INSO
23108
1st Edition
2021

Identical with
ISO/TR 19007:
2018

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

استاندارد ملی ایران
۲۳۱۰۸
چاپ اول
۱۴۰۰

فناوری نانو – سنجش برون‌تنی MTS برای اندازه‌گیری اثر سمیت‌سلولی نانوذرات

Nanotechnologies — In vitro MTS assay for measuring the cytotoxic effect of nanoparticles

ICS: 07.120; 07.080

استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۱۰۸ (چاپ اول): سال ۱۴۰۰

سازمان ملی استاندارد ایران

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

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

Iran 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 به‌روزرسانی و نشر استانداردهای ملی را به‌عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در 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 نانوـ سنجش برون‌تنی MTS برای اندازه‌گیری اثرات سمیت‌سلولی نانوذرات»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
کوهی، محمّد کاظم (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه تهران
دبیر:	
منهاج‌بناء، رابعه (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	مدیرعامل- شرکت راهبران توسعه سبز
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اسلامی‌پور، الهه (کارشناسی ارشد زیست‌شناسی)	کارشناس- گروه استاندارد و ارزیابی ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
حیدری، مهناز (دکتری بیولوژی تولید مثل)	عضو هیئت علمی- پژوهشگاه فناوری‌های نوین ابن سینا
توجهی، شهره (دانشجوی دکتری تخصصی بیوتکنولوژی)	کارشناس- دانشکده داروسازی- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
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
قاضی خوانساری، محمود (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
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 دامنه کاربرد ۱
۲ مراجع الزامی ۱
۳ اصطلاحات و تعاریف ۱
۴ نمادها و کوته‌نوشت‌ها ۴
۵ مواد ۴
۵-۱ رده سلولی ۴
۵-۲ سنجش ۵
۵-۳ کنترل‌ها ۵
۶ دستگاه‌ها ۶
۷ آماده‌سازی نمونه آزمون نانوذرات ۷
۸ آماده‌سازی‌ها ۸
۸-۱ کلیات ۸
۸-۲ محیط‌کشت ۸
۸-۳ آماده‌سازی کشت استوک سلول ۹
۸-۴ تایید رشد سلول زنده ۹
۸-۵ صحه‌گذاری یکنواختی خوانشگر پلیت ۱۰
۸-۶ آماده‌سازی کنترل ۱۰
۸-۷ پی‌پت‌کردن دقیق ۱۱
۹ مشخصه‌یابی تأثیر نانوذرات بر زنده‌مانی سلول ۱۱
۹-۱ کلیات ۱۱
۹-۲ آماده‌سازی پلیت سلولی ۱۳
۹-۳ آماده‌سازی پلیت دُزدهی نانوذرات ۱۴
۹-۴ قراردادن سلول‌ها در معرض نانوذرات در محیط‌کشت ۱۶
۹-۵ قراردادن سلول‌ها در معرض سنجش MTS ۱۷
۹-۶ اندازه‌گیری میزان جذب فورمازان ۱۷
۱۰ آنالیز زنده‌مانی سلول ۱۸

عنوان **صفحه**

۱۱ تفسیر نتایج سنجش ۱۹
پیوست الف (آگاهی‌دهنده) پتانسیل رده‌های سلولی و سنجش‌ها ۲۰
پیوست ب (آگاهی‌دهنده) مثال: سنجش MTS با استفاده از رده سلولی (A549) ۲۱
پیوست پ (آگاهی‌دهنده) مثال: سنجش MTS با استفاده از رده سلولی RAW 264.7 ۳۳
کتاب‌نامه ۴۱

پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو- روش سنجش برون‌تنی MTS برای اندازه‌گیری اثر سمیت‌سلولی نانوذرات» 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 یکصد و چهارمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۴۰۰/۰۹/۰۸ 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 19007: 2018, Nanotechnologies— In vitro MTS assay for measuring the cytotoxic effect of nanoparticles

مقدمه

حوزه فناوری نانو از طریق تولید مواد جدید، محصولات و کاربردها به سرعت در حال پیشرفت است. هم‌زمان، سوالات زیادی در مورد تأثیر بالقوه برخی از این مواد بر سلامت انسان و محیط‌زیست مطرح شده است. در سطح بین‌المللی، یک برنامه تحقیقاتی بزرگ برای درک بهتر و تعیین کمیت پتانسیل مخاطرات در حال انجام است. همچنین مواد شیمیایی مورداستفاده در پوشش سطحی نانوذرات در فرآوری یا در محصولات، می‌توانند حتی به دلیل نسبت بالای سطح به حجم آنها، بر سمیت نانوذرات تأثیر بیشتری بگذارند.

سیستم‌های سلولی یکی از عناصر اساسی سیستم‌های زیستی زنده هستند. احتمال دارد پایش پاسخ سمیت سیستم‌های مدل سلولی به مواجهه با نانوذرات درک عمیقی را از «حالت‌های عمل[1]» نانوذرات و اینکه کدام یک از آنها برای بررسی بیشتر ارزیابی ریسک موردنیاز است، فراهم آورد.

در سال ۲۰۰۸، عده‌ای از محققان بین‌المللی نتیجه گرفتند که برخی از نتایج منتشرشده از سمیت نانومواد توسط آزمایشگاه‌های دیگر قابل‌تکرار نیست و آنکه درستی و تکرارپذیری[2] آزمون‌های نانوتوکسیکولوژی لازم است. در نتیجه، «معاهده بین‌المللی یکسان‌سازی NanoEHS»[3] (IANH)[4] با هدف توسعه پروتکل‌های آزمون که سمیت و برهم‌کنش‌های زیستی نانوذرات را در سیستم‌های سلولی به‌درستی ارزیابی کنند و اینکه این نتایج، در هر آزمایشگاهی تکرارپذیر باشد، منعقد شد. IANH، مشخصه‌یابی راند رابین[5] (مقایسه بین‌آزمایشگاهی روش آزمون) توزیع اندازه ذرات در تعلیقه‌های مایع و برهم‌کنش‌های برون‌تنی نانومواد با سلول‌ها را با چندین مورد سنجش سمیت‌سلولی رایج (پیوست **الف**) انجام داد. این گروه تعدادی از عوامل را که باعث افزایش متغیرها[6] می‌شوند شناسایی کرده و فنون کاهش آنها را توسعه دادند. تحقیقات سرمایه‌گذاری شده توسط موسسه NIEHS NanoGo[7] آمریکا، ارزیابی‌های بیشتری در مورد برخی از این پروتکل‌ها به‌خصوص پروتکل ارزیابی ۳-(۵،۴-دی متیل تیازول-۲-ایل)-۵-(۳-کربوکسی متوکسی فنیل)-۲-(۴-سولفوفنیل)-H ۲-تترازولیم (MTS)[8] انجام داد [1]. تیم سوم، پروتکل IANH را توسعه داده و آزمایش‌هایی را انجام دادند که در آن از یک چیدمان سامانمند پلیت[9] برای دستیابی به آنالیز بهبودیافته و ثبات نتایج استفاده شده‌است (پیوست **ب**) [2]. نکته مهم آن است که در هر یک از این پروتکل‌ها از آزمون فیمابین آزمایشگاه‌های متعدد برای شناسایی منابع متغیرها و بهبود پروتکل‌های سنجش استفاده شده‌است.

1- Modes-of-action
2- Reproducible
3- Nano Environmental Health and Safety
4- International Alliance for NanoEHS Harmonization
5- Round robin
6- Variability
7- United States National Institute of Environmental Health Sciences, Engineered Nanomaterials Grand opportunity
8- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
9- Systematic plate layout

این استاندارد روشی برای سنجش برون‌تنی زنده‌مانی[1] سلول با سنجش MTS است [3]. در این سنجش یک تغییر رنگ (اوج جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر) در یک چاهک کشت، به‌دلیل تولید محصول فورمازان در حضور آنزیم‌های ردوکتاز سیتوپلاسمیک، تولید می‌شود. به‌طور کلی، تغییرات در شدت جذب مستقیماً با تعداد سلول متناسب است، اگرچه شرایط سنجشی که فعالیت ردوکتاز یا در دسترس بودن واکنشگر را تغییر می‌دهد، می‌تواند منجر به تغییرات رنگی شود که مستقیماً ناشی از تغییر در زنده‌مانی سلول نیست (یعنی تعداد سلول). واکنشگرهای MTS مستقیماً به چاهک کشت سلول افزوده می‌شوند که به سرعت ارزشیابی پتانسیل سمیت ذاتی نانوذرات را امکان‌پذیر می‌سازد، با توجه به پتانسیل اثرات تداخلی که می‌تواند با نانوذرات و سنجش‌های رنگی ایجاد شود، این نکته مهم است که آزمایش‌های کنترلی با نانوذرات و واکنشگرهای MTS قبل از پذیرش نتایج سنجش، انجام شود. مشاهده مستقیم میکروسکوپی سلول‌ها پس از تیمار[2] نیز یک روش متعامد[3] برای صحه‌گذاری نتیجه سنجش MTS را فراهم می‌آورد. پروتکل نرمال‌شده (بهنجارشده)[4] ارائه‌شده در این استاندارد محدود به انواع سلول‌های چسبنده است، اما می‌تواند برای استفاده درسلول‌های تعلیقه‌ای، اصلاح شود.

اندازه‌گیری سمیت با این سنجش، در ردیف اول اندازه‌گیری اثرات نانوذرات بر روی سیستم‌های سلولی منفرد است. روش نرمال‌شده که در این استاندارد ارائه شده بر پایه سه پروتکل سنجش MTS توضیح داده‌شده در بالا است. تفاوت بین سیستم‌های آزمایشی در جدول ۱ شرح داده شده‌است.

جدول ۱- خلاصه مطالعات استفاده شده در گسترش یک پروتکل سنجش MTS نرمال‌شده

شناسه مطالعه	رده سلولی[1]	نانوذره آزمون‌شده[2]	مواد کنترل مثبت و منفی	مرحله سانتریفیوژ (مرکزگریزی)
IANH	RAW-264.7	+PS-NP, CeO_2	$CdSO_4$,	خیر
NanoGo	BEAS-2B RLE-6TN THP-1	ZnO, TiO_2, MWCNT		بله
EMPA[3]-NIST[4]	A549	+PS-NP	$CdCl_2$	خیر

۱- براساس نام در بانک سلول ATCC

۲ -PS-NP + یک نانوذره پلی‌استایرن با بار مثبت است، CeO_2 اکسید سریم است، ZnO اکسید روی است، TiO_2 دی اکسید تیتانیم است و MWCNT یک نانولوله کربنی چنددیواره است.

3- Eidgenössische Materialprüfungs- und Forschungsanstalt آزمایشگاه‌های فدرال سوئیس برای علم و فناوری مواد

4- National Institute of Standards and Technology

در نتیجه این تفاوت‌ها، برخی از قسمت‌های پروتکل نرمال‌شده ، شامل مراحل اختیاری است که در سه مطالعه بین‌آزمایشگاهی ارائه شده‌است.

1- Viability
2- Treatment
3- Orthogonal method
4- Normalized

از چندین روش می‌توان برای تعیین زنده‌مانی سلول استفاده کرد، از جمله MTS [3]، ۳-(۵،۴-دی‌متیل تیازول-۲-ایل)-۵،۲-دی‌فنیل‌تیازولیوم بروماید (MTT)[1] [4]، ۳،۲-بیس-(۲-متوکسی-۴-نیترو-۵-سولفوفنیل)-۲H-تترازولیم-۵-کربوکسانیلید) (XTT)[2] [5]، لاکتات دهیدروژناز (LDH)[3][6]، اکسکلوژن تریپان بلو[4] [7] و سنجش نوترال رد[5] [8]. از سنجش MTS در یک مشخصه‌یابی راند رابین چندگروهه[6] استفاده شده‌است. سنجش MTS یک نسخه بهبودیافته از آزمون MTT است و یک مشخصه‌یابی ساده با توان عملیاتی بالا برای زنده‌مانی سلول را ارائه می‌دهد [1] [9]. چگالی نوری محلول سنجش MTS با کاهش عملکرد آنزیم‌های سلولی در سلول‌های زنده افزایش می‌یابد.

به‌منظور تعیین مبنای چگالی نوری[7] زنده‌مانی سلولی برای سلول‌های تیمارنشده[8] و برای تایید این‌که آیا سلول‌ها پاسخ موردانتظار به نانوذرات غیرسمی شناخته‌شده، مواد شیمیایی سمی و نانوذرات سمی اندازه‌گیری‌شده با این آزمون را دارند، آزمایش‌های کنترلی موردنیاز است. علاوه‌بر این، مهم است که تعیین شود آیا نانوذرات با خوانش نوری سنجش و ارزیابی صحه‌گذاری‌نشده[9] پتانسیل پاسخ سمیت‌سلولی نانوذرات، تداخل دارند [11].

توجه به این نکته مهم است که سنجش MTS شرح داده‌شده در این استاندارد، یکی از آزمون‌های متعدد تجاری در دسترس برای ارزیابی سمیت‌سلولی نانومواد است. اگر چه آزمون‌هایی مانند آزمون LDH که یکپارچگی غشای پلاسمایی را ارزیابی می‌کند، آزمون ATP[10] که متابولیسم انرژی را ارزیابی می‌کند و آزمون BrdU[11] برای سنتز DNA[12] در اینجا موردبحث قرار نگرفته است، نتایج حاصل از این آزمون‌ها علاوه‌بر سنجش MTS اجازه می‌دهد تا یک ارزشیابی جامع‌تر از تأثیر کلی نانوذرات بر سلول‌ها انجام شود.

1- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
2- (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2Htetrazolium-5-carboxanilide)
3- Lactate dehydrogenase
4- Trypan blue exclusion
5- Neutral red assay
6- Multi-group round robin characterization
7- Baseline optical density
8- Untreated cells
9- Invalidate
10- Adenosine triphosphate
11- Bromodeoxyuridine/5-bromo-2'-deoxyuridine
12- Deoxyribonucleic acid

فناوری نانوـ سنجش برون‌تنی MTS برای اندازه‌گیری اثرات سمیت‌سلولی نانوذرات

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد ، تعیین روشی برای ارزشیابی اثرات نانواشیاء و کلوخه‌ها و انبوهه‌های آن ها (NOAA) در زنده‌مانی سلول با استفاده از سنجش MTS است. طراحی آزمون شامل اجرای الزامات و آزمایش‌ها کنترلی برای مدیریت و مشخص‌کردن متغیرها در نتایج آزمون است.

این استاندارد برای استفاده از یک پلیت ۹۶ چاهکی کاربرد دارد.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به صورت الزامی به آنها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

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

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲- ۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو- واژه‌نامه- قسمت ۲: نانواشیاء

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، علاوه‌بر اصطلاحات و تعاریف ارائه‌شده در استاندارد ملی ایران- ایزو ۲- ۸۰۰۰۴ ، اصطلاحات و تعاریف زیر نیز به‌کار می‌رود[۱].

۳-۱

ظرف کشت

culture vessel

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

نمونه ظرف آزمون توصیف‌شده در این استاندارد بر پایه یک قالب پلیت ۹۶ چاهکی با درجه کشت بافت است.

یادآوری ۱- از دیگر ظروف با درجه کشت بافت (یعنی پلیت‌های ۳۸۴ چاهکی، پلیت‌های ۲۴چاهکی، پلیت‌های ۶ چاهکی) می‌توان به‌جای یکدیگر در این روش‌ها استفاده کرد، به شرطی که مطابق با الزامات درجه کشت بافت و مناسب برای استفاده با سلول‌های پستانداران باشند.

یادآوری ۲- اگر طی این روش از ظروف دیگر با درجه کشت بافت استفاده شود، تنظیمات پروتکل مانند حجم‌های کاشت سلول، حجم‌های شستشوی سلول و حجم‌های دُزدهی[1] سلول ممکن است لازم باشد.

[منبع: زیربند ۳-۱، استاندارد ملی ایران- شماره ۵-۷۲۱۶: سال ۱۳۹۷]

۲-۳

پراکنش

dispersion

سامانه چند فازی میکروسکوپی که در آن ناپیوستگی‌های هر حالت (جامد، مایع یا گاز: فاز ناپیوسته) در یک فاز پیوسته از یک ترکیب‌بندی یا حالت متفاوت پراکنده می‌شود.

