. K. Significant effect of size on the in vivo biodistribution of gold composite nanodevices in mouse tumor models. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2007, **3** (4), 281-296

[46] Recordati C., De Maglie M., Bianchessi S., Argentiere S., Cella C., Mattiello S., Cubadda F., Aureli F., D'Amato M., Raggi A., Lenardi C., Milani P., Scanziani E. Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects. *Part Fibre Toxicol*. 2016, 13:12

[47] Buckley A., Hodgson A., Warren J., Guo C., Smith R. Size-dependent deposition of inhaled nanoparticles in the rat respiratory tract using a new nose-only exposure system. *Aerosol Science and Technology* 2016, **50** (1), 1-10

[48] Kreyling W. G., Semmler-Behnke M., Seitz J., Scymczak W., Wenk A., Mayer P., Takenaka S., Oberdorster G. Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhal Toxicol* 2009, **21**, 55 - 60

[49] Jiang W., Kim B. Y., Rutka J. T., Chan W. C. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol* 2008, **3** (3), 145-150

[50] Keene A. M., Peters D., Rouse R., Stewart S., Rosen E. T., Tyner K. M. Tissue and cellular distribution of gold nanoparticles varies based on aggregation/agglomeration status. *Nanomedicine* 2012, **7**, 199 -209

[51]] Zhao Y., Allen B. L., Star A. Enzymatic degradation of multiwalled carbon nanotubes. *J Phys Chem A.* 2011, **115**, 9536 - 9544

[52] Mager D. E., Mody V., Xu C., Forrest A., Lesniak W. G., Nigavekar S. S., Kariapper M. T., Minc L., Khan M. K., Balogh L. P. Physiologically based pharmacokinetic model for composite nanodevices: effect of charge and size on in vivo disposition. *Pharm Res.* 2012, **9**, 2534 - 2542

[53] Liu Q., Li H., Xia Q., Liu Y., Xiao K. Role of surface charge in determining the biological effects of CdSe/ZnS quantum dots. *Int J Nanomedicine* 2015, **10**, 7073 - 7088

[54] Lim J., Guo Y., Rostollan C. L., Stanfield J., Hsieh J. T., Sun X., Simanek E. E. A physiologically based pharmacokinetic model for polyethylene glycol-coated gold nanoparticles of different sizes in adult mice. *Nanotoxicology* 2008, **10**, 162 - 172

[55] Lankveld D.P.K, Rayavarapu R.G, Krystek P., Oomen A.G., Verharen H.W, Van Leeuwen T.G., De Jong W.H, Manohar S. clearance and tissue distribution of PEGylated and non-PEGylated gold nanorods after intravenous administration in rats. *Nanomedicine* 2011, **6**, 339 - 349

[56] Akiyama Y., Mori T., Katayama Y., Niidome T. The effects of PEG grafting level and injection dose on gold nanorod biodistribution in the tumor-bearing mice. *J Control Release* 2009, **139** (1), 81-84

[57] Cho W. S., Cho M., Jeong J., Choi M., Han B. S., Shin H. S., Hong J., Chung B. H., Jeong J., Cho M. H. Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010, **245**, 116 - 123

[58] Ding W., Minamikawa H., Kameta N., Shimizu T., Masuda M. Effects of PEGylation on the physicochemical properties and in vivo distribution of organic nanotubes. *Int J Nanomedicine* 2014, **9**, 5811-5823

[59] 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** (6), 428-437

[60] Mahon E., Salvati A., Baldelli Bombelli F., Lynch I., Dawson K. A. Designing the nanoparticle-biomolecule interface for "targeting and therapeutic delivery". *J Control Release* 2012, **161** (2), 164-174

[61] Morishita Y., Yasuko Y., Takimura Y., Shimizu Y., Namba Y., Nojiri N., Ishizaka T., Takao K., Yamashita F., Takuma K., Ago Y., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Saito S., Matsuda T., Hashida M., Miyakawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. ., Distribution of Silver Nanoparticles to Breast Milk and Their Biological Effects on Breast-Fed Offspring Mice. *ACS Nano* 2016, **10**, 8180- 8191

[62] Baer D. R. The Chameleon Effect: Characterization Challenges Due to the Variability of Nanoparticles and Their Surfaces. *Frontiers in chemistry* 2018, **6:** 145

[63] Lynch I., Cedervall T., Lundqvist M., Cabaleiro-Lago C., Linse S., Dawson K. A. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Advances in colloid and interface science* 2007, **134-135**, 167-174

[64] Cedervall T., Lynch I., Lindman S., Berggard T., Thulin E., Nilsson hDawson K. A., & Linse S. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify

exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007, **104**, 2050 - 2055

[65] Lara S., Alnasser F., Polo E., Garry D., Lo Giudice M. C., Hristov D. R., Rocks L., Salvati A., Yan Y., Dawson K. A. Identification of Receptor Binding to the Biomolecular Corona of Nanoparticles. *ACS Nano* 2017, **11** (2), 1884-1893

[66] Opanasopit P., Nishikawa M., Hashida M. Factors affecting drug and gene delivery: effects of interaction with blood components. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* 2002, **19** (3), 191-233

[67] Whitwell H., Mackay R. M., Elgy C., Morgan C., Griffiths M., Clark H., Skipp P., Madsen J. Nanoparticles in the lung and their protein corona: the few proteins that count. *Nanotoxicology* 2016, **10** (9), 1385-1394

[68] Milani S., Bombelli F. B., Pitek A. S., Dawson K. A., Radler J. Reversible versus irreversible binding of transferrin to polystyrene nanoparticles: soft and hard corona. *ACS Nano* 2012, **6** (3), 2532-2541

[69] Piella J., Bastus N. G., Puntes V. Size-Dependent Protein-Nanoparticle Interactions in Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles: The Emergence of the Protein Corona. *Bioconjugate chemistry* 2017, **28** (1), 88-97

[70] Masseyeff R., Gilli J., Bonet C., Zrihen H. Influence of age on the physiological serum alpha-fetoprotein levels in man and rat. *Tumor research* 1973, **8**, 30-35

[71]] Kolhar P., Anselmo A. C., Gupta V., Pant K., Prabhakarpandian B., Ruoslahti E., Mitragotri S. Using shape effects to target antibody-coated nanoparticles to lung and brain endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, **110**, 10753 - 10758

[72] Kreyling W. G., Holzwarth U., Haberl N., Kozempel J., Hirn S., Wenk A., Schleh C., Schäffler M., Lipka J., Semmler-Behnke M., Gibson N. Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intravenous injection in rats : Part 1. *Nanotoxicology* 2017a, **11**, 434 - 442

[73] Kreyling W. G., Holzwarth U., Schleh C., Kozempel J., Wenk A., Haberl N., Hirn S., Schäffler M., Lipka J., Semmler-Behnke M., Gibson N. Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intratracheal instillation in rats: Part 3. *Nanotoxicology* 2017c, **11**, 454 - 464

[74] Krystek P., Park M., De Jong W. h., Braakhuis h., Applications of Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry in Biodistribution Studies of (Engineered) Nanoparticles. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* 2013, Online 2006-2013

[75] Machado R. C., Amaral C. D. B., Schiavo D., Nóbrega J. A., Nogueira A. R. A. Complex samples and spectral interferences in ICP-MS: Evaluation of tandem mass spectrometry for interference-free determination of cadmium, tin and platinum group elements. *Microchemical Journal* 2017, **130**, 271-275

[76] Yan B., Kim S. T., Kim C. S., Saha K., Moyano D. F., Xing Y., Jiang Y., Roberts A. L., Alfonso F. S., Rotello V. M., Vachet R. W. Multiplexed imaging of nanoparticles in tissues using laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Am Chem Soc* 2013, **135** (34), 12564-12567

[77] Pauluhn J. Subchronic 13-week inhalation exposure of rats to multiwalled carbon nanotubes: toxic effects are determined by density of agglomerate structures, not fibrillar structures. *Toxicol Sci* 2010, **113** (1), 226-242

[78] Huang S., Peng H., Tjiu W. W., Yang Z., Zhu H., Tang T., Liu T. Assembling exfoliated layered double hydroxide (LDH) nanosheet/carbon nanotube (CNT) hybrids via electrostatic force and fabricating nylon nanocomposites. *The journal of physical chemistry. B* 2010, **114** (50), 16766-16772

[79] Deng X., Jia G., Wang H., Sun H., Wang X., Yang S., Wang T., Liu Y. Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. *Carbon* 2007, **45** (7), 1419-1424

[80] Czarny B., Georgin D., Berthon F., Plastow G., Pinault M., Patriarche G., Thuleau A., L'Hermite M. M., Taran F., Dive V. Carbon nanotube translocation to distant organs after pulmonary exposure: insights from in situ (14)C-radiolabeling and tissue radioimaging. *ACS Nano* 2014, **8** (6), 5715-5724

[81] Liu Z., Cai W., He L., Nakayama N., Chen K., Sun X., Chen X., Dai h., In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nat Nanotechnol* 2007, **2** (1), 47-52

[82] Marquis B. J., Love S. A., Braun K. L., Haynes C. L. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst* 2009, **134** (3), 425-439

[83] Tamura M., Inada M., Nakazato T., Yamamoto K., Endo S., Uchida K., Horie M., Fukui H., Iwahashi H., Kobayashi N., Morimoto Y., Tao H. A determination method of pristine multiwall carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation exposure by combustive oxidation–nondispersive infrared analysis. *Talanta* 2011, **84** (3), 802-808

[84] Leeuw T. K., Reith R. M., Simonette R. A., Harden M. E., Cherukuri P., Tsyboulski D. A., Beckingham K. M., Weisman R. B. Single-walled carbon nanotubes in the intact organism: near-IR imaging and biocompatibility studies in Drosophila. *Nano letters* 2007, **7** (9), 2650-2654

[85] Shinohara N., Nakazato T., Ohkawa K., Tamura M., Kobayashi N., Morimoto Y., Oyabu T., Myojo T., Shimada M., Yamamoto K., Tao H., Ema M., Naya M., Nakanishi J. Long-term retention of pristine multi-walled carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation. *J Appl Toxicol* 2016, **36** (4), 501-509

[86] Contado C., Argazzi R., Amendola V. Sedimentation field flow fractionation and optical absorption spectroscopy for a quantitative size characterization of silver nanoparticles. *J Chromatogr A.* 2016, **1471**, 178-185

[87] Kielbik P., Kaszewski J., Rosowska J., Wolska E., Witkowski B. S., Gralak M. A., Gajewski Z., Godlewski M., Godlewski M. M. Biodegradation of the ZnO:Eu nanoparticles in the tissues of adult mouse after alimentary application. 2017, *13*, 843 - 852

[88] Fazelirad H., & Taher M. A. Simultaneous column preconcentration of ultra trace amounts of heavy metals with nano-adsorbent in some environmental and biological samples. *Environ Technol.* 2016, **37**, 300 - 307

[89] Bahar S., Es'haghi Z., Nezhadali A., Banaei A., Bohlooli S. An innovative method for analysis of Pb (II) in rice, milk and water samples based on TiO2 reinforced caprylic acid hollow fiber solid/liquid phase microextraction. *Food Chem* 2017, **221**, 1904-1910

[90] Epaule C, Maksimenko A, Bastian G, Caron J, Desmaële D, Zouhiri F, Couvreur P, Doucet J X-ray microfluorescence for biodistribution studies of nanomedicines. *Int J Pharm* 2017, **531**, 343-349

[91] Geiser M., & Kreyling W. G. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 2010, **7**, 2

[92] Xie G., Wang C., Sun J., Zhong G. Tissue distribution and excretion of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology letters* 2011, **205** (1), 55-61

[93] Buchanan J. R., Burka L. T., Melnick R. L. Purpose and guidelines for toxicokinetic studies within the National Toxicology Program. *Environmental Health Perspectives* 1997, **105** (5), 468-471

[94] Semmler-Behnke M., Kreyling W. G., Lipka J., Fertsch S., Wenk A., Takenaka S., Schmid G., Brandau W., Biodistribution of 1.4- and 18-nm Gold Particles in Rats *Small* 2008, **12**, 2108 - 2111

[95] Gulson B., McCall M., Korsch M., Gomez L., Casey P., Oytam Y., Taylor A., McCulloch M., Trotter J., Kinsley L., Greenoak G. Small amounts of zinc from zinc oxide particles in sunscreens applied outdoors are absorbed through human skin. *Toxicol Sc* 2010, **118**, 140 - 149