یادآوری ۱- اگر ذرات جامد در یک مایع پراکنده شوند، به پراکندگی به‌عنوان یک تعلیقه اشاره می‌شود. اگر پراکندگی شامل دو یا چند فاز مایع باشد، به آن امولسیون گفته می‌شود. یک سوپرامولسیون از هر دو فاز جامد و مایع پراکنده در یک فاز مایع پیوسته تشکیل شده‌است.

۳-۳

اندوتوکسین

endotoxin

بخشی از دیواره خارجی پوشش سلولی باکتری گرم منفی است.

یادآوری- بخش فعال اصلی لیپوپلی‌ساکاریدها (LPS) هستند.

[منبع: زیربند ۲-۳، استاندارد ملی ایران- شماره ۱۴۱۵۳: سال ۱۳۹۰]

۴-۳

ماده کنترل منفی

negative control material

1- Dosing plate

ماده یا ترکیب شیمیایی که درصورت انجام آزمون طبق این استاندارد، یک پاسخ سمیت‌سلولی تولید نمی‌کند.

یادآوری- هدف از نمونه کنترل منفی، نشان دادن پاسخ سطح پایه سلول‌ها است. این کنترل اغلب ترکیبی از حلّال ناقل استفاده‌شده برای نگهداری نانومواد در غلظت‌های استوک[1] است.

[منبع: زیربند ۳-۴، استاندارد ملی ایران شماره ۵-۷۲۱۶: سال ۱۳۹۷]

۵-۳

ماده کنترل مثبت

positive control material

ماده یا ترکیب شیمیایی که درصورت انجام آزمون طبق استاندارد ملی شماره ۵-۷۲۱۶، یک پاسخ سمیت‌سلولی تکرارپذیر[2] را فراهم می‌کند.

یادآوری - هدف از نمونه کنترل مثبت، نشان دادن پاسخ مناسب سیستم آزمون است. به‌عنوان مثال، یک نانوماده کنترل مثبت، پلی‌استایرن[3] با بار مثبت است.

[منبع: زیربند ۳-۲، استاندارد ملی ایران شماره ۵-۷۲۱۶: سال ۱۳۹۷]

۶-۳

ته‌نشینی

sedimentation

نشست (جداسازی) فاز پراکنده به دلیل چگالی بیشتر ذرات پراکنده در مقایسه با فاز پیوسته است.

یادآوری– تجمع فاز پراکنده در پایین ظرف گواه آن است که ته‌نشینی رخ داده‌است.

[منبع: زیربند 2.13 , ISO/TR 13097: 2013]

۷-۳

نمونه موردآزمون

test sample

ماده‌ای که تحت آزمون‌ها یا ارزشیابی‌های زیستی یا شیمیایی قرار می‌گیرد.

[منبع: زیربند ۳-۵، استاندارد ملی ایران شماره ۵-۷۲۱۶: سال ۱۳۹۷]

1- Stock concentrations
2- Reproducible
3- Polystyrene

۴ نمادها و کوته‌نوشت‌ها

معادل فارسی	معادل انگلیسی	کوته نوشت‌ها
تعداد سلول در میلی‌لیتر	cells/ml (cells per millilitre)	cells/ml
۳-(۴،۵-دی متیل تیازول-۲-ایل)-۵-(۳-کربوکسی متیوکسی فنیل)-۲- (۴-سولفوفنیل)-۲ H-تترازولیم	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium	MTS
تعلیقه نانوذرات	nanoparticle suspension	NPS
فنازین متوسولفات	phenazine methosulfate	PMS
پلی‌استایرن	polystyrene	PS

۵ مواد

۵-۱ رده سلولی

استفاده از رده‌های سلولی معتبر ترجیح داده شده و باید از مخازن[1] شناخته‌شده تهیه شوند. از اصول مبنای فنون کشت سلولی در مورد گسترش یک استوک منجمد از سلول‌ها پیروی کنید، به‌گونه‌ای که بتوان سنجش MTS را برای سمیت‌سلولی نانو[2] انجام داد [12].

اگر یک کشت استوک از یک رده سلولی ذخیره شود، ذخیره‌سازی باید در دمای ۸۰ °C - یا پایین‌تر در محیط‌کشت مربوطه اما حاوی محافظ برودتی، به‌عنوان مثال دی متیل سولفوکسید یا گلیسرول باشد. ذخیره‌سازی طولانی مدت (چندین ماه تا چندین سال) فقط در دمای ۱۳۰ °C- یا پایین‌تر امکان‌پذیر است.

فقط سلول‌های عاری از مایکوپلاسما برای آزمون باید مورداستفاده قرار گیرند. قبل از استفاده، کشت‌های استوک باید برای عدم وجود مایکوپلاسما آزمون شوند.

یادآوری ۱ - بررسی منظم سلول‌ها؛ به‌عنوان مثال: ریخت‌شناسی، زمان دوبرابر شدن، تعداد کروموزوم متعارف[3]، آزمون توالی‌های پیاپی کوتاه (STR)[4] مهم است، زیرا حساسیت در آزمون‌ها با توجه به تعداد پاساژ[5] می‌تواند متفاوت باشد.

1- Repositories
2- Nanocytotoxicity
3- Modal chromosome number
4- Short tandom repeats testing
5- Passage

یادآوری ۲- نانوذره می‌تواند از طریق سازوکارهای مختلف با سلول‌ها ارتباط برقرار کند. این مطالعات بهتراست کـه شـامل هـر دو رده سلولی بیگانه‌خوار[1] [یعنی ماکروفاژ[2] (درشتخوار)] و یک رده سلولی غیر- بیگانه‌خوار[3] [یعنـی اپیتلیـال[4] (پوششـی)] یـا فیبروبلاست[5] (تارتَنده) باشند. نتایج آزمون با استفاده از این دو نوع سلول می‌تواند درک عمیقی در مورد نحوه عملکـرد سـمیت نانوذرات را فراهم کند.

۵-۲ سنجش

۵-۲-۱ MTS [۳-(۵،۴-دی متیـل تیـازول-۲-ایـل)-۵-(۳-کربوکسـی متیوکسـی فنیـل)-۲-(۴-سولفوفنیل)-H ۲-تترازولیم]/PMS- فنازین متوسولفات [CAS#138169-43-4]

واکنشگر در حضور آنزیم‌های سلولی کاهش یافته و محصولی رنگی را تشکیل می‌دهد کـه در محـیط‌کشـت، محلول است. چگالی نوری محیط‌کشت در نبود آلایه‌ها[6] با تعداد سلول در یک ظرف کشت ارتباط دارد. اگـر شرایط کشت بر فعالیت ردوکتاز درون سلول‌ها تأثیر بگذارد و اگر نـانوذره باعـث اثـرات تـداخلی در خـوانش نتایج آزمون شود، آلایه‌ها می‌توانند ایجاد شوند. واکنشگر شرح داده‌شـده در مرجـع [2] و مـواد واکنشـگر از فروشندگان مختلف قابل‌دسترس است.

۵-۳ کنترل‌ها

۵-۳-۱ ماده کنترل مثبت شیمیایی همانند سولفات کادمیم، باید به‌عنوان کنترل شیمیایی مثبت اسـتفاده شود.

یادآوری ۱– یون‌های Cd^{+} از طریق سازوکار تنش اکسایشی در حیوانات و سلول‌ها سمی هستند، به مرجع [13] مراجعه شود.

یادآوری ۲– به ترکیبات حاوی کادمیم، شامل ترکیبات محلول در آب ماننـد $CdCl_2$ و $CdSO_4$ براسـاس «سـامانه هماهنـگ جهانی طبقه‌بندی و برچسب‌گذاری مواد شیمیایی» (GHS)[7] نشان «خطر» اختصاص داده شده‌است.

کادمیم (Cd) یک فلز سنگین سمی است و برای دفع و اسـتفاده از آن در برخـی کشـورها مقرراتـی تنظـیم شده‌است. در مواردی که از Cd نمی‌توان به‌عنوان کنترل شیمیایی مثبت استفاده کرد، یک کنترل شـیمیایی جایگزین باید انتخاب شود. توصیه می‌شود ترکیب کنترلی در محیط‌های آبی[8] محلول باشد، به انـدازه کـافی در طول دوره آزمایش پایدار باشد و به‌راحتی به‌عنوان یک محصول تخلـیص‌شـده از فروشـندگان تجـاری در

فرایند انتقال بخشی از سلول‌ها به ظرف جدید کشت، برای داشتن فضای بیشتر و ادامه فرایند تقسیم سـلولی و افـزایش تعـداد سلول‌ها، پاساژ نامیده می‌شود.

1- Phagocytic
2- Macroghage
3- Non-phagocytic
4- Epithelial
5- Fibroblast
6- Artefacts
7- Globally Harmonized System
8- Aqueous media

دسترس باشد. ترکیبات شیمیایی غیرفلزی مانند فنول، DMSO[1] و مواد شوینده[2] مانند Tween 80[3] می‌توانند به‌عنوان کنترل‌های شیمیایی مثبت استفاده شوند. صحه‌گذاری تکمیلی[4] برای استفاده از پروتکل این ترکیبات شیمیایی انجام شود.

۵-۳-۲ از نانوذرات پلی‌استایرن با بار مثبت (قطر ۶۰ نانومتر، پراکنده در آب) به‌عنوان یک ماده کنترل مثبت نانوذره باید استفاده شود. استفاده از این نانوذرات به‌عنوان کنترل مثبت در سلول‌های A549[5] و RAW 264.7[6] در مطالعات بین‌آزمایشگاهی، صحه‌گذاری شده‌است (به جدول ۱ مراجعه شود).

یادآوری ۱- برای پروتکل پراکنش و فعالیت زیستی نانوذرات پلی‌استایرن کاتیونی، به مرجع [10] مراجعه شود.

یادآوری ۲- پلی‌استایرن با بار مثبت (انتهای آمینی)[7] باعث ایجاد تنش اکسایشی سمی در بسیاری از سلول‌ها می‌شود، به مرجع [14] مراجعه شود.

یادآوری ۳- نانوذرات کوارتز[8]، سیلیس[9] و نقره همچنین برای بسیاری از انواع سلول‌ها، دارای اثرات سمیت‌سلولی هستند و می‌توانند به‌عنوان کنترل‌های مثبت استفاده شوند، به مرجع [15] مراجعه شود.

۶ دستگاه‌ها

۶-۱ گرم‌خانه[10]، ۳۷ °C ± ۱ °C، رطوبت‌دار، CO_2/هوا ٪ ۵؛

۶-۲ پلیت‌های ۹۶ چاهکی کف تخت؛

۶-۳ پلیت ۹۶ چاهکی با کف U شکل، برای پلیت دُزدهی[11]؛

۶-۴ پلیت ۲۴ چاهکی با کف تخت، فقط برای نرخ رشد و سلامت سلول؛

۶-۵ خوانشگر پلیت میکروتیتر فوتومتر، پلیت ۹۶ چاهکی[12]؛

۶-۶ سانتریفیوژ (گریزانه) [13]، با حداقل شتاب g ۲۰۰۰؛

1- Dimethyl sulfoxide
2- Detergents
3- Polysorbate 80 (Tween 80–Tween is a registered trademark of Croda Americas, Inc.)
4- Additional validation
5- A549 cells are adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells.
6- The RAW 264.7 cells are monocyte/macrophage-like cells.
7- Amine terminated
8- Quartz
9- Silica
10- Incubator
11- Dosing plate
12- 96 well plate photometer microtitre plate reader
13- Centrifuge

۶-۷ پی‌پت چندکاناله[1] (حداقل ۸ کانال)، با حجم ۲۰۰ میکرولیتر/پی‌پت؛

۶-۸ هود لامینار[2]، مطابق با مخاطره زیستی استاندارد؛

۶-۹ فلاسک‌های کشت بافت، $25\ cm^2$ و $75\ cm^2$؛

۶-۱۰ میکروسکوپ معکوس فاز کنتراست[3]؛

۶-۱۱ میکروسکوپ استریو[4]؛

۶-۱۲ ترازوی آزمایشگاهی؛

۶-۱۳ شمارنده سلولی الکترونیکی یا هموسایتومتر[5]؛

۶-۱۴ میکروپی‌پت[6]؛

۶-۱۵ مخلوط‌کن ورتکس[7].

۷ آماده‌سازی نمونه آزمون نانوذرات

طبق اصل مبنای آماده‌سازی نمونه، نانوذرات باید در یک مایع زیست‌سازگار با یک روش اجرایی تکرارپذیر، پراکنده شوند که می‌تواند شامل سونیک‌کردن[8] و مخلوط‌کردن به وسیله مخلوط‌کن ورتکس باشد.

به‌طور متناوب، نانوذرات را می‌توان با تثبیت‌کننده‌های شیمیایی زیست‌سازگار، پوشش‌هایی مانند آلبومین یا مستقیماً در محیط‌کشت با استفاده از سرم مناسب، پراکنده کرد. فنون پراکندگی خاص در این استاندارد موردبحث قرار نگرفته‌است. جزئیات مربوط به پراکنش را می‌توان در منابع ذکرشده در یادآوری‌ها و در ISO/TS 19337 یافت.

یادآوری ۱- روش‌های اجرایی مختلفی منتشر شده‌است که پراکنش تکرارپذیر نانوذرات [15] [16] [17]، تعلیقه‌های نانویی و پایداری آنها را مشخص‌یابی می‌کنند. پروتکل‌های پراکندگی تدوین‌شده در وبگاه Joint Action NANOGENOTOX [9] در دسترس عموم است.

1- Multichannel pipette
2- Laminar flow cabinet
3- Inverted phase contrast microscope
4- Stereomicroscope

این میکروسکوپ، لوپ آزمایشگاهی یا استریوسکوپ نیز نامیده می‌شود.

5- Electronic cell counter or hemocytometer
6- Micropipette
7- Vortex mixer
8- Sonication
9- Safety evaluation of manufactured nanomaterials by characterisation of their potential genotoxic hazard http://www.nanogenotox.eu

یادآوری ۲- برای تثبیت‌کننده‌های شیمیایی زیست‌سازگار، به مرجع [19] مراجعه شود. برای پوشش‌هایی مانند آلبومین به مرجع [20] مراجعه شود. برای محیط‌کشت سازگار، به مرجع [21] مراجعه شود.

یادآوری ۳- تثبیت‌کننده‌های شیمیایی مانند آلبومین می‌توانند سطح بالای پس‌زمینه[1] را در سنجش‌های زنده‌مانی سلول ایجاد کنند. استفاده از آزمایش‌های کنترلی (یعنی فقط تثبیت‌کننده) برای تعیین تأثیر تثبیت‌کننده بر روی خوانش سنجش مهم است.

در پراکنده‌شدن نانوذرات در یک محیط مایع مانند آب، کسر حجمی محیط نانوذره در محیط‌کشت سلول باید پایین‌تر از کسری باشد که برای کشت سلول، سمی است.

محیط مایع پشتیبانی‌کننده تعلیق نانوذرات می‌تواند برای سلول‌ها سمی باشد و باعث ایجاد سمیت مثبت کاذب شود. توصیه می‌شود برای آنکه تعیین شود در چه کسر حجمی، محیط مایع برای سلول‌ها سمی است آزمایش‌های کنترلی با محیط مایع انجام شود.

یادآوری ۴- یک میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر تعلیقه، یک محتوای تقریبا ٪ ۱۰ آب در محیط‌کشت سلولی را برای µg/ml ۱۰۰ مواجهه، تولید می‌کند. هنگام استفاده از آب به‌عنوان یک وسیله پراکنش یک راهنمایی این است که نگه‌داشتن غلظت نهایی آب در پایین‌تر از ٪ ۱۰ از حجم کل، سبب کاهش اثرات قابل‌توجه حامل می‌شود. درصورت نیاز به غلظت بالاتر حامل برای آماده‌سازی دُز نانوذرات، مهم است که صحه‌گذاری غلظت بالاتر حامل، با نتایج سنجش تداخل نداشته باشد.