[96] Osmond-McLeod M. J., Oytam Y., Kirby J. K., Gomez-Fernandez L., Baxter B., McCall M. J. Dermal absorption and short term biological impact in hairless mice from sunscreens containing zinc oxide nano- or larger particles. *Nanotoxicology* 2014, **8**, 72-84

[97] Ostrowski A., Nordmeyer D., Boreham A., Holzhausen C., Mundhenk L., Graf C., Meinke M. C., Vogt A., Hadam S., Lademann J., Rühl E., Alexiev U., Gruber A. D. Overview about the localization of nanoparticles in tissue and cellular context by different imaging techniques. *Beilstein J Nanotechnol.* 2015, **6**, 263 - 280

[98]] Summers H.D., Brown M. R., Holton M. D., Tonkin J. A., Hondow N., Brown A. P., Brydson R., Rees P. Quantification of nanoparticle dose and vesicular inheritance in proliferating cells. *ACS Nano* 2013, **7**, 6129 - 6137

[99] Mercer R. R., Scabilloni J. F., Hubbs A. F., Wang L., Battelli L. A., McKinney W., Castranova V., Porter D. W., Extrapulmonary transport of MWCNT following inhalation exposure *Part Fibre Toxicol.* 2013, **10***:* 38

[100] Chaurand P., Liu W., Borschneck D., Levard C., Auffan M., Paul E., Collin B., Kieffer I., Lanone S., Rose J., Perrin J. Multi-scale X-ray computed tomography to detect and localize metal-based nanomaterials in lung tissues of in vivo exposed mice. *Sci Rep.* 2018, **8**, 4408

[101] Peters R. J., van Bemmel G., Herrera-Rivera Z., Helsper H.P., Marvin H.J., Weigel S., Tromp P. C., Oomen A. G., Rietveld A. G., Bouwmeester H. Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles. *Journal of agricultural and food chemistry* 2014, **62** (27), 6285-6293

[102] [102] Heringa M. B., Peters R. J. B., Bleys R., van der Lee M. K., Tromp P. C., van Kesteren P. C. E., van Eijkeren J. C. H., Undas A. K., Oomen A. G., Bouwmeester H. Detection of titanium particles in human liver and spleen and possible health implications. *Part Fibre Toxicol* 2018, **15** (1), 15

[103] Degueldre C., Favarger P. Y., Wold S. Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode. *Analytica Chimica Acta* 2006, **555** (2), 263-268

[104] Montoro Bustos A. R., Petersen E. J., Possolo A., Winchester M. R. Post hoc Interlaboratory Comparison of Single Particle ICP-MS Size Measurements of NIST Gold Nanoparticle Reference Materials. *Analytical Chemistry* 2015, **87** (17), 8809-8817

[105] Hsiao I. L., Bierkandt F. S., Reichardt P., Luch A., Huang Y. J., Jakubowski N., Tentschert J., Haase A. Quantification and visualization of cellular uptake of TiO2 and Ag nanoparticles: comparison of different ICP-MS techniques. *J Nanobiotechnology* 2016, **14** (1), 50

[106] Li Q., Wang Z., Mo J., Zhang G., Chen Y., Huang C. Imaging gold nanoparticles in mouse liver by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Sci Rep* 2017, **7** (1), 2965

[107] Kolosnjaj-Tabi J., Just J., Hartman K. B., Laoudi Y., Boudjemaa S., Alloyeau D., Szwarc H., Wilson L. J., Moussa F. Anthropogenic Carbon Nanotubes Found in the Airways of Parisian Children. *EBioMedicine* 2015, **2** (11), 1697-1704

[108] Pele L. C., Thoree V., Bruggraber S. F., Koller D., Thompson R. P., Lomer M. C., Powell J. J. Pharmaceutical/food grade titanium dioxide particles are absorbed into the bloodstream of human volunteers. *Part Fibre Toxicol* 2015, **12**, 26

[109] Weigel S., Peters R., Loeschner K., Grombe R., Linsinger T. P. J. Results of an interlaboratory method performance study for the size determination and quantification of silver nanoparticles in chicken meat by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (sp-ICP-MS). *Analytical and bioanalytical chemistry* 2017, **409** (20), 4839-4848

[110] Jacobsen N. R., Møller P., Clausen P. A., Saber A. T., Micheletti C., Jensen K. A., Wallin H., Vogel U. Biodistribution of Carbon Nanotubes in Animal Models. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2017, **121** (Suppl 3), 30 - 43

[111] Krystek P., Tentschert J., Nia Y., Trouiller B., Noel L., Goetz M. E., Papin A., Luch A., Guerin T., de Jong W. h. Method development and inter-laboratory comparison about the determination of titanium from titanium dioxide nanoparticles in tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2014, **406** (16), 3853-3861

[112] Nia Y., Millour S., Noël L., Krystek P., de Jong W.H., Guérin T. Determination of Ti from TiO2 nanoparticles in biological materials by different ICP-MS instruments: Method validation and applications. *J Nanomed Nanotechnol* 2015, **6**, 269

[113] Park J. W., Oh J. H., Kim W. K., Lee S. K. Toxicity of citrate-coated silver nanoparticles differs according to method of suspension preparation. *Bull Environ Contam Toxicol* 2014, **93** (1), 53-59

[114] Leavens T. L., Monteiro-Riviere N. A., Inman A. O., Brooks J. D., Oldenburg S. J., Riviere J. E. In vitro biodistribution of silver nanoparticles in isolated perfused porcine skin flaps. *J Appl Toxicol* 2012, **32** (11), 913-919

[115] Gray E. P., Coleman J. G., Bednar A. J., Kennedy A. J., Ranville J. F., Higgins C. P. Extraction and analysis of silver and gold nanoparticles from biological tissues using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Environmental science & technology* 2013, **47** (24), 14315-14323

[116] van der Zande M., Vandebriel R. J., Groot M. J., Kramer E., Herrera Rivera Z. E., Rasmussen K., Ossenkoppele J. S., Tromp P., Gremmer E. R., Peters R. J., Hendriksen

P. J., Marvin H.J., Hoogenboom R. L., Peijnenburg A. A., Bouwmeester H. Sub-chronic toxicity study in rats orally exposed to nanostructured silica. *Part Fibre Toxicol* 2014, **11**, 8

[117] Koeneman B. A., Zhang Y., Westerhoff P., Chen Y., Crittenden J. C., Capco D. G. Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. *Cell biology and toxicology* 2010, **26** (3), 225-238

[118] Warheit D. B., Kreyling R., Levy L. S. Relevance of the rat lung tumor response to particle overload for human risk assessment-Update and interpretation of new data since ILSI 2000. *Toxicology* 2016, **374**, 42-59

[119] Hofmann T., Ma-Hock L., Teubner W., Athas J.-C., Neubauer N., Wohlleben W., Veith U., End N., Gröters S., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. Reduction of Acute Inhalation Toxicity Testing in Rats: The Contact Angle of Organic Pigments Predicts Their Suffocation Potential. *Applied In Vitro Toxicology* 2018, **4** (2), 220-228

[120] Slob W. Dose-response modeling of continuous endpoints. *Toxicol Sci* 2002, **66**, 298 – 312

[121] [121] Brun E., Barreau F., Veronesi G., Fayard B., Sorieul S., Chaneac C., Carapito C., Rabilloud T., Mabondzo A., Herlin-Boime N., Carriere M. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Part Fibre Toxicol* 2014, **11**, 13

[122] Zhang G., Shinohara N., Kano H., Senoh H., Suzuki M., Sasaki T., Fukushima S., Gamo M. Quantitative evaluation of the pulmonary microdistribution of TiO2 nanoparticles using X-ray fluorescence microscopy after intratracheal administration with a microsprayer in rats. *J Appl Toxicol* 2015, **35** (6), 623-630

[123] Zhang G., Shinohara N., Kano H., Senoh H., Suzuki M., Sasaki T., Fukushima S., Gamo M. Quantitative evaluation of local pulmonary distribution of TiO2 in rats following single or multiple intratracheal administrations of TiO2 nanoparticles using X-ray fluorescence microscopy. *J Appl Toxicol* 2016, **36** (10), 1268-75

[124] Zhang G., Shinohara N., Oshima Y., Kobayashi T., Imatanaka N., Kawaguchi K., Gamo M. Comparison of the local pulmonary distribution of nanoparticles administered intratracheally to rats via gavage needle or microsprayer delivery devices. *J Appl Toxicol* 2017, **37** (4), 502-507

[125] Braakhuis H.M., Cassee F. R., Fokkens P. H. B., de la Fonteyne L. J. J., Oomen A. G., Krystek P., de Jong W. H., van Loveren H., Park M. V. D. Z. Identification of the appropriate dose metric for pulmonary inflammation of silver nanoparticles in an inhalation toxicity study. *Nanotoxicology* 2016, 10 (1), 63-73

[126] Gordon S., Daneshian M., Bouwstra J., Caloni F., Constant S., Davies D. E., Dandekar G., Guzman C. A., Fabian E., Haltner E., Hartung T., Hasiwa N., Hayden P., Kandarova H., Khare S., Krug H. F., Kneuer C., Leist M., Lian G., Marx U., Metzger M., Ott K., Prieto P., Roberts M. S., Roggen E. L., Tralau T., van den Braak C., Walles H., Lehr C. M. Non-animal models of epithelial barriers (skin, intestine and lung) in research, industrial applications and regulatory toxicology. *ALTEX* 2015, **32** (4), 327-378

[127] Butz T., Reinert T., Pinheiro T., Moretto P., Pallon J., Kiss A. Z., Stachura J., D¸abro´s W., Stachura Z., Lekki J., Lekka M., Hunyadi J., Bıro T., Sticherling M., Van Vaeck L.,

Van Royen P., Surleve-Bazeille J. E. NANODERM, Quality of Skin as a Barrier to ultra-fine Particles, QLK4-CT-2002-02678 Final Report. 2007

[128] Monteiro-Riviere N. A., & Larese Filon F. Skin. In: Adverse effects of engineered nanomaterials, 1st Edition. exposure, Toxicology, and Impact on Human Health. Fadeel, B.;Pietroiusti, A.; Shvedova, A.A. (Eds), 2012, pp. 185-207, Academic Press, Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

[129] Monteiro-Riviere N., A., & Riviere J. E. Interaction of nanomaterials with skin: Aspects of absorption and biodistribution. *Nanotoxicology* 2009b, **3**, 188 - 193

[130] Sadrieh N., Wokovich A. M., Gopee N. V., Zheng J., Haines D., Parmiter D., Siitonen P. H., Cozart C. R., Patri A. K., McNeil S. E., Howard P. C., Doub W. H., Buhse L. F. Lack of Significant Dermal Penetration of Titanium Dioxide from Sunscreen Formulations Containing Nano- and Submicron-Size TiO2 Particles. *Tox Sc* 2010, **115**, 156 - 166

[131] Chaudhry Q. Opinion of the Scientific Committee on Consumer safety (SCCS) - Revision of the opinion on the safety of the use of titanium dioxide, nano form, in cosmetic products. *Regul Toxicol Pharmacol* 2015, **73** (2), 669-670

[132] Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application. *Biomaterials* 2011, **32** (11), 2713-2724

[133] Holmes A. M., Lim J., Studier H., Roberts M. S. Varying the morphology of silver nanoparticles results in differential toxicity against micro-organisms, HaCaT keratinocytes and affects skin deposition. *Nanotoxicology*. 2016, **10**, 1503 – 1514

[134] Larese Filon F D. A. F., Crosera M, Adami G, Renzi N, Bovenzi M, Maina G., Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* 2009, **255**, 33 - 37

[135] Vlachou E., Chipp E., Shale E., Wilson Y. T., Papini R., Moiemen N. S. The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: a study of systemic silver absorption. *Burns* 2007, **33**, 979 - 985

[136] Filon F. L., Mauro M., Adam G., Bovenzi M., Crosera M. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2015, **72**, 310 - 322

[137] Tak Y. K., Pal S., Naoghare P. K., Rangasamy S., Song J. M. Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter? *Sci Rep.* 2015, **5**, 16908

[138] Martinez-Argudo I., Sands C., Jepson M. A. Translocation of enteropathogenic Escherichia coli across an in vitro M cell model is regulated by its type III secretion system. *Cell Microbiol*. 2007, **9**, 1538 - 1546

[139] Kulkarni S. A., & Feng S. S. Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Pharm Res*. 2013, **30**, 2512 - 2522

[140] Braakhuis H. M., Kloet S. K., Kezic S., Kuper F., Park M. V. D. Z., Bellmann S., Van Der Zande M., Le Gac S., Krystek P., Peters R. J., Rietjens I. M., Bouwmeester H.