نوع فرآیند تعلیق استفاده‌شده باید به‌دقت موردتوجه قرار گیرد تا از اثرات سمیت‌سلولی مثبت کاذب که به دلیل وجود نانوذرات نیست، جلوگیری شود. برای ارزشیابی پایداری نانوتعلیقه، دو عامل باید ارزشیابی شود:

الف- پایداری در برابر کلوخگی (منعکس‌شده در متوسط اندازه ذرات)؛

ب- پایداری تعلیقه کلوئیدی (منعکس‌شده از طریق رسوب‌گذاری و ته‌نشینی).

تعلیقه‌های نانو باید از نظر وجود اندوتوکسین‌ها مطابق با استاندارد ISO 29701 آزمون شوند.

۸ آماده‌سازی‌ها

۸-۱ کلیات

همه محلول‌ها (به استثنای محیط‌کشت)، ظروف شیشه‌ای و غیره باید سترون[2] باشند. توصیه می‌شود کلیه روش‌های اجرای آن تحت شرایط ضدعفونی[3] و در محیط سترون یک هود لامینار (مطابق با استاندارد مخاطره زیستی) انجام شود.

۸-۲ محیط‌کشت

محیط‌کشت باید سترون باشد.

1- Background
2- Sterile
3- Aseptic

محیط‌کشت با سرم و یا بدون سرم باید براساس نیازهای رشد سلول انتخاب شود. پادزیست‌هایی (آنتی‌بیوتیک‌هایی) که تأثیر منفی بر روی آزمون‌ها نداشته باشند، ممکن است در محیط‌کشت موجود باشند.

شرایط ذخیره‌سازی مانند دمای یخچال باید صحه‌گذاری شده‌باشد.

یادآوری- ترکیب و شرایط نگهداری در پایداری محیط‌کشت تفاوت ایجاد می‌کند.

۸-۳ آماده‌سازی کشت سلول استوک

با استفاده از رده سلولی و محیط‌کشت انتخاب‌شده، سلول‌های کافی را برای تکمیل آزمون آماده کنید. اگر سلول‌ها قرار است از کشت‌هایی که از ذخیره گرفته شده‌است، رشد داده شوند، محافظت‌کننده انجماد را، در صورت وجود، خارج کنید. سلول‌ها حداقل یک بار قبل از استفاده پیش‌کشت شوند.

هنگام پیش‌کشت سلول‌ها، خارج‌کردن و دوباره معلق‌سازی سلول‌ها به‌وسیله غیرانبوهه‌سازی آنزیمی و/یا مکانیکی، از یک روش مناسب برای رده سلولی استفاده کنید.

اطلاعات بیشتر مربوط به رده سلولی در پیوست **الف** موجود است.

توصیه می‌شود از رویه‌های خوب کشت سلولی[1] استفاده شود. درصورت لزوم به مرجع [12] برای دستورالعمل‌های تکمیلی مراجعه شود.

۸-۴ تأیید رشد سلول زنده

قبل از انجام آزمایش‌ها روی نانوذرات، نرخ دوبرابر شدن سلول‌ها و زنده‌مانی را مشخص کنید. نرخ‌های رشد سلول: میزان زنده‌مانی و نرخ‌های دوبرابر شدن باید مشخصه‌یابی و پایش شوند. زنده‌مانی سلول‌ها باید با استفاده از یک سنجش اکسکلوژن تریپان بلو، بیش از ٪ ۹۵ باشد:

الف- سلول‌ها را در پلیت‌های ۲۴چاهکی برای ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت رشد دهید:

۱- تعداد ۲۰۰,۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر را در µl ۵۰۰ میکرولیتر محیط‌کشت در هر چاهک با هشت تکرار در هر دوره زمانی، انتقال دهید؛

۲- برای هر دوره زمانی (۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت) از یک پلیت استفاده کنید.

۳- پلیت‌ها را به آرامی و بدون برهم‌خوردگی (تلاطم) برای جلوگیری از ایجاد اختلال در چسبیدن سلول درنتیجه رسوب غیریکنواخت، به داخل گرم‌خانه منتقل کنید.

۴- تایید کنید که گرم‌خانه اخیراً از نظر درجه حرارت، رطوبت و غلظت دی‌اکسید کربن، کالیبره شده‌است. سنجه‌ها[2] را در یک دفترچه آزمایشگاهی برای ایجاد نمودار سنجه‌ها، ثبت کنید.

۵- در هر نقطه زمانی (۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت)، یک پلیت را از گرم‌خانه خارج‌کنید.

1- Good cell culture practices
2- Metrics

۶- با استفاده از میکروسکوپ استریو، سلامت و ریخت‌شناسی ظاهری سلول‌ها را بررسی کنید.

ب- ارزیابی تعداد سلول و زنده‌مانی با تریپان بلو:

۱- محیط‌کشت را با پی‌پت‌کردن آرام، از چاهک‌ها خارج کنید.
۲- سلول‌ها را با استفاده از دستورالعمل‌های تولیدکننده، برداشت[1] کنید.
۳- محیط‌کشت حاوی سلول‌ها را در یک لوله سانتریفیوژ جمع‌آوری کنید.
۴- محلول روماند[2] را با اضافه‌کردن سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در یک سانتریفیوژ در g ۴۰۰ بچرخانید تا یک رسوب قرصی شکل[3] ایجاد شود.
۵- محلول روماند را دور بریزید.
۶- مقدار µl ۲۵ (٪ ۰٫۴تریپان بلو در PBS[4])را به µl ۱۰۰ محیط‌کشت اضافه کنید.
۷- رسوب قرصی شکل را مجدداً در محیط‌کشت/تریپان بلو با یک پی‌پت تعلیق کنید.
۸- سلول‌ها را بر روی یک هموسایتومتر قرار دهید.
۹- تعداد کل سلول‌های زنده و مرده (آبی رنگ) و درصد زنده‌مانی (زنده/کل) را با شمارش سلول‌ها در هموسایتومتر با یک میکروسکوپ استریو ثبت کنید. برای جزئیات به مرجع [22] مراجعه شود.

۱۰- توصیه می‌شود زمان دوبرابر شدن سلولی با رده سلولی مورد نظر، سازگار باشد. درصد زنده‌مانی سلولی در مدت زمان ۴۸ ساعت بیشتر از ٪ ۹۵، قبل از ادامه آزمایش مواجهه با نانوذرات باشد.

۸-۵ صحه‌گذاری یکنواختی خوانشگر پلیت

قبل از انجام اندازه‌گیری، اطمینان حاصل کنید که ابزار به‌درستی کار می‌کند.

۸-۶ آماده‌سازی کنترل

۸-۶-۱ توصیف کنترل

مواد کنترل مثبت باید سولفات کادمیم و پلی‌استایرن با بار مثبت باشد. برای اطلاعات بیشتر در مورد جزئیات مربوط به انتخاب این کنترل‌های مثبت به بند ۵ مراجعه شود.

باید آزمایش‌های جداگانه‌ای برای تعیین اینکه آیا نانوذرات و پادزیست‌ها می‌توانند پتانسیل تداخل با آزمون را داشته‌باشند، انجام شود.

محلول‌های استوک را در آب فوق‌خالص سترون و بدون اندوتوکسین تهیه کنید (کمتر از µS/cm ۱٫۱ در دمای °C ۲۰).

1- Harvest
2- Supernatant
3- Pellet
4- Phosphate Buffered Saline

۸-۶-۲ آماده‌سازی محلول استوک سولفات کادمیم (۱۰ mM)

سلول‌ها باید در مواجهه با سولفات کادمیم در غلظت‌های نهایی ۱ µM، ۱۰ µM، ۲۵ µM، ۵۰ µM و ۱۰۰ µM قرار گیرند.

الف- سولفات کادمیم را در آب فوق‌خالص تا غلظت ۱۰ mM حل کرده و رقیق کنید.

ب- سولفات کادمیم ۱۰ mM را در دمای ۴ °C ذخیره کنید. نیازی به فیلتراسیون سترون[1] نیست.

۸-۶-۳ آماده‌سازی تعلیقه کنترل نانوذرات

غلظت پلی‌استایرن مثبت را با آب فوق‌خالص به میزان ۱۰ mg/ml تنظیم کنید.

یادآوری- در این غلظت، حداکثر غلظت دُزدهی در پلیت آزمون (۱۰۰µg/ml) منجر به (٪ ۱ وزنی/ حجمی) آب حامل در محیط‌کشت سلول می‌شود. این استوک آماده‌شده، که در مطالعه شرح داده شده در پیوست **ب** استفاده شده‌است، به‌عنوان یک نمونه برای تمام روش‌های زیر استفاده می‌شود. اگر از نانومواد رقیق‌تری به‌عنوان محلول استوک استفاده شود، کسر حامل در محیط‌کشت سلول افزایش می‌یابد. برای تهیه تعلیقه‌های نانوذرات دیگر، به بند ۷ مراجعه شود.

۸-۷ پی‌پت‌کردن دقیق

برای توزیع واکنشگرها به پلیت ۹۶ چاهکی مورداستفاده در این سنجش، باید از یک پی‌پت کالیبره‌شده استفاده شود. اگر امکان داشته باشد، برای انجام این روش، یک پی‌پت چندکاناله کالیبره‌شده که توانایی توزیع همزمان حداقل ۶ سرپی‌پت را در طی یک تزریق واحد در یک پلیت ۹۶ چاهکی دارد، استفاده شود. مطالعه قبلی نشان داد که تغییرپذیری در کاشت سلول بین چاهک‌ها با استفاده از یک پی‌پت چندکاناله کمتر از تغییرپذیری در مراحل پی‌پت‌کردن جداگانه است [21].

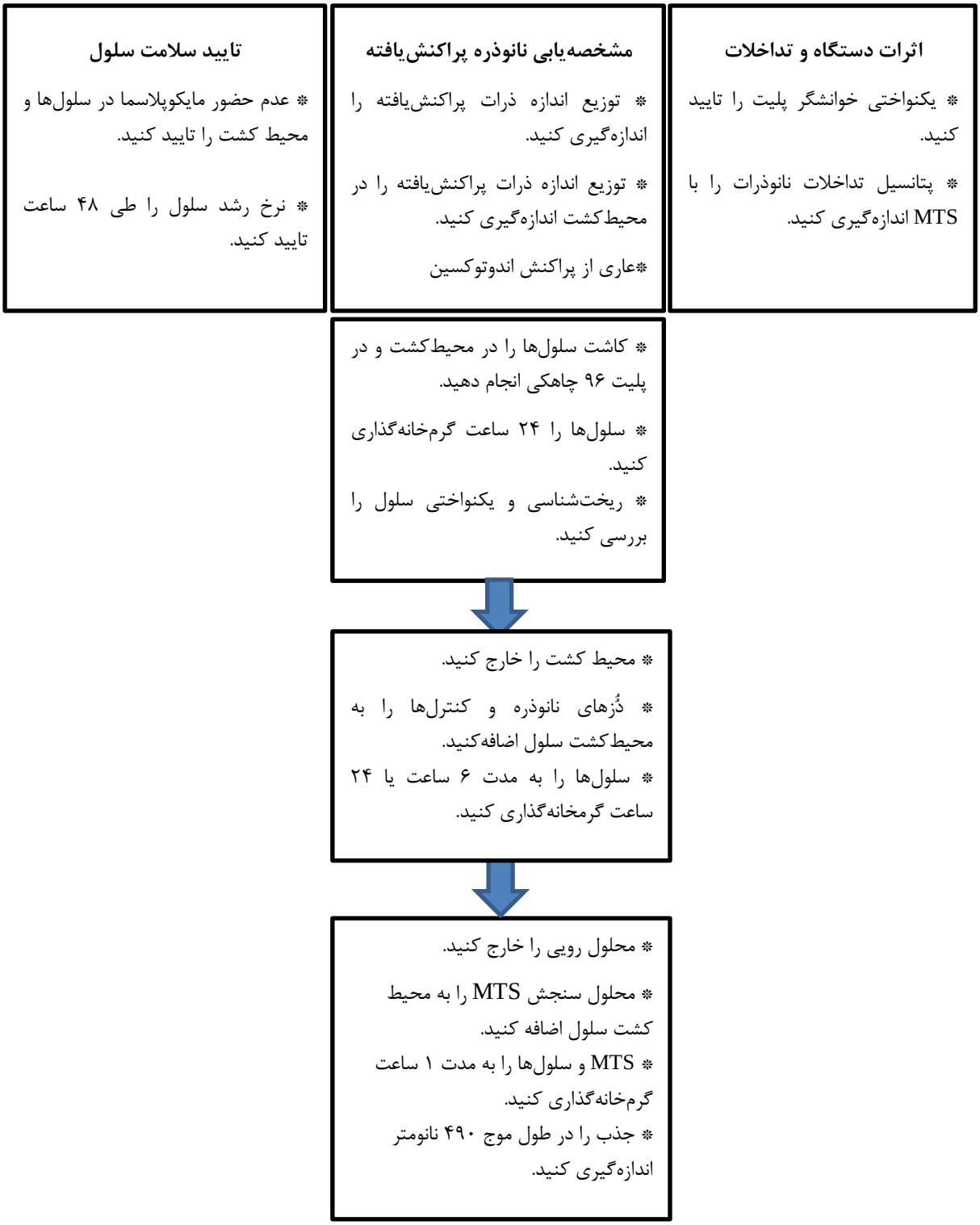
یادآوری- مهم است که در حجم کم از مایعات، سلول‌ها و نانوذرات مورداستفاده در آزمایش‌های ۹۶ چاهکی، پی‌پت با دقت کالیبره شود و از روش‌هایی برای پخش دقیق مایعات استفاده شود. جزئیات بیشتر روش توسط فروشندگان شرح داده می‌شود. به‌عنوان مثال، «سریونیکس»[2] در برنامه کاربردی AN1-12 12/06، «صحه‌گذاری سرپی‌پت‌های استفاده‌شده برپایه دقت و درستی در بسترهای خودکار جابه‌جایی مایعات، پس از تمیز کردن‌های متعدد با پلاسمای اتمسفری (سرد)» را توصیف می‌کند.

۹ مشخصه‌یابی تأثیر نانوذرات بر زنده‌مانی سلول

۹-۱ کلیات

با توجه به پتانسیل تغییرپذیری در نانوتعلیقه‌ها، توصیه می‌شود سه سنجش تکرار مستقل در روزهای مختلف با تعلیقه‌های جدید انجام شود. مراحل پروتکل برای هر سنجش در روندنمای نشان داده‌شده در شکل ۱ خلاصه شده‌است.

1- Sterile filteration
2- Cerionix- AN1-12 12/06



شکل ۱- روند ساده‌شده فرآیند مشخصه‌یابی پتانسیل سمیت‌سلولی نانوذره پراکنش‌یافته

۹-۲ آماده‌سازی پلیت سلولی

۹-۲-۱ توصیه می‌شود سلول‌ها جمع آوری شده، شمارش شده و سپس در محیط‌کشت مجدداً در $۷٫۵ \times ۱۰^{۴}$ cells/ml ~ پس از آنکه که با شمارنده سلولی یا هموسایتومتر و میکروسکوپ استریو تأیید شد، مجدداً به حالت تعلیق درآیند.

- سلول‌ها باید در محیط‌کشت با چگالی مناسب کاشته شوند تا کشت‌ها تا پایان آزمون، تلاقی[1] نیابند؛

- تقریباً ۱,۰۰۰,۰۰۰ سلول برای یک پلیت منفرد (٪ ۳۰ ~ اضافه) لازم است.

یادآوری- غلظت توصیف‌شده سلول در اینجا برپایه یک کاشت سلول با چگالی $۱٫۵ \times ۱۰^{۴}$ سلول/چاهک در یک پلیت ۹۶ چاهکی است. این چگالی برای سلول‌های A549 مناسب است که در پیوست **ب** توضیح داده شده‌است. بسته به نوع سلول، زمان دوبرابر شدن و فعالیت کاهش MTS، این چگالی کاشت سلول را می‌توان در آزمایش‌های اولیه صحه‌گذاری کرد. به یادآوری ۱ زیربند ۹-۵-۲ مراجعه کنید.