Progress and future of in vitro models to study translocation of nanoparticles. *Archives of toxicology* 2015, **89** (9), 1469-1495

[141] Imai S., Morishita Y., Hata T., Kondoh M., Yagi K., Gao J.-Q., Nagano K., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. Cellular internalization, transcellular transport, and cellular effects of silver nanoparticles in polarized Caco-2 cells following apical or basolateral exposure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2017, **484**, 543 - 549

[142] Walczak A. P., Hendriksen P. J. M., Woutersen R. A., Van Der Zande M., Undas A. K., Helsdingen R., Van Den Berg H.H.J., Rietjens I. M. C. M., Bouwmeester h., Bioavailability and biodistribution of differently charged polystyrene nanoparticles upon oral exposure in rats. *J. Nanopart. Res.* 2015, **17**, 231

[143] Hilgendorf C., Spahn-Langguth H., Regardh C. G., Lipka E., Amidon G. L., Langguth P. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J Pharma Sci* 2000, **89**, 63 - 75

[144] Lievin-Le Moal V., & Servin A. L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev* 2006, **19**, 315 - 337

[145] [145] Jani P. U., McCarthy D. E., Florence A. T. Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *International Journal of Pharmaceutics* 1994, **105** (2), 157-168

[146] [146] Hillery A. M., Jani P. U., Florence A. T. Comparative, quantitative study of lymphoid and non-lymphoid uptake of 60 nm polystyrene particles. *Journal of drug targeting* 1994, **2** (2), 151-6

[147] Jani P., Halbert G. W., Langridge J., Florence A. T. The uptake and translocation of latex nanospheres and microspheres after oral administration to rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 1989, **41** (12), 809-812

[148] Jani P., Halbert G. W., Langridge J., Florence A. T. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 1990, **42** (12), 821-826

[149] Jenkins P. G., Howard K. A., Blackhall N. W., Thomas N. W., Davis S. S., O'Hagan D. T. The quantitation of the absorption of microparticles into the intestinal lymph of Wistar rats. *International Journal of Pharmaceutics* 1994, **102** (1), 261-266

[150] Powell J. J., Faria N., Thomas-McKay E., Pele L. C. Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *Journal of autoimmunity* 2010, **34** (3), J226-233

[151] Hansen G. H., Rasmussen K., Niels-Christiansen L. L., Danielsen E. M. Endocytic trafficking from the small intestinal brush border probed with FM dye. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009, 297, G708–G715

[152] Des Rieux A F. V., Garinot M, Schneider Y-J, Preat V., Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. .*J Controlled Release* 2006, **116**, 1-27

[153] Shahbazi M. A., & Santos H.A. Improving oral absorption via drugloaded nanocarriers: absorption mechanisms, intestinal models and rational fabrication. *Curr Drug Metab* 2013, **14**, 28 - 56

[154] Kim H.J., & Ingber D. E. Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 2013, *5* (9), 1130-1140

[155] Taddei A., Giampietro C., Conti A., Orsenigo F., Breviario F., Pirazzoli V., Potente M., Daly C., Dimmeler S., Dejana E. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat. Cell Biol.* 2008, **10**, 923 - 934

[156] Hidalgo J., Raub T.J., Borchardt R.T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989, **96**, 736 - 749

[157] Briske-Anderson M. J., Finley J. W., Newman S. M. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997, **214**, 248 - 257

[158] Cartwright L., Poulsen M. S., Nielsen H.M., Pojana G., Knudsen L. E., Saunders M., Rytting E. In vitro placental model optimization for nanoparticle transport studies. *International Journal of Nanomedicine* 2012, **7**, 497-510

[159] Geys J., Coenegrachts L., Vercammen J., Engelborghs Y., Nemmar A., Nemery B., Hoet P. H. In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles: a preliminary study. *Toxicology letters* 2006, **160** (3), 218-226

[160] Oomen A. G., Rompelberg C. J., Bruil M. A., Dobbe C. J., Pereboom D. P., Sips A. J. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2003, **44**, 281 - 287

[161] Brandon E. F., Oomen A. G., Rompelberg C. J., Versantvoort C. H., van Engelen J. G., Sips A. J. Consumer product in vitro digestion model: bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2006, **44**, 161 -171

[162] McAllister M. Dynamic dissolution: a step closer to predictive dissolution testing? *Mol Pharm* 2010, **7**, 1374 - 1387

[163] Cockburn A., Bradford R., Buck N., Constable A., Edwards G., Haber B., Hepburn P., Howlett J., Kampers F., Klein C., Radomski M., Stamm hWijnhoven S., & Wildemann T. Approaches to the safety assessment of engineered nanomaterials (ENM) in food. *Food Chem Toxicol* 2012, **50**, 2224 - 2242

[164] Guhmann M., Thommes M., Gerber F., Pollinger N., Klein S., Breitkreutz J., Weitschies W. Design of biorelevant test setups for the prediction of diclofenac in vivo features after oral administration. *Pharm Res* 2013, **30**, 1483 - 1501

[165] Wang J., Zhou G., Chen C., Yu hWang T., Ma Y., Jia G., Gao Y., Li B., Sun J., Li Y., Jiao F., Zhao Y., Chai Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology letters* 2007, **168** (2), 176-185

[166] Kim Y. S., Kim J. S., Cho H.S., Rha D. S., Kim J. M., Park J. D., Choi B. S., Lim R., Chang H.K., Chung Y. H., Kwon I. H., Jeong J., Han B. S., Yu I. J. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 2008, **20** (6), 575-583

[167] [167] Park E. J., Bae E., Yi J., Kim Y., Choi K., Lee S. H., Yoon J., Lee B. C., Park K. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental toxicology and pharmacology* 2010, **30** (2), 162-168

[168] Wang Y., Chen Z., Ba T., Pu J., Chen T., Song Y., Gu Y., Qian Q., Xu Y., Xiang K., Wang H., Jia G. Susceptibility of young and adult rats to the oral toxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Small* 2013, **9** (9-10), 1742-1752