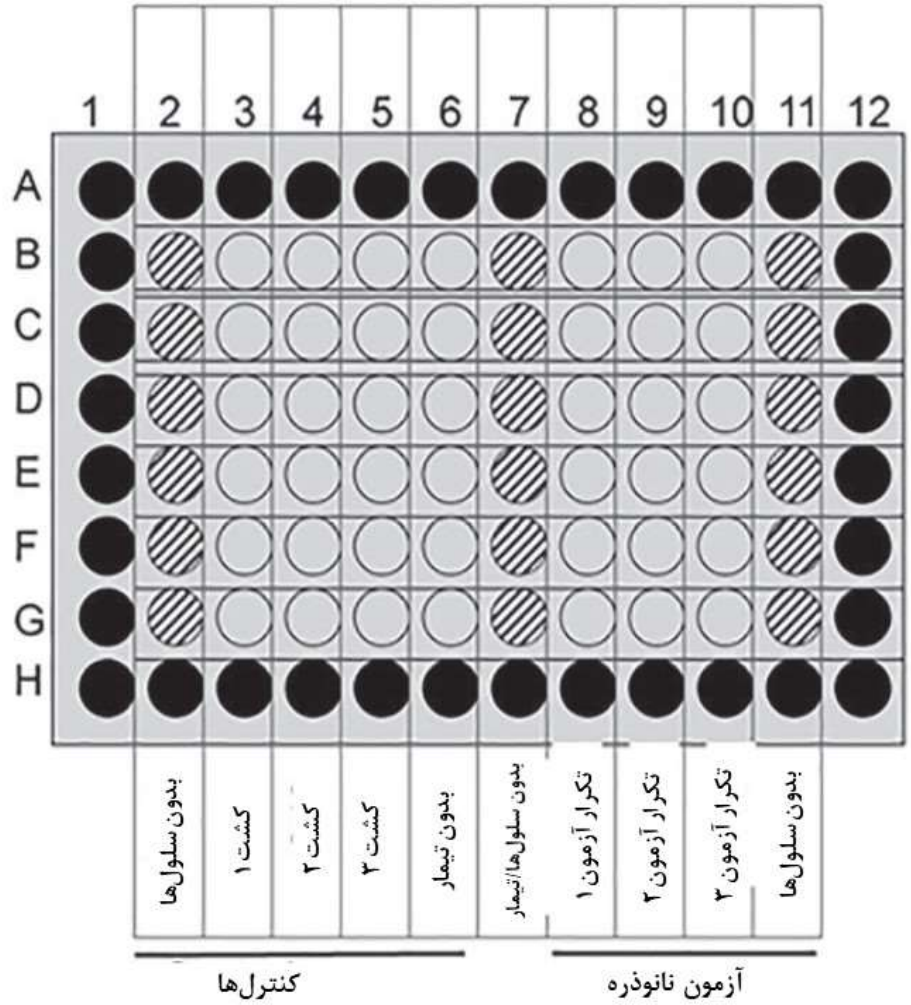
۹-۲-۲ محیط‌کشت همراه با سلول‌ها (۲۰۰ میکرولیتر) را به داخل هر چاهک در ستون‌های ۳ تا ۶ و ۸ تا۱۰، همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده‌است، انتقال دهید.

۹-۲-۳ محیط‌کشت سلول بدون سلول‌ها (۲۰۰ میکرولیتر) را به هر چاهک در ستون‌های ۲ ، ۷ و ۱۱، همانطور که در شکل ۲ چاهک‌های هاشور خورده نشان داده شده‌است، به‌طور کامل انتقال دهید. سلول‌ها باید در هر یک از چاهک‌های توخالی به اندازه $۱٫۵ \times ۱۰^{۴}$ سلول/چاهک کاشته شوند.

ستون‌های ۲، ۷ و ۱۱ باید دارای محیط به‌تنهایی و ستون ۶ باید دارای سلول‌ها به‌تنهایی در محیط‌کشت باشند.

یادآوری- چاهک‌های یک ستون منفرد با یک مرحله پی‌پت‌کردن با یک پی‌پت چندکاناله کاشت می‌شوند. به زیربند ۸-۷ مراجعه شود.

1- Confluence



شکل ۲- چیدمان پلیت کشت سلول

۹-۲-۴ پلیت را به آرامی به یک گرم‌خانه مرطوب با دمای ۳۷ °C ±۱ °C و با CO_2 ٪ ۵ منتقل کنید، بنابراین سلول‌ها به‌طور یکنواخت توزیع می‌شوند.

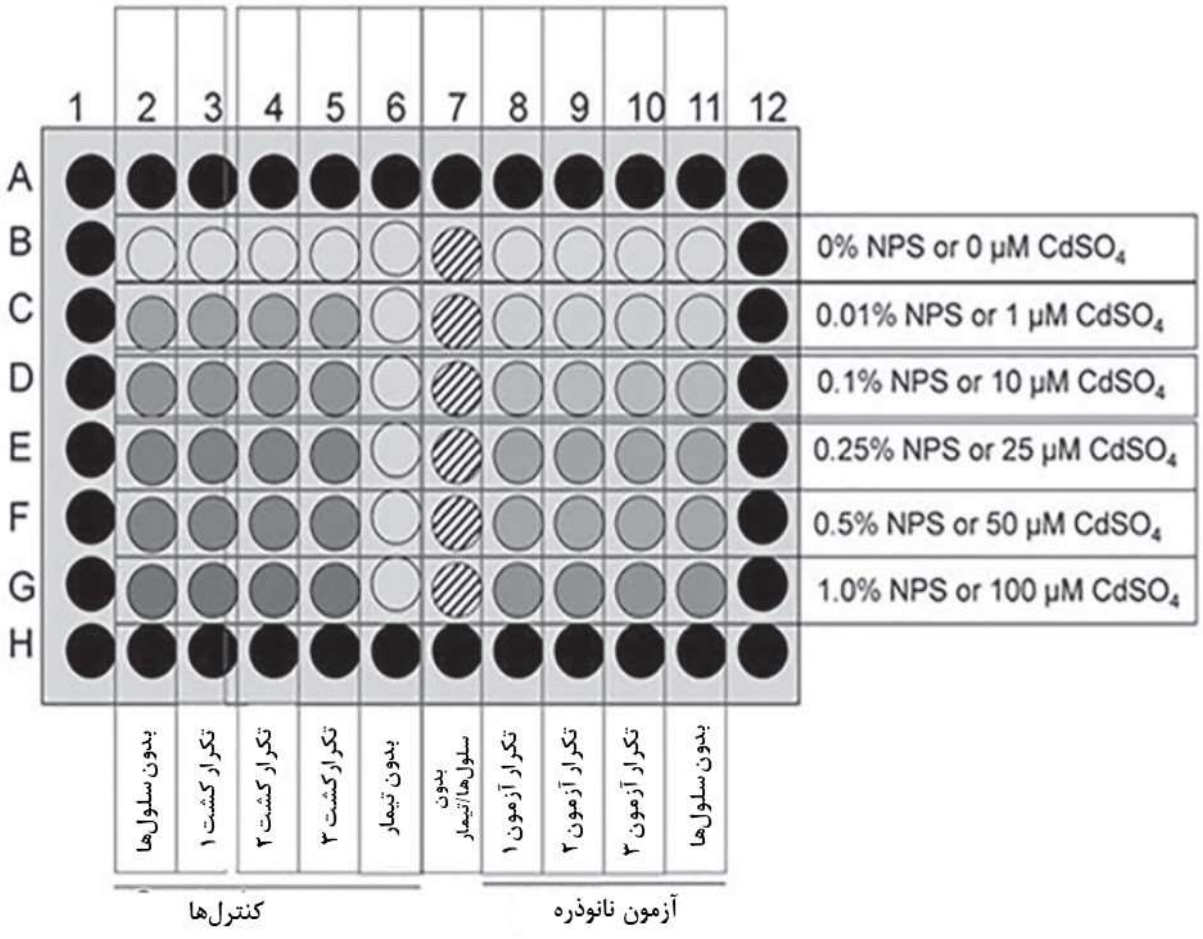
الف- سلول‌ها را به مدت ۲۴ ساعت ± ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری کنید.

ب- بعد از اینکه پلیت سلولی به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد، سلول‌ها را با میکروسکوپ بررسی کنید تا مشخص شود سلول‌ها به‌طور یکنواخت توزیع شده‌اند و همچنین سلامت و ریخت‌شناسی ظاهری سلول‌ها را بررسی کنید.

۹-۳ آماده‌سازی پلیت دُزدهی نانوذرات

۹-۳-۱ شکل ۳ مبنای چیدمان یک پلیت دُزدهی را نشان می‌دهد. ستون‌های ۶ و ۷ چاهک‌ها باید حاوی محیط‌کشت سلول به‌علاوه ٪ ۱ آب باشد. ستون‌های ۲ تا ۵ و ستون‌های ۸ تا ۱۱ به ترتیب حاوی ماده کنترل مثبت و آزمونه دُزهای نانوذرات هستند. ستون ۲ و ستون ۱۱ به ترتیب به‌عنوان چاهک‌های تداخل سنجش برای هر دو کنترل شیمیایی مثبت و آزمونه نانوذره عمل می‌کنند. حجم‌ها باید مطابق با جدول ۲

باشد. محتوای این چاهک‌ها باید به پلیت سلولی با یک پی‌پت هشت‌کاناله در هر مرحله به هر ردیف منتقل شود.



شکل ۳- چیدمان پلیت دُزدهی

یادآوری- درصد وزنی تعلیقه نانوذرات نشان داده‌شده در شکل ۳، مربوط به تعلیقه PS-NP+ است که در بند ۷ شرح داده شده‌است. برای سایر روش‌های آماده‌سازی نانوذره که به درصد وزنی بیشتری در آماده‌سازی دُز نیاز دارند، به راهنمایی در بند ۷ برای تعیین میزان تعلیقه نانوذره برای افزودن به هر دُز و حداکثر درصد حامل مراجعه شود.

۹-۳-۲ آماده‌سازی پلیت دُزدهی

الف- ستون‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ باید سولفات کادمیم در محیط‌کشت را با دُزهای مشخص‌شده در جدول ۲ دریافت کنند.

ب- ستون‌های ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ باید نانوذرات پلی‌استایرن با بار مثبت یا آزمونه نانوذرات در محیط‌کشت را با دُزهای مشخص‌شده در جدول ۲ دریافت کنند.

ت- ستون ۶ و ۷ مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محیط‌کشت را با ٪ ۱ آب دریافت می‌کنند.

یادآوری ۱- غلظت ٪ ۱ آب در محیط‌کشت سلول به غلظت نانوذره استوک بستگی خواهد داشت. برای راهنمایی به بند ۷ مراجعه کنید.

یادآوری ۲- پلیت دُزدهی نانوذرات را تقریباً ۳ ساعت قبل از اینکه پلیت سلول از گرم‌خانه خارج شود، آماده کنید. این امر باعث انتقال فوری محتویات موجود در پلیت دُزدهی به سلول‌ها پس از برداشتن محیط از سلول‌ها می‌شود. این امر همچنین باعث کاهش اثرات ته‌نشینی بلندمدت می‌شود که ممکن است هنگام تعلیق نانوذرات در محیط‌کشت سلول رخ دهد.

جدول ۲- آماده‌سازی محیط‌کشت، مواد شیمیایی و نانوذرات (NP) در پلیت دُزدهی

حروف ردیف افقی	محیط‌کشت سلولی کامل (µl) در ستون‌های ۲ تا ۵ و ۸ تا ۱۱	سولفات کادمیم ماده کنترل مثبت (۱۰۰ mmol/l) در محیط کشت سلولی کامل در ستون‌های ۲ و ۳ (µl)	PS با بار مثبت (۱۰۰µg/ml) در محیط‌کشت سلولی کامل در ستون ۴ (µl)	آزمونه نانوذره (٪ ۱ غلظت تعلیقه) در محیط‌کشت سلولی کامل در ستون‌های ۸ تا ۱۱ (µl)
B	۲۰۰	۰	۰	۰
C	۱۹۸	۲	۲	۲
D	۱۸۰	۲۰	۲۰	۲۰
E	۱۵۰	۵۰	۵۰	۵۰
F	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
G	۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰

۹-۴ قراردادن سلول‌ها در معرض نانوذرات در محیط‌کشت

۹-۴-۱ بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری پلیت سلول، محیط کشت سلول را با یک پی‌پت قرارداده‌شده در لبه پایین چاهک، از هر چاهک خارج کنید.

۹-۴-۲ محتویات هر ستون در پلیت دُزدهی باید با دقت به پلیت سلول منتقل شود. پی‌پت (به‌عنوان مثال یک پی‌پت چندکاناله) را بر روی ۲۰۰ میکرولیتر تنظیم کنید.

۹-۴-۳ سپس پلیت‌ها باید برای مدت ۲۴ ساعت به گرم‌خانه منتقل شوند.

یادآوری- اگر برای سنجش از زمان‌های گرم‌خانه‌گذاری طولانی مدت از جمله ۴۸ ساعت یا ۷۲ ساعت استفاده شود، این به‌این معنا است که مراحل پروتکل این استاندارد برای این زمان‌های گرم‌خانه‌گذاری، صحه‌گذاری شده‌است.

۹-۴-۴ بعد از زمان مواجهه، پلیت‌ها را از گرم‌خانه خارج کنید.

۹-۴-۵ با استفاده از یک پی‌پت و مکش[1] ملایم، تیمارهای دُزدهی و سلول‌های ناسالم غیرچسبیده را خارج کنید.

۹-۵ قراردادن سلول‌ها در معرض سنجش MTS

۹-۵-۱ مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از واکنشگر MTS (۳۱۷ میکروگرم در میلی لیتر) را در محیط‌کشت به هر ستون پلیت سلول، انتقال دهید.

برای جلوگیری از تشکیل حباب‌های هوا، در روش پی‌پت‌کردن از مرحله بیرون ریختن با فشار[2] استفاده نکنید.

۹-۵-۲ سلول‌ها را با واکنشگر MTS در تاریکی به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C در یک اتمسفر ۵ ٪ CO_2 و مرطوب، گرم‌خانه‌گذاری کنید.

یادآوری ۱- ممکن است زمان گرم‌خانه‌گذاری بسته به نوع سلول، غلظت سلول و غلظت واکنشگر MTS متفاوت باشد. این امر خصوصاً درصورت استفاده از سلول‌های نسل اول[3] بیشتر صدق می‌کند. برای یک نوع جدید سلول، آزمایش‌های اولیه[4] برای تعیین زمان مناسب گرم‌خانه‌گذاری انجام می‌شود. به‌عنوان مثال، از زمان موردنیاز برای یک کشت خوب از سلول‌های تیمار نشده‌ای که به چگالی نوری بین ۱٫۰ تا ۲٫۰ (در طول موج ۴۹۰ نانومتر) پس از افزودن واکنشگر **MTS** رسیده باشند، به‌عنوان یک زمان گرم‌خانه‌گذاری مناسب استفاده می‌شود.

یادآوری ۲- واکنشگر MTS نسبتاً برای سلول‌ها غیرسمی است و می‌تواند مستقیماً به محیط مواجهه نانوذرات اضافه شود و نیازی به استفاده از مرحله جداگانه برداشتن محیط که در این استاندارد شرح داده شده‌است، نیست. اگرچه این یک روش ساده‌سازی است ولی این بهینه‌سازی فقط برای تعلیقه‌های نانوذره‌ای که آلایه‌های جذب نوری را ایجاد نمی‌کنند، مفید است. این بهینه‌سازی فقط برای استفاده در مورد نانوذرات خاصی معتبر است.

۹-۶ اندازه‌گیری میزان جذب فورمازان

۹-۶-۱ خوانشگر پلیت را طوری تنظیم کنید که اندازه‌گیری جذب خام برای هر چاهک درون پلیت ثبت شود.

۹-۶-۲ میزان جذب باید با استفاده از یک خوانشگر پلیت در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شود.

۹-۶-۳ میزان جذب در هر چاهک را اندازه‌گیری کنید. هر چاهکی که دارای حباب هوا است را یادداشت کنید.

1- Aspiration
2- Expel step
هنگام استفاده از پی‌پت‌ها معمولا با یک فشار اضافی قطره نهایی جامانده در نوک پی‌پت را خالی می‌کنند. این عمل می‌تواند سبب ایجاد حباب در محیط کشت سلولی گردد. لذا در این استاندارد ذکر شده است تا از انجام این کار در این سنجش خودداری شود.

3- Primary
4- Preliminary

یادآوری ۱- یک روش افزوده که می‌تواند برای تشخیص مشکلات مسیر نوری در چاهک‌های کشت (به‌عنوان مثال حباب‌های هوا، اثرهای انگشت و غیره) استفاده شود، اندازه‌گیری میزان جذب در یک طول موج مرجع است که واکنشگر MTS را تشخیص نمی‌دهد (به‌عنوان مثال طول‌موج ۶۵۰ نانومتر). تغییرات قابل‌توجه بین چاهک‌ها برای این اندازه‌گیری مرجع می‌تواند، وجود انسداد مسیر نوری در یک چاهک را نشان دهد. چنین روش اجرایی قبل از استفاده به‌عنوان بخشی از پروتکل، صحه‌گذاری می‌شود.

یادآوری ۲- پروتکل NanoGo که حاصل از مقایسه بین‌آزمایشگاهی، سمیت‌سلولی نانوذره است یک مرحله سانتریفیوژ جداگانه را برای برداشت نانوذره باقیمانده از مخلوط محیط‌کشت سلول MTS، قبل از خواندن جذب توسط خوانشگر پلیت، به‌کار می‌برد. پس از گرم‌خانه‌گذاری با واکنشگر MTS، پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در g ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شده و محلول رویی به یک پلیت جدید منتقل و در خوانشگر پلیت خوانده می‌شوند [1]. پروتکل این استاندارد را می‌توان با این روش اصلاح کرد، اما روش اجرایی قبل از استفاده عمومی صحه‌گذاری شود.

۱۰ آنالیز زنده‌مانی سلول

یک آنالیز ساده را بر پایه نرم‌افزارهای صفحه گسترده[1]، در مورد داده‌های سمیت انجام دهید.

الف- سطح متوسط پس‌زمینه نانوذرات در محیط‌کشت (مربوط به ستون ۱۱) باید از هر چاهک کم شود.

ب- در یک تکرار فنی، مقدار جذب حاصل از هر چاهک دُزدهی نسبت به مقدار جذب در چاهک بدون تیمار در تکرار فنی (ردیف B) باید نرمال شود. این کاهش پس‌زمینه و مقادیر نرمال‌شده، کسری از سلول‌ها را نشان می‌دهند که پس از دُز تیمار باقی می‌مانند.

ت- پس از نرمال‌سازی، باید از مقادیر یک ردیف منفرد در تکرارهای فنی (به‌عنوان مثال ستون های ۳ تا ۵ یا ۸ تا ۱۰) میانگین گرفته‌شده و انحرافات معیار[2] برای هر شرایط دُز باید تعیین شود.

ث- در صورت مشاهده سمیت، مقدار EC_{50} و یک بازه اطمینان[3] ٪ ۹۵ از داده‌ها را با استفاده از یک نرم‌افزار آنالیز آماری[4] یا سایر برنامه‌های نرم‌افزاری آماری تخمین بزنید.

اگر یک تیمار باعث افزایش تکثیر سلولی شود، به‌نظر می‌رسد که زنده‌مانی افزایش می‌یابد. توصیه می‌شود سنجش‌های تکثیر اضافی مانند BrdU یا شمارش سلول، برای تأیید این نتیجه استفاده شود.

ارزیابی پتانسیل تداخل آلاینده‌های مسیر نوری به سبب دُزدهی نانوذرات می‌تواند با ارزشیابی میانگین و واریانس جذب چاهک‌ها در ستون ۱۱ انجام شود. اگر میانگین جذب و واریانس جذب به‌طور قابل‌توجهی متفاوت از چاهک‌های واکنشگر MTS (ستون ۷) باشد، ممکن است نشان‌دهنده آن باشد که نانوذرات تداخلات آلاینده‌ای دارند [23].

1- Spreadsheet-based analysis
2- Standard deviations
3- Confidence interval

۴- در این استاندارد نرم‌افزار آماری GraphPad Prism پیشنهاد شده‌است.

۱۱ تفسیر نتایج سنجش

سنجش MTS یک آزمون غربالگری است و یک روش سریع برای ارزیابی پتانسیل برهم‌کنش‌های سمی با سلول‌های زیستی را ارائه می‌دهد. به‌طور کلی، یک آزمون غربالگری منفرد برای شرح کامل سمیت یک نانوذره کافی نیست. از نتایج این سنجش باید با نتایج سایر آزمون‌ها استفاده شود تا سازوکار عملکرد سمیت و چگونگی استفاده از داده‌ها در یک مدل ارزیابی ریسک، درک شود.

پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

پتانسیل رده‌های سلولی و سنجش‌ها

رده‌های سلولی قابل‌استفاده در سنجش MTS عبارتند از: ماکروفاژ موش؛ ویروس تغییرشکل‌یافته[1] لوسمی موشی آبلسون (RAW 264.7)[2]، سلول اپیتلیال ریه انسان (A549)[3]، اپیتلیال برونشیال انسانی (BEAS-2B)[4]، اپیتلیال نوع دوم آلوئول موش صحرایی (RLE-6TN)[5]، هپاتوسیت اپیتلیال کبد موش (HEPA-1)[6]، اندوتلیال ریزعروقی انسان (HMEC)[7] و رده‌های سلولی لایه میانی/ قفسه‌سینه‌ای، آئورت موش صحرایی (A10)[8].

این رده‌های سلولی برای ارزشیابی زنده‌مانی سلول در حضور نانوذرات در برخی آزمایش‌ها استفاده شده‌است. رده‌های سلولی دیگر مانند آنچه که در استاندارد ISO 10993-5 شرح داده شده‌است و آزمون سمیت‌سلولی را برای افزاره‌های پزشکی توصیف می‌کند نیز می‌تواند برای استفاده در این پروتکل سازگار باشد، اما صحه‌گذاری مراحل پروتکل موردنیاز است. این رده‌های سلولی شامل جنین موش (Balb/c 3T3)[9]، فیبروبلاست موش (L929)[10] و فیبروبلاست ریه همستر چینی (V79)[11] است.

گرچه از سنجش MTS برای این استاندارد استفاده شده‌است، سایر آزمون‌ها نیز ممکن است برای ارزیابی زنده‌مانی سلول استفاده شوند که شامل MTT [۳-(۵،۴-دی‌متیل تیازول-۲-ایل)-۵،۲-دی‌فنیل‌تیازولیم بروماید]، XTT [۲،۳-بیس-(۲-متوکسی-۴-نیترو-۵-سولفوفنیل) -2H-تترازولیم-۵-کربوکسانیلید] و سایر سنجش‌ها برپایه نمک‌های تترازولیم محلول در آب (به‌عنوان مثال WST-1[12] یا WST-8[13]) است. سنجش MTS یک نسخه بهبودیافته از آزمون MTT است [23].

1- Transformed
2- Abelson murine leukaemia virus transformed
3- Human lung epithelial cell
4- Human bronchial epithelial
5- Rat alveolar type II epithelial
6- Mouse liver epithelial hepatocyte
7- Human microvascular endothelial
8- Rat aorta, thoracic/medial layer
9- Mouse embryo
10- Mouse fibroblast
11- Chinese hamster lung fibroblast
12- 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium,
13- 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium

پیوست ب

(آگاهی‌دهنده)

مثال: سنجش MTS با استفاده از رده سلولی (A549)

(پروتکل EMPA-NIST)

ب-۱ کلیات

پروتکل EMPA-NIST یک پروتکل توسعه‌یافته بدون نظر خاص تخصصی از IANH است که در پیوست **پ** شرح داده شده‌است. این پروتکل شامل آماده‌سازی پلیت دُزدهی و جزئیات دقیق‌تری از کار با سلول است. در این پروتکل از یک رده سلولی A549 برای ارزیابی اثر سمیت‌سلولی نانوذرات سریا[1] و پلی‌استایرن با بار مثبت استفاده شده‌است. مقایسه بین‌آزمایشگاهی بین پنج آزمایشگاه اندازه‌گیری بین‌المللی با استفاده از این پروتکل انجام شده‌است. طرح آزمایشی در مرجع [22] و داده‌های مقایسه‌ای آزمایشگاهی بین‌المللی که در جاهای دیگر منتشر شده، در پایان این پروتکل خلاصه شده‌است. این پروتکل از مرحله سانتریفیوژ برای کاهش پتانسیل اثرات تداخلی نانوذره که در پروتکل NanoGo شرح داده شده‌است، استفاده نمی‌کند.

ب-۲ روش‌های اجرای آزمایش

ب-۲-۱ مبنای روش

اثر نانوذرات بر سمیت‌سلولی A549 با استفاده از نسخه اصلاح‌شده این استاندارد تعیین می‌شود.

ب-۲-۲ مواد

ب-۲-۲-۱ رده سلولی

A549، سلول اپیتلیال انسانی؛ تغییر شکل‌یافته سرطانی (صحه‌گذاری شده با شناسایی DNA کشت‌های سلولی) که باید عاری از مایکوپلاسما باشد.

ب-۲-۲-۲ سنجش

MTS [۳-(۵،۴-دی متیل تیازول-۲-ایل)-۵-(۳-کربوکسی متیوکسی فنیل)-۲-(۴-سولفوفنیل)-۲H-تترازولیم] [2].

ب-۲-۲-۳ محیط شیمیایی و سرم‌ها

1- Ceria

ب-۲-۲-۳-۱ محیط‌کشت (RPMI-1640)[1]

ب-۲-۲-۳-۲ FBS[2] (سرم جنین گاوی، غیرفعال شده حرارتی)

ب-۲-۲-۳-۳ پنی‌سیلین

ب-۲-۲-۳-۴ استرپتومایسین

ب-۲-۲-۳-۵ ال-گلوتامین

ب-۲-۲-۳-۶ ٪ ۰٫۰۵ تریپسین-EDTA[3]

ب-۲-۲-۳-۷ MTS [۳-(۵،۴-دی متیل تیازول-۲-ایل)-۵-(۳-کربوکسی متیوکسی فنیل)-۲-(۴-سولفوفنیل)-H ۲-تترازولیم]

ب-۲-۲-۳-۸ بافر فسفات سالین (PBS) ، [بدون Ca^{2+} و Mg^{2+}]

ب-۲-۲-۳-۹ DMEM[4] بدون فنول رد[5]

ب-۲-۲-۳-۱۰ سولفات کادمیم (کنترل شیمیایی مثبت) [13]

ب-۲-۲-۳-۱۱ نانوذرات پلی‌استایرن با بار مثبت، (قطر <۱۰۰ نانومتر) [نانو ذره کنترل مثبت] [10]

نانوذرات NH_2-PS معلق در آب از آزمایشگاه‌های شرکت بنگز (فیشر، ایندیانا، ایالات متحده)[6]، با شماره سری ۱۰۳۵۱ و شماره موجودی L120117F، (w/v) ٪ ۱۰ فراهم شده‌است، این اطلاعات برای راحتی کاربر از این استاندارد ارائه شده‌است و نشان‌دهنده تأیید توسط سازمان ملی استاندارد ایران برای این محصولات نیست. محصولات معادل که بتوانند نتایج مشابهی نشان‌دهند، ممکن است استفاده شوند.

ب-۲-۲-۳-۱۲ آب مقطر یا هر آب تصفیه‌شده مناسب برای کشت سلول

ب-۲-۲-۳-۱۳ آمفوتریسین B (عامل ضدقارچ)

ب-۲-۳ دستگاه

به بند ۶ مراجعه شود.

1- Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640)
2- Fetal Bovine Serum
3- Ethylenediaminetetraacetic acid
4- Dulbecco's Modified Eagle Medium
5- Phenol red
6- Bangs Laboratories Inc (Fishers, Indiana, US)

ب-۳ آماده‌سازی‌ها

ب-۳-۱ کلیات

همه محلول‌ها (به استثنای محیط‌کشت)، ظروف شیشه‌ای و غیره باید سترون شوند و کلیه مراحل باید تحت شرایط ضدعفونی و در محیط سترون یک هود لامینار (زیستی) انجام شود (مطابق با استاندارد مخاطرات زیستی).

ب-۳-۲ محیط‌کشت

ب-۳-۲-۱ محیط‌کشت

ب-۳-۲-۱-۱ ٪ ۱۰ سرم جنین گاوی (FBS)

ب-۳-۲-۱-۲ ٪ ۹۰ محیط‌کشت (RPMI-1640)

ب-۳-۲-۱-۳ ۱۰ µg/ml استرپتومایسین

ب-۳-۲-۱-۴ ۱۰۰ IU / ml پنی‌سیلین

ب-۳-۲-۱-۵ ۰٫۲ mg/ml L-گلوتامین

ب-۳-۲-۱-۶ ۲٫۵ µg/ml آمفوتریسین B

به‌دلیل پتانسیل تخریب احتمالی ال-گلوتامین، محیط‌کشت نباید بیش از سه هفته ذخیره شود. برچسب زمانی را که برای انجام یک آزمون با توجه به زمان پذیرش محیط‌کشت سلول توصیه می‌شود تا ثبت شود، پاک کنید.

ب-۳-۲-۲ محیط‌کشت سلولی بدون سرم

ب-۳-۲-۲-۱ محیط‌کشت (RPMI-1640) با:

ب-۳-۲-۲-۲ ۱۰ µg/ml استرپتومایسین

ب-۳-۲-۲-۳ ۱۰۰ IU/ml پنی‌سیلین

ب-۳-۲-۲-۴ ۰٫۲ mg/ml L-گلوتامین

ب-۳-۳ آماده‌سازی کشت استوک سلول

ب-۳-۳-۱ یخ‌زدایی سلول

پس از یخ‌زدایی، سلول‌ها باید حداقل دوبار قبل از استفاده در آزمایش‌ها، پاساژ داده شوند. سلول‌ها نباید بیش از سه ماه در محیط‌کشت نگه‌داشته شوند.

بلافاصله پس از یخ‌زدایی و در اولین پاساژ، رشد سلول ممکن است کند باشد.

ب-۳-۳-۲ رشد سلول‌ها [16]

سلول‌ها را در یک فلاسک کشت سلول ۷۵ cm^2 با ۲۰ ml محیط‌کشت در یک گرم‌خانه تحت شرایط استاندارد رشد دهید (۳۷ °C، ۵ ٪ CO_2 در هوای با رطوبت مناسب).

یادآوری ۱- سلول‌های A549 در محیط‌کشت کامل سلولی، کشت می‌شوند (به تهیه واکنشگر در بند ۳-۲ پیوست **پ** مراجعه شود).

یادآوری ۲- سلول‌های A549 به سرعت با یک زمان دوبرابر شدن جمعیت معمول سلولی، ۲۴ ساعت، رشد می‌کنند. هنگامی که سلول‌ها در محیط حاوی فنول رِد رشد می‌کنند یک تغییر رنگ از قرمز به زرد می‌تواند نشان‌دهنده رشد بیش از حد باشد (یعنی کاهش مواد مغذی).

ب-۳-۳-۳ برداشت سلول

ب-۳-۳-۳-۱ محیط‌کشت را از فلاسک خارج کرده و سلول‌ها را دوبار با ۲ میلی‌لیتر PBS بشویید.

ب-۳-۳-۳-۲ مقدار ml ۲ محلول ٪ ۰٫۰۵ تریپسین-EDTA را روی PBS در فلاسک قرار دهید و به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۷ °C، ۵ ٪ CO_2 گرم‌خانه‌گذاری کنید.

ب-۳-۳-۳-۳ سلول‌ها را با تکان‌دادن شدید فلاسک، آزاد کرده و سلول‌ها را منتقل کنید.

ب-۳-۳-۳-۴ سلول‌ها را با افزودن ml ۲۰ محیط‌کشت بافتی با سرم برای غیرفعال‌شدن تریپسین منتقل کنید و کف فلاسک را سه تا پنج‌بار شستشو دهید.

ب-۳-۳-۴ شمارش سلول‌ها برای تعیین سلامت سلول

ب-۳-۳-۴-۱ یک نمونه تقریبا ml ۲۰ (ml ۲ تریپسین- EDTA همراه با ml ۱۸ از محیط‌کشت سلول کامل) تعلیقه سلول را با استفاده از پی‌پت به لوله مخروطی ml ۵۰ منتقل کنید.