[169] Jones K., Morton J., Smith I., Jurkschat K., Harding A. H., Evans G. Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology letters* 2015, **233** (2), 95-101

[170] Yang S.-T., Wang T., Dong E., Chen X.-X., Xiang K., Liu J.-H., Liu Y., Wang h., Bioavailability and preliminary toxicity evaluations of alumina nanoparticles in vivo after oral exposure. *Toxicology Research* 2012, **1** (1), 69-74

[171] Sugibayashi K., Todo H., Kimura E. Safety evaluation of titanium dioxide nanoparticles by their absorption and elimination profiles. *The Journal of toxicological sciences* 2008, **33** (3), 293-298

[172] MacNicoll A., Kelly M., Aksoy H., Kramer E., Bouwmeester H., Chaudhry Q. A study of the uptake and biodistribution of nano-titanium dioxide using in vitro and in vivo models of oral intake. *Journal of Nanoparticle Research* 2015, **17** (2), 66

[173] Munger M. A., Radwanski P., Hadlock G. C., Stoddard G., Shaaban A., Falconer J., Grainger D. W., Deering-Rice C. E. In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. *Nanomedicine* 2014, **10**, 1 - 9

[174] Weaver L. T., Laker M. F., Nelson R. Intestinal permeability in the newborn. *Archives of disease in childhood* 1984, **59** (3), 236-241

[175] Catassi C., Bonucci A., Coppa G. V., Carlucci A., Giorgi P. L. Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 1995, **21** (4), 383-386

[176] ICRP. International Commission on Radiological Protection. Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. *Ann. ICRP* 1994, **24**, 1 - 3

[177] Cassee F. R., Muijser H., Duistermaat E., Freijer J. J., Geerse K. B., Marijnissen J. C. M., Arts J. H.E. Particle size-dependent total mass deposition in lungs determines inhalation toxicity of cadmium chloride aerosols in rats. *Archives of toxicology* 2002, **76**, 277 - 286

[178] ICRP. International Commission on Radiological Protection. Occupational intakes of radionuclides: Part 1. *Occupational intakes of radionuclides: Part 1.* 2015, *44* (2)

[179] Baker G. L., Gupta A., Clark M. L., Valenzuela B. R., Staska L. M., Harbo S. J., Pierce J. T., Dill J. A. Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C60 fullerene nanoparticles and microparticles. *Toxicol Sci* 2008, **101** (1), 122-131

[180] Yeh H.C., Schum G. M., Duggan M. T. Anatomic models of the tracheobronchial and pulmonary regions of the rat. *The Anatomical record* 1979, **195** (3), 483-492

[181] Lightowler N. M., & Williams J. R. Tracheal mucus flow rates in experimental bronchitis in rats. *British journal of experimental pathology* 1969, **50** (2), 139-149

[182] Pujalte I., Dieme D., Haddad S., Serventi A. M., Bouchard M. Toxicokinetics of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles after inhalation in rats. *Toxicology letters* 2017, **265**, 77-85

[183] Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W., Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 2004, **16** (6-7), 437-445

[184] Balasubramanian S. K., Poh K.-W., Ong C.-N., Kreyling W. G., Ong W.-Y., Yu L. E. The effect of primary particle size on biodistribution of inhaled gold nano-agglomerates. *Biomaterials* 2013, **34** (22), 5439-5452

[185] Lehnert B. E., & Morrow P. E. The initial lag in phagocytic rate by macrophages in monolayer is related to particle encounters and binding. *Immunol. Invest.* 1985b, **14**, 515 - 521

[186] Lehnert B. E., & Morrow P. E. Association of Fe-59 oxide with alveolar macrophages during alveolar clearance. *Exp. Lung Res.* 1985a, **9**, 1 - 16

[187] Naumann B. D., & Schlesinger R. B. Assessment of early alveolar particle clearance and macrophage function following an acute inhalation of sulfuric acid mist. *Assessment of early alveolar particle clearance and macrophage function following an acute inhalation of sulfuric acid mist* 1986, *11,* 13 - 33

[188] Shinohara N., Nakazato T., Tamura M., Endoh S., Fukui H., Morimoto Y., Myojo T., Shimada M., Yamamoto K., Tao H., Yoshida Y., Nakanishi J. Clearance kinetics of fullerene C(6)(0) nanoparticles from rat lungs after intratracheal C(6)(0) instillation and inhalation C(6)(0) exposure. *Toxicol Sci* 2010, **118** (2), 564-573

[189] Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives* 2005, **113** (7), 823-839

[190] Bermudez E., Mangum J. B., Wong B. A., Asgharian B., Hext P. M., Warheit D. B., Everitt J. I. Pulmonary Responses of Mice, Rats, and Hamsters to Subchronic Inhalation of Ultrafine Titanium Dioxide Particles. *Toxicological Sciences* 2004, **77** (2), 347-357

[191] Oyabu T., Morimoto Y., Hirohashi M., Horie M., Kambara T., Lee B. W., Hashiba M., Mizuguchi Y., Myojo T., Kuroda E. Dose-dependent pulmonary response of well-dispersed titanium dioxide nanoparticles following intratracheal instillation. *Journal of Nanoparticle Research* 2013, **15** (4), 1600

[192] Gregoratto D., Bailey M. R., Marsh J. W. Modelling particle retention in the alveolar-interstitial region of the human lungs. *J Radiol Prot* 2010, **30** (3), 491-512

[193] Stober W. POCK model simulations of pulmonary quartz dust retention data in extended inhalation exposures of rats. *Inhal Toxicol* 1999, **11** (4), 269-292

[194] Kuempel E. D., O'Flaherty E. J., Stayner L. T., Smith R. J., Green F. H., Vallyathan V. A biomathematical model of particle clearance and retention in the lungs of coal miners. *Regul Toxicol Pharmacol* 2001, **34** (1), 69-87

[195] Gregoratto D., Bailey M. R., Marsh J. W. Particle clearance in the alveolar-interstitial region of the human lungs: model validation. *Radiat Prot Dosimetry* 2011, **144** (1-4), 353-356