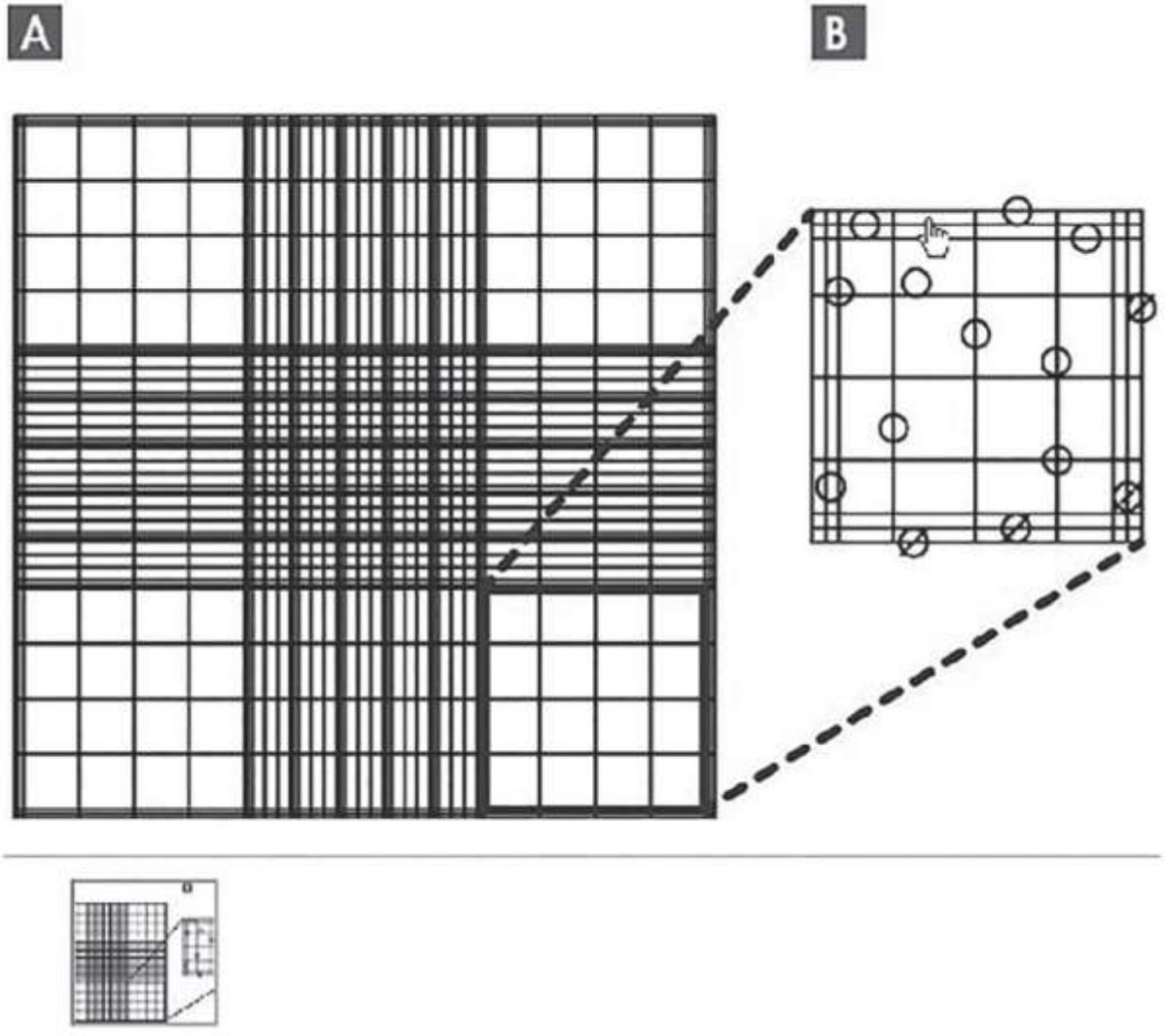
ب-۳-۳-۴-۲ تعلیقه سلول را به منظور رسوب سلول‌ها به‌صورت رسوب قرصی شکل به مدت ۵ دقیقه در g ۲۰۰، سانتریفیوژ کنید.

ب-۳-۳-۴-۳ محلول روماند را خارج کرده و تقریباً ml ۱ محلول محیطی به آن اضافه کرده و دوباره رسوب قرصی شکل را در محلول محیطی تعلیق کنید.

ب-۳-۳-۴-۴ مقدار ۳۰ µl تعلیقه سلولی را برداشته و به ۳۰ µl از ۰٫۴ ٪ (w/v) تریپان بلو/PBS در یک لوله میکروسانتریفیوژ ۲ ml اضافه کنید. محلول را با پی‌پت‌کردن با میکروپی‌پت ۲۰۰ µl مخلوط کنید.

یادآوری- ازآنجاکه سلول‌های زنده نیز پس از مدت زمان طولانی می‌توانند به‌وسیله رنگ تریپان‌بلو لکه‌دار شوند، شمارش سلول را در ۳۰ دقیقه انجام دهید.

ب-۳-۳-۴-۵ با یک لامل در محل، از میکروپی‌پت ۲۰۰ µl برای انتقال ۱۰ µl تعلیقه سلول- تریپان بلو در هر انتهای هموسایتومتر استفاده کنید. سعی کنید از ایجاد حباب داخل هموسایتومتر و لامل اجتناب شود.



شکل ب-۱- طرحواره یک هموسایتوم (محفظه شمارش سلولی)

ب-۳-۳-۴-۶ تمام سلول‌ها را (سلول‌های غیرزنده با رنگ آبی لکه‌دار می‌شوند، سلول‌های زنده، مات می‌مانند) در ۴ مربع، یک میلی‌متر مربعی در گوشه‌ها (A1، A3، A7، A9، B1، B3، B7 و B9 در شکل

ب-۱)، که در مجموع هشت مربع برای شمارش است، بشمارید. سلول‌های قرارگرفته در مرز راست و پایین را حساب نکنید (به قسمت داخلی مراجعه کنید). اگر بیشتر از ٪ ۲۵ سلول‌ها غیرزنده هستند، کشت در مقدار مناسب از محیط نگهداری نشده‌است. تعلیقه سلولی باید کنار گذاشته شود و سلول‌ها باید دوباره کشت شوند.

یادآوری- اگر در هر مربع بزرگ کمتر از ۵۰ یا بیشتر از ۲۰۰ سلول وجود دارد، روش را با تنظیم مجدد برای یک فاکتور رقت مناسب، تکرار کنید.

ب-۳-۳-۴-۷ با استفاده از موارد زیر تعداد سلول‌های واحد حجم (cell/ml) را برای این پروتکل محاسبه کنید

فرمول: غلظت سلول‌ها= متوسط تعداد سلول × فاکتور رقت × $۱۰^{۴}$/ml.

یادآوری- معادله کامل برای استفاده از یک هموسایتومتر در دستورالعمل‌های سازندگان موجود است.

ب-۴ روش اجرایی

ب-۴-۱ کاشت سلول

ب-۴-۱-۱ مقدار $۱۰^{۵}$ × ۷٫۵ سلول (cell/ml $۱۰^{۴}$ × ۷٫۵) برای یک پلیت ۹۶ چاهکی در ۱۰ ml محیط‌کشت سلول کامل به حالت تعلیقه درمی‌آیند.

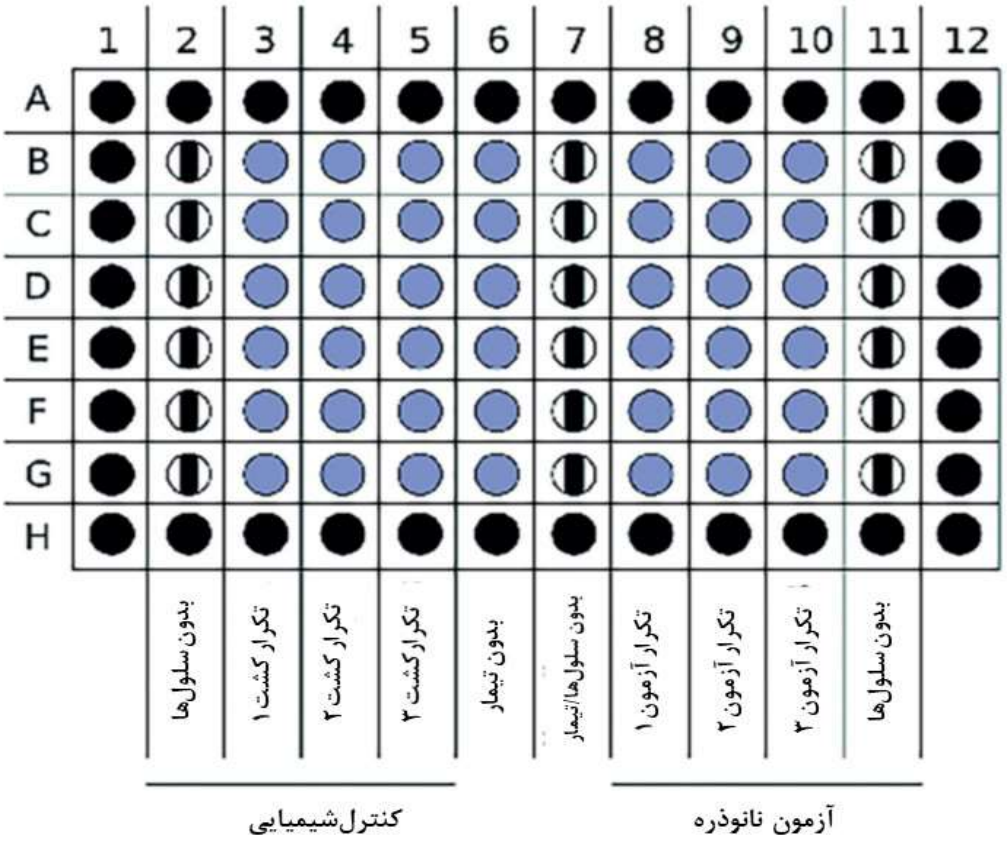
ب-۴-۱-۲ سلول‌ها در هر چاهک آبی رنگ به مقدار $۱۰^{۴}$× ۱٫۵ سلول/چاهک (۲۰۰µl) کاشته می‌شوند (شکل ب-۲ را ببینید) (ستون‌های ۳-۶ و ۸-۱۰).

یادآوری ۱- مهم است که سلول‌ها در یک ستون واحد با یک مرحله پی‌پت‌کردن با پی‌پت چندکاناله کاشته شوند.

یادآوری ۲- چاهک‌های نواربندی‌شده فقط حاوی محیط‌کشت سلول کامل هستند.

یادآوری ۳- چاهک‌های سیاه رنگ ممکن است در هر زمان فقط با محیط‌کشت سلول کامل پُر شوند. اگر از نظر عملیاتی لازم باشد آنها خالی نگه‌داشته می‌شوند.

سلول‌ها با $۱۰^{۴}$ × ۱٫۵ در سلول/چاهک با ۲۰۰µl محیط‌کشت سلول کامل در هر یک از چاهک‌های آبی‌رنگ کاشته می‌شوند. چاهک‌های نواربندی‌شده فقط حاوی محیط‌کشت سلول کامل هستند، درحالی‌که چاهک‌های سیاه رنگ هم می‌توانند (بهتر است) با محیط‌کشت سلول کامل پُر شوند یا خالی بمانند. سلول‌ها در یک ستون واحد باید با یک مرحله پی‌پت چندکاناله کاشته شوند.



شکل ب-۲- کاشت سلول‌ها در پلیت ۹۶ چاهکی

ب-۴-۱-۳ پلیت ۹۶ چاهک با سلول‌های کاشته‌شده، به مدت ۲۴ ساعت در یک دستگاه گرم‌خانه مرطوب در دمای ۳۷ °C با CO_2 ٪ ۵ کشت می‌شوند.

ب-۴-۲ آماده‌سازی غلظت کاری مواد کنترل شیمیایی مثبت

۲۴۰ µl آب سترون (آب مقطر دوبار تقطیر) با ۲۳۷۶ ml محیط‌کشت سلولی بدون سرم مخلوط می‌شود. این مخلوط شماره ۱ # در تمام مراحل زیر برای آماده‌سازی غلظت‌های کاری از کنترل‌های شیمیایی مورداستفاده قرار می‌گیرد:

۱- ۴۰ میکرولیتر از $CdSO_4$ ۱۰ mmol/l با ۳۹۶۰ µl ازمخلوط ۱# = > $CdSO_4$ ۱۰۰ µmol/l مخلوط می‌شود.

۲- ۲۰۰۰ میکرولیتر از $CdSO_4$ ۱۰۰ µmol/l با ۲۰۰۰ µl ازمخلوط ۱# = > $CdSO_4$ ۵۰ µmol/l مخلوط می‌شود.

۳- ۲۰۰۰ میکرولیتر از $CdSO_4$ ۵۰ µmol/l با ۲۰۰۰ µl از مخلوط #۱ = > $CdSO_4$ ۲۵ µmol/l مخلوط می‌شود.

۴- ۲۰۰۰ میکرولیتر از $CdSO_4$ ۲۵ µmol/l با ۳۰۰۰ µl از مخلوط #۱ = > $CdSO_4$ ۱۰ µmol/l مخلوط می‌شود.

۵- ۲۰۰ میکرولیتر از $CdSO_4$ ۱۰ µmol/l با ۱۸۰۰ µl از مخلوط #۱ = > $CdSO_4$ ۱ µmol/l مخلوط می‌شود.

۶- از مخلوط شماره #۱ به عنوان $CdSO_4$ ۰ µmol/l استفاده می‌شود.

یادآوری ۱- مخلوط‌های حاصل قبل از استفاده، برای مراحل رقیق‌سازی بیشتر، ورتکس می‌شوند.

یادآوری ۲- آماده‌سازی قبلی غلظت های کاری کنترل‌های شیمیایی، برای تیمار یک پلیت ۹۶ چاهکی، کافی است. اگر بیش از یک پلیت ۹۶ چاهکی به‌طور هم زمان تیمار شده‌باشد، پس مقادیر متناظر با فاکتور تعداد پلیت تیمارشده را افزایش دهید، اما درغیر این‌صورت نسبت‌ها را یکسان نگه‌دارید.

به‌عنوان مثال: دو پلیت ۹۶ چاهکی:

- ۴۰ × ۲ میکرولیتر از $CdSO_4$ ۱۰ mmol/l با ۳۹۶۰ × ۲ میکرولیتر مخلوط

#۱ = > $CdSO4$ ۱۰۰ µmol/l مخلوط می‌شود.

- ۸۰ میکرولیتر از $CdSO_4$ ۱۰ mmol/l با ۷۹۲۰ میکرولیتر مخلوط #۱ = > $CdSO_4$ ۱۰۰ µmol/l مخلوط می‌شود.

ب-۴-۳ آماده‌سازی غلظت‌های کاری نمونه‌های آزمون نانوذرات

محیط‌کشت سلولی بدون سرم مستقیماً بدون هیچ‌گونه آب افزودنی، استفاده می‌شود. این محیط #۲ است که در تمام مراحل زیر برای آماده‌سازی غلظت‌های کاری نانوذرات استفاده می‌شود:

الف- ۴ µl میکرولیتر از مخلوط $PS\text{-}NH_2$ ۱۰٪ با ۳۹۹۶ µl از محیط #۲ = > $PS\text{-}NH_2$ ۱۰۰ µg/ml مخلوط می‌شود.

ب- ۲۰۰۰ µL از $PS\text{-}NH_2$ ۱۰۰ µg/ml با ۲۰۰۰ µl از محیط #۲ = > $PS\text{-}NH_2$ ۵۰ µg/ml مخلوط می‌شود.

ت- ۲۰۰۰ µL از $PS\text{-}NH_2$ ۵۰ µg/ml با ۲۰۰۰ µl از محیط #۲ = > $PS\text{-}NH_2$ ۲۵ µg/ml مخلوط می‌شود.

ث- ۲۰۰۰ µL از $PS\text{-}NH_2$ ۲۵ µg/ml با ۳۰۰۰ µl از محیط #۲ = > $PS\text{-}NH_2$ ۱۰ µg/ml مخلوط می‌شود.