[196] Shinohara N., Oshima Y., Kobayashi T., Imatanaka N., Nakai M., Ichinose T., Sasaki T., Zhang G., Fukui H., Gamo M. Dose-dependent clearance kinetics of intratracheally administered titanium dioxide nanoparticles in rat lung. *Toxicology* 2014a, **325**, 1-11

[197] Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Lunts A., Kreyling W., Cox C. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A.* 2002, **65**, 1531 - 1543

[198] Nikula K. J., Avila K. J., Griffith W. C., Mauderly J. L. Sites of particle retention and lung tissue responses to chronically inhaled diesel exhaust and coal dust in rats and cynomolgus monkeys. *Environmental health perspectives* 1997, **105** Suppl 5, 1231-1234

[199] Nikula K. J., Vallyathan V., Green F. H., Hahn F. F. Influence of exposure concentration or dose on the distribution of particulate material in rat and human lungs. *Environmental health perspectives* 2001, **109** (4), 311-318

[200] Pauluhn J. Retrospective analysis of 4-week inhalation studies in rats with focus on fate and pulmonary toxicity of two nanosized aluminum oxyhydroxides (boehmite) and pigment-grade iron oxide (magnetite): the key metric of dose is particle mass and not particle surface area. *Toxicology* 2009, **259** (3), 140-148

[201] Pauluhn J., & Wiemann M. Siderite (FeCO(3)) and magnetite (Fe(3)O(4)) overload-dependent pulmonary toxicity is determined by the poorly soluble particle not the iron content. *Inhal Toxicol* 2011, **23** (13), 763-783

[202] Shinohara N., Oshima Y., Kobayashi T., Imatanaka N., Nakai M., Ichinose T., Sasaki T., Kawaguchi K., Zhang G., Gamo M. Pulmonary clearance kinetics and extrapulmonary translocation of seven titanium dioxide nano- and submicron materials following intratracheal administration in rats. *Nanotoxicology* 2015, **9** (8), 1050-1058

[203] Ismagilov Z. R., Shikina N. V., Mazurkova N. A., Tsikoza L. T., Tuzikov F. V., Ushakov V. A., Ishchenko A. V., Rudina N. A., Korneev D. V., Ryabchikova E. I. Synthesis of nanoscale TiO2 and study of the effect of their crystal structure on single cell response. *The Scientific World Journal* 2012, *2012*, Article ID 498345, 14 pages

[204] Silva R. M., Teesy C., Franzi L., Weir A., Westerhoff P., Evans J. E., Pinkerton K. E. Biological response to nano-scale titanium dioxide (TiO2): role of particle dose, shape, and retention. *J Toxicol Environ Health A* 2013, **76** (16), 953-972

[205] Porter D. W., Wu N., Hubbs A. F., Mercer R. R., Funk K., Meng F., Li J., Wolfarth M. G., Battelli L., Friend S., Andrew M., Hamilton R.Jr, Sriram K., Yang F., Castranova V., Holian A. Differential mouse pulmonary dose and time course responses to titanium dioxide nanospheres and nanobelts. *Toxicol Sci* 2013, **131** (1), 179-193

[206] Geiser M. Morphological aspects of particle uptake by lung phagocytes. *Microscopy research and technique* 2002, **57** (6), 512-522

[207] Ferin J., Oberdorster G., Penney D. P. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1992, **6** (5), 535-542

[208] Oberdorster G., Ferin J., Lehnert B. E. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environmental health perspectives* 1994, **102** Suppl 5, 173-179

[209] Elder A., Gelein R., Finkelstein J. N., Driscoll K. E., Harkema J., Oberdörster G. n. Effects of Subchronically Inhaled Carbon Black in Three Species. I. Retention Kinetics, Lung Inflammation, and Histopathology. *Toxicological Sciences* 2005, **88** (2), 614-629

[210] Hesterberg T. W., & Hart G. A. Lung Biopersistence and in Vitro Dissolution Rate Predict the Pathogenic Potential of Synthetic Vitreous Fibers. *Inhal Toxicol* 2000, **12** Suppl 3, 91-97

[211] Akiyama I., Ogami A., Oyabu T., Yamato H., Morimoto Y., Tanaka I. Pulmonary Effects and Biopersistence of Deposited Silicon Carbide Whisker After 1-Year Inhalation in Rats. *Inhalation Toxicology* 2007, **19** (2), 141-147

[212] Searl A., Buchanan D., Cullen R. T., Jones A. D., Miller B. G., Soutar C. A. Biopersistence and durability of nine mineral fibre types in rat lungs over 12 months. *The Annals of occupational hygiene* 1999, **43** (3), 143-153

[213] Poland C. A., Duffin R., Kinloch I., Maynard A., Wallace W. A., 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** (7), 423-428

[214] Morrow P. E. Dust overloading of the lungs: update and appraisal. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992, **113** (1), 1-12

[215] Sung J. H., Ji J. H., Park J. D., Song M. Y., Song K. S., Ryu H.R., Yoon J. U., Jeon K. S., Jeong J., Han B. S., Chung Y. H., Chang H.K., Lee J. H., Kim D. W., Kelman B. J., Yu I. J. Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles. Part Fibre *Toxicol Appl Pharmacol* 2011, **8**, 16

[216] Campagnolo L., Massimiani M., Vecchione L., Piccirilli D., Toschi N., Magrini A., Bonanno E., Scimeca M., Castagnozzi L., Buonanno G., Stabile L., Cubadda F., Aureli F., Fokkens P. H., Kreyling W. G., Cassee F. R., Petroiusti A. Silver nanoparticles inhaled during pregnancy reach and affect the placenta and the foetus. *Nanotoxicology* 2017, **11**, 687 -698

[217] van Der Zande M., Vandebriel R. J., van Doren E., Kramer E., Herrera Rivera Z., Serrano-Rojero C. S., Gremmer E. R., Mast J., Peters R. J., Hollman P. C., Hendriksen P. J., Marvin H.J., Peijnenburg A. A., Bouwmeester H. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* 2012, **6** (8), 7427 - 7442

[218] Kreyling W., & Scheuch G. Clearance of particles deposited in the lungs. In Particle lung interactions, Heyder J., & Gehr P. Eds. Marcel Dekker: New York, USA, 2000