ج- ۲۰۰ µL از $PS\text{-}NH_2$ ۱۰ µg/ml با ۱۸۰۰ µl از محیط #۲ = > $PS\text{-}NH_2$ ۱ µg/ml مخلوط می‌شود.

ح- محیط ۲ # به‌عنوان $PS\text{-}NH_2$ ۰ µg/ml استفاده می‌شود.

ب-۴-۳-۱ لوله محلول استوک اولیه $PS\text{-}NH_2$ ٪ ۱۰ با حلال باید بر روی ورتکس و قبل از افزودن محلول حاوی نانوذرات توزیع‌شده قرار گیرد.

ب-۴-۳-۲ مخلوط‌های محیط- نانوذره $PS\text{-}NH_2$ حاصل باید قبل از استفاده برای مراحل رقیق‌سازی و ورتکس و قبل از اینکه برای تیمار استفاده شوند، دوباره ورتکس شوند.

یادآوری – آماده‌سازی قبلی غلظت‌های کاری تعلیقه نانوذرات برای تیمار یک پلیت ۹۶ چاهکی کافی است. اگر بیش از یک پلیت ۹۶ چاهکی به‌طور هم زمان تیمار شده‌باشد، پس مقادیر مربوطه با فاکتور تعداد پلیت تیمارشده را افزایش دهید، اما در غیراین‌صورت، نسبت‌ها را یکسان نگه‌دارید.

به‌عنوان مثال: دو پلیت ۹۶ چاهکی:

- ۴ µl × ۲ از $PS\text{-}NH_2$ ٪ ۱۰ با ۳۹۹۶ µl × ۲ از محیط #۲ =< $PS\text{-}NH_2$ µg/ml ۱۰۰ مخلوط می‌شود یا

- ۸ µl از $PS\text{-}NH_2$ ٪ ۱۰ با ۷۹۹۲ µl از محیط #۲ =< $PS\text{-}NH_2$ µg/ml ۱۰۰ مخلوط می‌شود.

ب-۴-۴ تیمار سلول‌های A549 با مواد کنترل‌کننده مثبت شیمیایی و نانوذرات

ب-۴-۴-۱ چاهک‌های ستون‌های ۲-۵ و ستون‌های ۸-۱۱، با پمپاژ کامل محلول رویی محیط‌کشت سلول‌ها تخلیه می‌شوند.

ب-۴-۴-۲ شستشو با PBS: چاهک‌های ستون‌های ۲-۵ و ستون‌های ۸-۱۱ با ۲۰۰ µl PBS در هرچاهک هر بار پر می‌شوند و سپس به‌طور کامل تخلیه می‌شوند. این مرحله شستشو سه بار تکرار می‌شود.

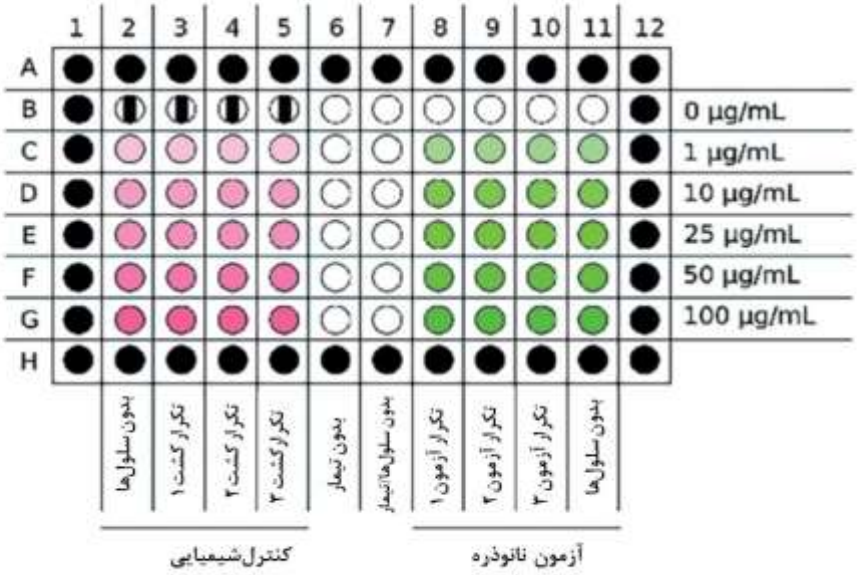
ب-۴-۴-۳ ستون‌های ۸-۱۱ بلافاصله با غلظت‌های کاری نانوذرات مطابق با طرح پلیت نشان داده‌شده در شکل ب-۳ تیمار می‌شوند.

ب-۴-۴-۴ ستون‌های ۲-۵ بلافاصله با غلظت کاری کنترل شیمیایی مطابق با طرح پلیت نشان داده‌شده در شکل ب-۳ تیمار می‌شوند.

ب-۴-۴-۵ پلیت ۹۶ چاهکی به مدت ۲۴ ساعت پس از تیمار در دستگاه گرم‌خانه مرطوب در ۳۷ °C با ۵ ٪ CO_2 کشت داده می‌شود.

چاهک‌های سفید رنگ حاوی محیط‌کشت سلول کامل هستند، درحالی‌که چاهک‌های سیاه رنگ می‌توانند حاوی محیط‌کشت سلول کامل باشند یا خالی بمانند. چاهک‌های نواربندی‌شده حاوی مخلوط (۱) است.

ستون‌های ۸-۱۱ و ۲-۵، ستون به ستون با یک پی‌پت (چندکاناله) ۱۰ کاناله (µl ۲۰۰) تیمار می‌شود.



شکل ب-۳- طرح پلیت دُزدهی

ب-۴-۵ اندازه‌گیری سمیت‌سلولی

زنده‌مانی سلول با استفاده از سنجش MTS تعیین می‌شود، که اندازه‌گیری [۳-(۴،۵-دی‌متیل تیازول-۲-ایل)-۵-(۳-کربوکسی‌متوکسی‌فنیل)-۲-(۴-سولفوفنیل)-۲H-تترازولیم] (MTS) در حضور متوسولفات فنازین (PMS) است. این یک محصول فورمازان تولید می‌کند که دارای حداکثر جذب در ۴۹۰ نانومتر تا ۵۰۰ نانومتر است. پس از گرم‌خانه‌گذاری با دُزهای مشخص‌شده از NP به مدت ۲۴ ساعت در °C ۳۷، جذب فورمازان در ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

الف- ۲٫۵ میلی‌لیتر از واکنشگر MTS با ۱۲٫۵ میلی‌لیتر محیط RPMI-1640 (بدون فنول رد) مخلوط می‌شود. این، مخلوط (۳) نامیده می‌شود. هیچ افزایشی از سرم، L- گلوتامین، پنی‌سیلین و استرپتومایسین به محیط RPMI-1640 (بدون فنول رِد) وجود ندارد.

ب- تمام ۹۶ چاهک پلیت کاملاً از محلول رویی محیط‌کشت سلول با پمپاژ به وسیله پی‌پت تخلیه می‌شوند.

ت- تمام ۹۶ چاهک پلیت بلافاصله با ۱۲۰µl در هر چاهک از مخلوط (۳) پر می‌شوند.

ث- پلیت ۹۶ چاهکی به مدت ۶۰ دقیقه در گرم‌خانه مرطوب در دمای ۳۷ °C با ۵ ٪ CO_2 گرم‌خانه‌گذاری می‌شود.

ج- اندازه‌گیری‌های جذب با خوانشگر پلیت در طول موج ۴۹۰ نانومتر انجام می‌شود.

ح- از این نتایج جذب خام برای ارزیابی دقیق سنجش آزمون استفاده می‌شود.

این مشخصات کنترلی (به جدول ب-۱ مراجعه شود) برای دستیابی به اطمینان از اندازه‌گیری آزمون سمیت‌سلولی نانو MTS بسیار مهم است. اطلاعات بیشتر در مورد کنترل‌ها را می‌توان در مرجع [22] یافت.

جدول ب-۱- مشخصات سامانه برای سنجش MTS تعریف‌شده در مقایسه بین‌آزمایشگاهی برای سلول‌های A549

کنترل	محیط حاوی سرم		
	مقادیر هدف	محدوده	تغییرپذیری
کنترل شیمیایی پس‌زمینه[1]	۰٫۰۶ OD	۰٫۰۵ -۰٫۰۹ OD	بیشتر از ٪ ۶
کنترل سولفات کادمیم (مقادیر EC50، چاهک B3-G5)	۷۷٫۲ µmol/l	۹۹٫۴-۵۴٫۳ µmol/l	
تغییرپذیری در پی‌پت (چاهک‌های B6-G6)	۲٫۰ OD	۲٫۳-۱٫۸ OD	بیشتر از ٪ ۷
بدون سلول و هیچ تیمار کنترل (چاهک‌های B7-G7)	۰٫۰۶ OD	۰٫۰۹-۰٫۰۵ OD	بیشتر از ٪ ۶
نانوذره پس‌زمینه[2] (چاهک‌های B11-G11)	ND		
تغییرپذیری بین پی‌پتی (چاهک‌های B3-B5، B8-B10)	۱٫۵ OD	۱٫۸-۱٫۳ OD	بیشتر از ٪ ۱۲

۱- اگر هیچ پس‌زمینه اضافی از کنترل واکنش شیمیایی مشاهده نشود.

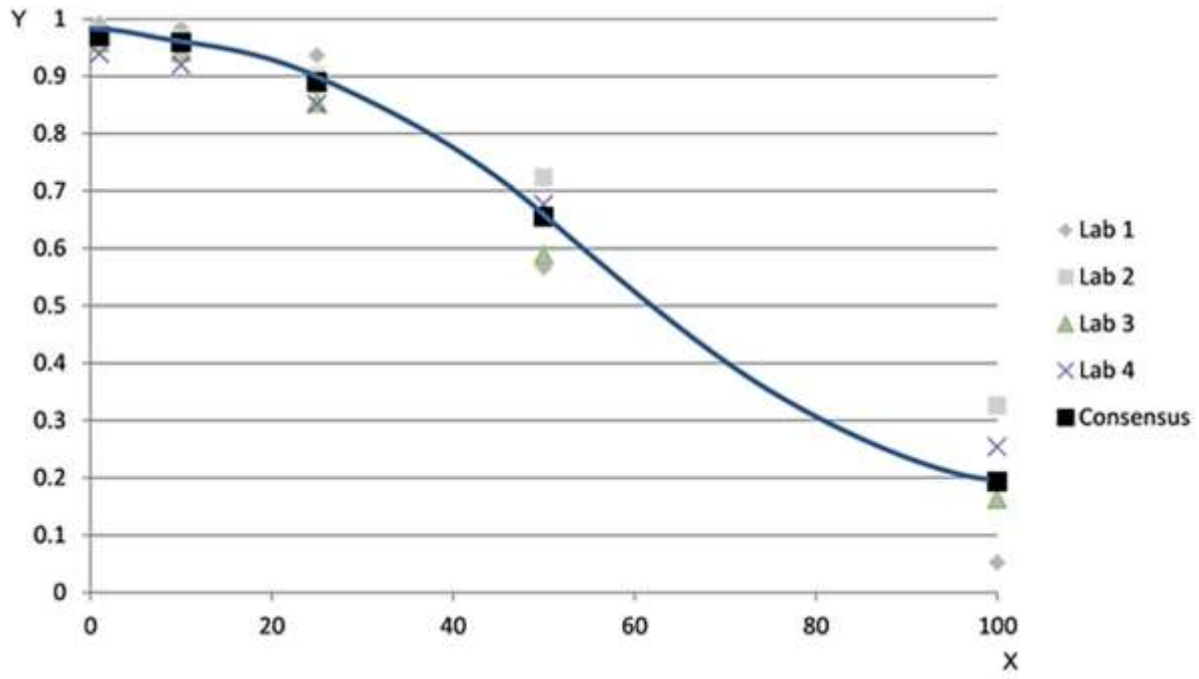
۲- هیچ مقداری داده نشده‌است، زیرا برخی از آزمایشگاه‌ها سیگنال پس‌زمینه را مشاهده می‌کنند، درحالی‌که برخی دیگر این کار را انجام نمی‌دهند.

ب-۴-۶ منحنی‌های نماینده دُز- پاسخ به سمیت‌سلولی

ب-۴-۶-۱ شکل ب-۴ منحنی نماینده دُز- پاسخ سمیت‌سلولی را از ۵ آزمایشگاه مختلف نشان می‌دهد.

ب-۴-۶-۲ هر نقطه داده باید به‌طور متوسط مقادیر جذب از چندین تکرار در هر آزمایشگاه باشد. اجماع منحنی‌های دُز- پاسخ را می‌توان از طریق فنون مدل‌سازی مونت کارلو[1] تولید کرد. شکل براساس شکل 3c از مرجع [2] بوده و با استفاده از نرم افزار استخراج داده از نمودار[2] تولید شده‌است.

1- Monte Carlo modeling techniques
2- Plot Digitizer v2.6.8



راهنما:

X غلظت دُز PS-NP + (µg/ml)

Y جذب منسوب در ۴۹۰ نانومتر

شکل ب-۴- منحنی های دُز- پاسخ از ۵ آزمایشگاه مختلف برای تیمار PS-NP + روی سلول A549 در محیط حاوی سرم

پیوست پ
(آگاهی‌دهنده)
مثال: سنجش MTS با استفاده از رده سلولی RAW 264.7 (پروتکل IANH)

پ-۱ کلیات

پروتکل سنجش MTS از طریق معاهده بین‌المللی یکسان‌سازی NanoEHS (IANH) در سال ۲۰۰۸ تدوین شده و در مراحل اولیه مقایسه بین‌آزمایشگاهی بین اعضاء IANH مورداستفاده قرارگرفته است. این پروتکل برای بررسی نرخ رشد و زنده‌مانی سلول، در رده سلولی RAW 264.7 اعمال شده و سپس برای ارزیابی اثر سمیت‌سلولی نانوذرات پلی‌استایرن با بار مثبت و سریا[1] به‌کاررفته است. داده‌های این مطالعه منتشر نشده، اما در شکل‌ها در این پیوست ارائه شده‌است.

پ-۲ روش آزمایش

پ-۲-۱ مبنای روش

پ-۲-۱-۱ کلیات

سلامت و نرخ رشد سلول‌های RAW 264.7 با استفاده از زیربند ۸-۴ این استاندارد صحه‌گذاری می‌شود. اثر نانوذرات بر روی سمیت‌سلولی سلول RAW 264.7 با استفاده از بندهای ۹ و ۱۰ این استاندارد تعیین می‌شود.

پ-۲-۱-۲ مواد

پ-۲-۱-۲-۱ رده سلولی

ماکروفاژ موش، RAW 264.7، لوسمی موشی ابلسون تغییرشکل‌یافته در اثر ویروس (صحه‌گذاری‌شده با شناسایی DNA)، «مجموعه کشت نوع آمریکایی[2] (ATCC)[3]»، «کشت‌های سلولی از مجموعه اروپایی»[4]، کشت‌های سلولی باید عاری از مایکوپلاسما باشد.

پ-۲-۱-۲-۲ سنجش

MTS [۳-(۵،۴-دی متیل تیازول-۲-ایل)-۵-(۳-کربوکسی متیوکسی فنیل)-۲-(۴-سولفوفنیل)-۲ H-تترازولیم]/PMS- متوسولفات فنازین

پ-۲-۱-۲-۳ محیط‌های شیمیایی و سرم‌ها

1- Ceria
2- American Type Culture Collection
3- Manassas, VA, USA; ECACC No. 88102702
4- European Collection of Cell Cultures, Salisbury,Wiltshire SP4 OJG, UK.