[219] Shinohara N., Danno N., Ichinose T., Sasaki T., Fukui H., Honda K., Gamo M. Tissue distribution and clearance of intravenously administered titanium dioxide (TiO2) nanoparticles. *Nanotoxicology* 2014b, **8** (2), 132-141

[220] Landsiedel R F. E., Ma-Hock L, Van Ravenzwaay B, Wohlleben W, Wiench K, Oesch F., Toxico-/biokinetics of nanomaterials. *Archives of toxicology* 2012, **86**, 1021 - 1060

[221] 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. *Archives of toxicology* 2008, **82** (3), 151-157

[222] van Ravenzwaay B., Landsiedel R., Fabian E., Burkhardt S., Strauss V., Ma-Hock L. Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO(2), pigmentary TiO(2) and quartz. *Toxicology letters* 2009, **186** (3), 152-159

[223] Kreyling W. G., Hirn S., Schleh C. Nanoparticles in the lung. *Nature Biotechnology* 2010, **28**, 1275

[224] Bullard-Dillard R., Creek K. E., Scrivens W. A., Tour J. M. Tissue Sites of Uptake of14C-Labeled C60. *Bioorganic Chemistry* 1996, **24** (4), 376-385

[225] Moussa F., Trivin F., Céolin R., Hadchouel M., Sizaret P. Y., Greugny V., Fabre C., Rassat A., Szwarc H. Early effects of C60 Administration in Swiss Mice: A Preliminary Account for In Vivo C60 Toxicity. *Fullerene Science and Technology* 1996, **4** (1), 21-29

[226] Ma-Hock L., Burkhardt S., Strauss V., Gamer A. O., Wiench K., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. *Inhal Toxicol* 2009, **21** (2), 102-118

[227] Hillyer J. F., & Albrecht R. M. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal of pharmaceutical sciences* 2001, **90** (12), 1927-1936

[228] Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S., Tsutsumi Y. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol* 2011, **6** (5), 321-328

[229] Higashisaka K., Nagano K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. Nano-safety Research: Examining the Associations among the Biological Effects of Nanoparticles and Their Physicochemical Properties and Kinetics. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2017, **40** (3), 243-248

[230] Morishita Y., Yoshioka Y., Satoh H., Nojiri N., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. Distribution and histologic effects of intravenously administered amorphous nanosilica particles in the testes of mice. *Biochem. Biophys.Res. Commun.* 2012, **420**, 297 - 301

[231] Setyawati M. I., Tay C. Y., Chia S. L., Goh S. L., Fang W., Neo M. J., Chong H.C., Tan S. M., Loo S. C., Ng K. W., Xie J. P., Ong C. N., Tan N. S., Leong D. T. Titanium dioxide nanomaterials cause endothelial cell leakiness by disrupting the homophilic interaction of VE-cadherin. *Nat. Commun.* 2013, **4**, 1673

[232] Sonavane G., Tomoda K., Makino K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 2008, **66** (2), 274-280

[233] Zhou Y., Peng Z., Seven E. S., Leblanc R. M. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *J Control Release* 2018, **270**, 290-303

[234] Larsen A., Stoltenberg M., Danscher G. In vitro liberation of charged gold atoms: autometallographic tracing of gold ions released by macrophages grown on metallic gold surfaces. *Histochem Cell Biol* 2007, **128** (1), 1-6

[235] Sabella S., Carney R. P., Brunetti V., Malvindi M. A., Al-Juffali N., Vecchio G., Janes S. M., Bakr O. M., Cingolani R., Stellacci F., Pompa P. P. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale* 2014, **6** (12), 7052-7061

[236] Kagan V. E., Konduru N. V., Feng W., Allen B. L., Conroy J., Volkov Y., Vlasova I. I., Belikova N. A., Yanamala N., Kapralov A., Tyurina Y. Y., Shi J., Kisin E. R., Murray A. R., Franks J., Stolz D., Gou P., Klein-Seetharaman J., Fadeel B., Star A., Shvedova A. A. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. *Nat Nanotechnol* 2010, **5** (5), 354 -359

[237] Hamano T., Mashino T., Hirobe M. Oxidation of [60]fullerene by cytochrome P450 chemical models. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1995, (15), 1537-1538

[238] Xie G., Sun J., Zhong G. Tissular localization and excretion of intravenously administered silica nanoparticles of different sizes. *Journal of Nanoparticle Research* 2012, **14** (1), 671

[239] Sumner S. C., Fennell T. R., Snyder R. W., Taylor G. F., Lewin A. H. Distribution of carbon-14 labeled C60 ([14C]C60) in the pregnant and in the lactating dam and the effect of C60 exposure on the biochemical profile of urine. *J Appl Toxicol* 2010, **30** (4), 354-360

[240] Melnik E. A., Buzulukov Y. P., Demin V. F., Demin V. A., Gmoshinski I. V., Tyshko N. V., Tutelyan V. A. Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during in vivo Experiments on Rats. *Acta naturae* 2013, *5* (3), 107-115

[241] Miller M. R., Raftis J. B., Langrish J. P., McLean S. G., Samutrtai P., Connell S. P., Wilson S., Vesey A. T., Fokkens P.H.B., Boere A. J. F., Krystek P., Campbell C. J., Hadoke P. W. F., Donaldson K., Cassee F.R., Newby D. E., Duffin R., Mills N. L. Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. *ACS Nano* 2017a, **11**, 4542 - 4552

[242] Miller M. R., Raftis J. B., Langrish J. P., McLean S. G., Samutrtai P., Connell S. P., Wilson S., Vesey A. T., Fokkens P. H.B., Boere A. J. F., Krystek P., Campbell C. J., Hadoke P. W. F., Donaldson K., Cassee F.R., Newby D. E., Duffin R., Mills N. L. Correction to "Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease". *ACS Nano* 2017b, **24**, 10623 - 10624

[243] Sun T. Y., Bornhoft N. A., Hungerbuhler K., Nowack B. Dynamic Probabilistic Modeling of Environmental Emissions of Engineered Nanomaterials. *Environmental science & technology* 2016, **50** (9), 4701-4711

[244] van Kesteren P. C., Cubadda F., Bouwmeester H., van Eijkeren J. C., Dekkers S., de Jong W. H., Oomen A. G. Novel insights into the risk assessment of the nanomaterial synthetic amorphous silica, additive E551, in food. *Nanotoxicology* 2015, **9** (4), 442-452