پ-۲-۱-۲-۳-۱ محیط DMEM[1]

پ-۲-۱-۲-۳-۲ FBS (سرم جنین گاوی) (غیرفعال شده در حرارت)

پ-۲-۱-۲-۳-۳ پنی‌سیلین

پ-۲-۱-۲-۳-۴ استرپتومایسین

پ-۲-۱-۲-۳-۵ ال-گلوتامین

پ-۲-۱-۲-۳-۶ ٪ ۰٫۰۵ تریپسین-EDTA

پ-۲-۱-۲-۳-۷ MTS [۳-(۵،۴-دی متیل تیازول-۲-ایل)-۵-(۳-کربوکسی متیوکسی فنیل)-۲-(۴-سولفوفنیل)-H ۲-تترازولیم]

پ-۲-۱-۲-۳-۸ بافر فسفات سالین، (PBS) [بدون Ca^{2+} و Mg^{2+}]

پ-۲-۱-۲-۳-۹ DMEM بدون فنول رد

پ-۲-۱-۲-۳-۱۰ سولفات کادمیم (کنترل شیمیایی مثبت) [13]

پ-۲-۱-۲-۳-۱۱ نانوذرات دی‌اکسید سریم (سریا) (قطر تقریبا ۱۰۰نانومتر) [کنترل منفی ذره]

پ-۲-۱-۲-۳-۱۲ نانوذرات پلی‌استایرن با بار مثبت، (قطر <۱۰۰ نانومتر) [کنترل مثبت نانو ذره] [10]

NH_2-PS NP معلق‌شده در آب از آزمایشگاه‌های شرکت بنگز (فیشر، ایندیانا، ایالات متحده)[2]، با شماره بهر ۱۰۳۵۱ و شماره موجودی L120117F، (w/v) ٪ ۱۰ فراهم شده‌است، این اطلاعات برای راحتی استفاده‌کننده از این استاندارد ارائه شده‌است و نشان‌دهنده تأیید این محصولات نیست. محصولات معادل که بتوانند نتایج مشابهی نشان‌دهند، ممکن است استفاده شوند.

پ-۲-۱-۲-۳-۱۳ آب مقطر یا هر آب تصفیه‌شده مناسب برای کشت سلول

پ-۲-۱-۲-۳-۱۴ آمفوتریسین B (عامل ضد قارچ)

پ-۲-۱-۳ دستگاه

به بند ۶ مراجعه شود.

پ-۳ آماده‌سازی

1- Dulbecco’s Modified Eagle Medium
2- Fishers, Indiana, US

پ-۳-۱ کلیات

همه محلول‌ها (به استثنای محیط‌کشت)، ظروف شیشه‌ای و غیره باید سترون باشند و کلیه مراحل باید تحت شرایط سترون و در محیط سترون یک هود لامینار (زیستی) انجام شود (مطابق با استاندارد مخاطرات زیستی).

پ-۳-۲ محیط‌کشت

برای کشت معمول:

- ٪ ۱۰ سرم جنین گاوی (FBS) (غیرفعال‌سازی شده با حرارت)

- ٪ ۹۰ محیط‌کشت DMEM

- ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین

- ۶۰ میکروگرم در میلی لیتر پنی‌سیلین (۱۰۰ IU/ml)

- ۲۹۲ mg/ml L-گلوتامین

- ۲٫۵ µg/ml آمفوتریسین B

به‌دلیل پتانسیل تخریب احتمالی ال-گلوتامین، محیط‌کشت نباید بیش از سه هفته ذخیره شود. توصیه می‌شود با توجه به زمان پذیرش محیط‌کشت سلول، برای ثبت زمان انجام برچسب‌گذاری به‌صورت شفاف انجام شود.

پ-۳-۳ آماده‌سازی کشت استوک/استوک سلول

پ-۳-۳-۱ روش یخ‌زدایی سلول

پ-۳-۳-۱-۱ محیط‌کشت (٪ ۱۰ FBS) را به درون یک لوله سانتریفیوژ منتقل کرده، روی یخ قرار داده و اجازه دهید به مدت ۵ دقیقه خنک شود.

پ-۳-۳-۱-۲ سلول‌های یخ‌زده را در حمام آب ۳۷ °C یخ‌زدایی کنید تا مقدار کمی یخ باقی بماند. (ذوب‌شدن بعد از بیرون آوردن از حمام آب، ادامه خواهد یافت).

پ-۳-۳-۱-۳ سلول‌ها را با تراش و آسپیراسیون ملایم با یک پی‌پت خارج کنید.

پ-۳-۳-۱-۴ سلول‌ها را به‌صورت قطره‌وار به یک لوله سانتریفیوژ ۱۵ ml حاوی محیط‌کشت اضافه کنید.

پ-۳-۳-۱-۵ سلول‌ها و محیط‌کشت را در سانتریفیوژ با ۴۰۰ g به مدت ۵ دقیقه بچرخانید و محیط‌کشت را خارج کنید.

پ-۳-۳-۱-۶ سلول‌ها را در ۱۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت در لوله سانتریفیوژ ۱۵ ml (۱۰ ٪ FBS) دوباره تعلیق کنید.

پ-۳-۳-۱-۷ سلول‌ها و محیط‌کشت را در سانتریفیوژ با ۴۰۰g به مدت ۵ دقیقه بچرخانید و محیط‌کشت را خارج کنید.

یادآوری- توجه داشته باشید به‌طور قابل‌توجهی در مراحل پ- ۳-۳-۱-۴ و پ- ۳-۳-۱-۶ محافظ DMSO در محیط‌کشت سلول رقیق شده‌است (یعنی خارج شده‌است).

پ-۳-۳-۱-۸ سلول‌ها را دوباره در محیط‌کشت ۵ ml (۱۰ ٪ FBS) قراردهید و به یک فلاسک کشت بافت ۲۵ cm^2 منتقل کنید.

پ-۳-۳-۲ رشد سلول‌ها [17]

پ-۳-۳-۲-۱ سلول‌ها را یک‌بار به آرامی با محیط‌کشت بشویید و محیط‌کشت را هر ۲-۳ روز تعویض کنید. از ۱۵ میلی‌لیتر محیط (۱۰ ٪ FBS) برای فلاسک کشت بافت ۷۵ cm^2 یا ۵ ml برای فلاسک کشت بافت ۲۵ سانتی‌متر مربع استفاده کنید.

پ-۳-۳-۲-۲ قبل از پاساژ، سلول‌ها را در دمای ۳۷ °C، ۵ ٪ CO_2 رشد دهید.

سلول‌های RAW 264.7 به‌صورت چسبیده به فلاسک رشد داده می‌شوند.

با یک میکروسکوپ استریو اطمینان حاصل کنید که سلول‌ها بیشتر از ۸۰ ٪ از محل تلاقی تجاوز نکرده‌اند.

پ-۳-۳-۳ پاساژ یا تقسیم سلول‌ها

پ-۳-۳-۳-۱ سلول‌ها را با ۵ ml محیط گرم یا محیط در دمای اتاق بشویید.

پ-۳-۳-۳-۲ سلول‌ها و محیط‌کشت را با استفاده از پی‌پت و خراش ملایم از فلاسک استخراج کنید.

پ-۳-۳-۳-۳ سلول‌ها و محیط‌کشت را به یک لوله سانتریفیوژ منتقل کنید.

پ-۳-۳-۳-۴ فلاسک را با محیط‌کشت بشویید و به لوله سانتریفیوژ اضافه کنید.

پ-۳-۳-۳-۵ سلول‌ها و محیط‌کشت را به مدت ۵ دقیقه با ۴۰۰ g سانتریفیوژ کرده و محیط‌کشت را خارج کنید.

پ-۳-۳-۳-۶ سلول‌ها را در محیط‌کشت دوباره تعلیق کنید.

پ-۳-۳-۳-۷ برای اطمینان از رشد مطلوب، سلول‌ها را به نسبت ۱ به ۴ یا ۱ به ۵ تقسیم کنید.

پ-۳-۳-۴ آماده‌سازی کشت برای آزمایش‌ها

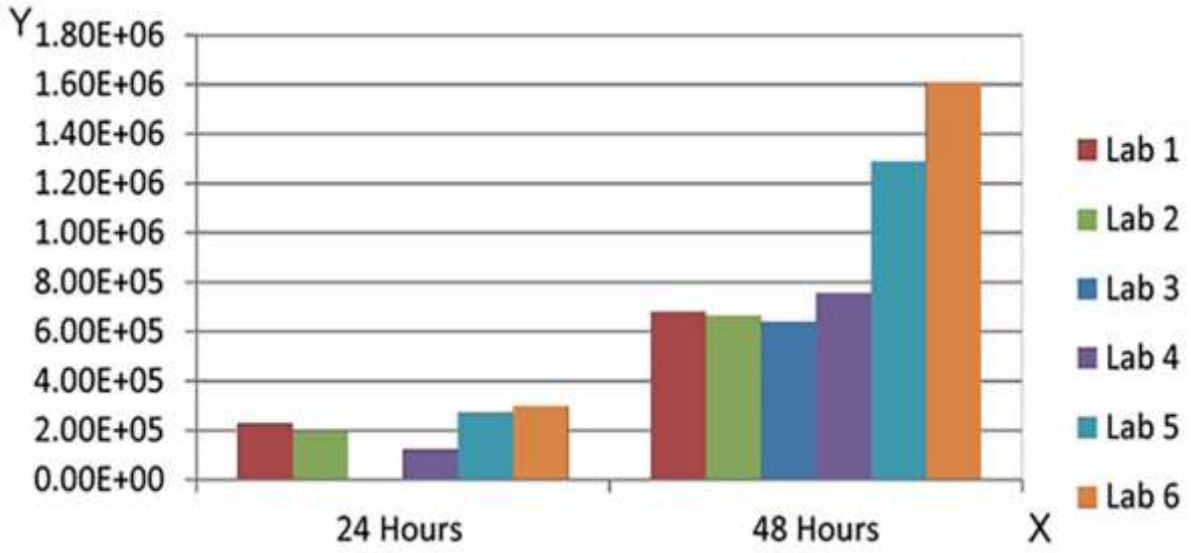
سلول‌ها را در محیط‌کشت (٪ ۱۰ FBS) بدون فنول رد به غلظت ۲×۱۰^{۵} cell/ml تعلیق کنید.

پ-۳-۳-۵ صحه‌گذاری رشد و زنده‌مانی سلول

با استفاده از زیربند ۸-۴ این استاندارد، نرخ رشد و ماندگاری سلول RAW 264.7 را صحه‌گذاری کنید.

پ-۳-۴ نتایج نرخ رشد IANH و ارزیابی زنده‌مانی سلول

دو فاکتور مهم برای ارزیابی در سلامت سلول‌ها، نرخ رشد و زنده‌مانی از طریق زمان آزمایش‌ها است. شش گروه در IANH این آزمایش‌ها را انجام داده و تعیین کردند که سلول‌ها در طی ۲۴ ساعت تکثیر و دوبرابر می‌شوند و همانطور که در شکل پ-۱ نشان داده شده‌است، در ۴۸ ساعت به تکثیر خود را ادامه می‌دهند. علاوه‌بر این، بیشتر گروه‌ها دریافتند که بیش از ٪ ۹۰ سلول‌ها در طی ۴۸ ساعت آزمایش‌ها زنده مانده‌اند که در شکل پ-۲ نشان داده شده‌است.



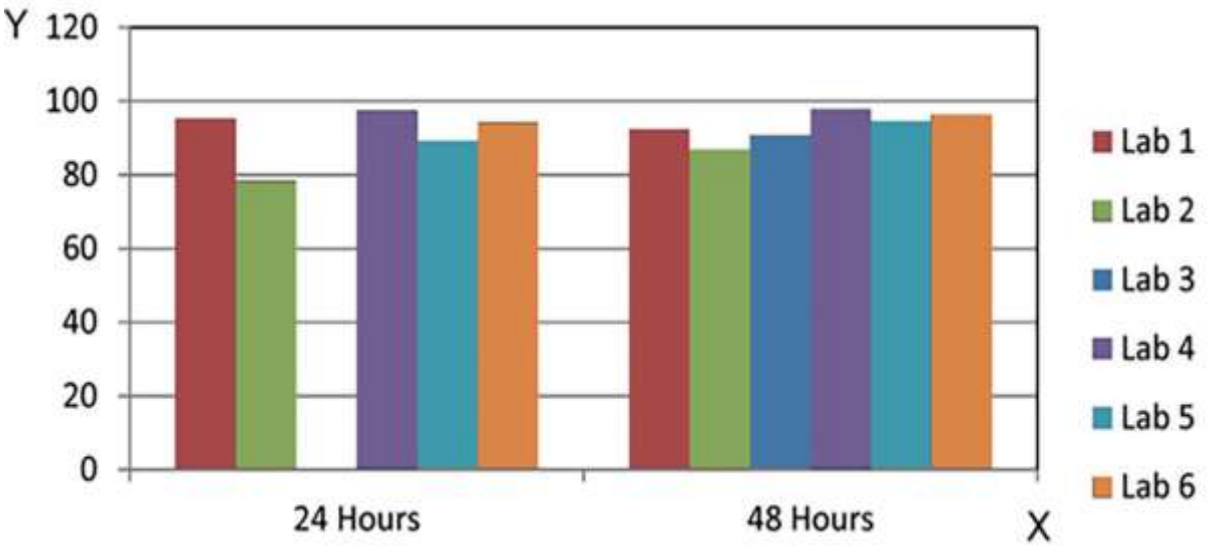
راهنما:

X زمان رشد

Y تعداد سلول

آزمایشگاه ۳، نرخ رشد را در ۲۴ ساعت اندازه گیری نکرد.

شکل پ-۱- تعداد سلول‌های RAW 264.7 در شش آزمایشگاه مختلف در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت



راهنما:

X زمان رشد

Y ماندگاری سلول (٪)

آزمایشگاه ۳، در ۲۴ ساعت زنده‌مانی را اندازه‌گیری نکرد.

اغلب آزمایشگاه‌ها توانایی بیش از ٪ ۹۰ را برای ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت گزارش کردند.

شکل پ-۲- اندازه گیری ماندگاری سلول RAW 264.7 در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت

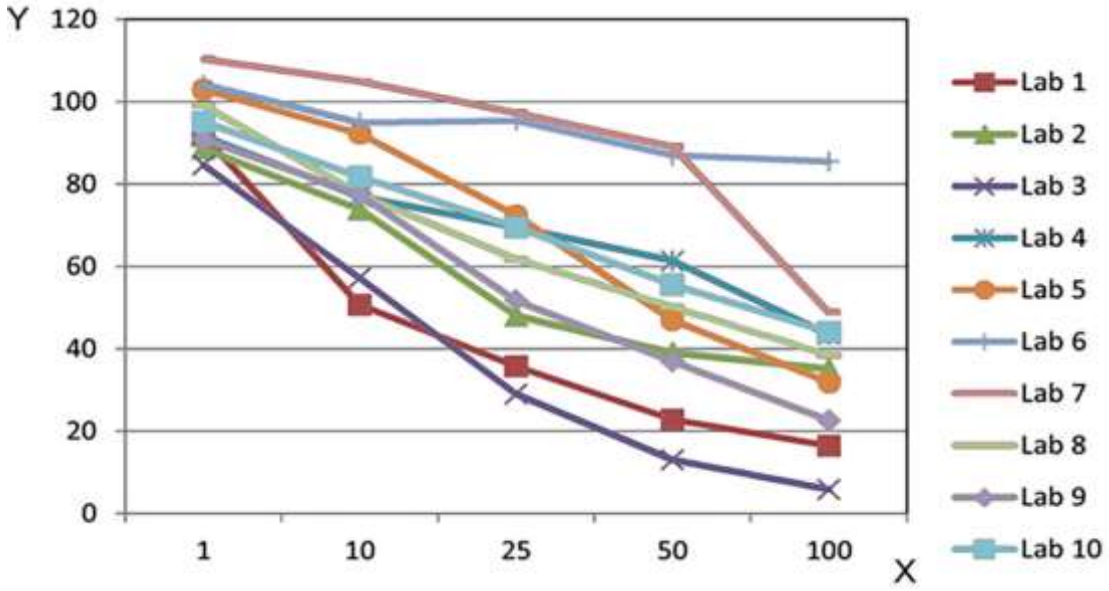
پ-۴ ارزیابی سمیت‌سلولی نانوذرات در سلول‌های RAW 264.7

پ-۴-۱ تمام مراحل مندرج در بند ۹ را با نانوذرات پلی‌استایرن با بار مثبت و سریا و سلول‌های RAW 264.7 انجام دهید.

پ-۴-۱ تجزیه وتحلیل سمیت‌سلولی را با استفاده از روش مندرج در بند ۱۰ انجام دهید.

پ-۵ اثر مواجهه نانوذرات بر زنده‌مانی سلول RAW 264.7

مواجهه سلول‌های RAW 264.7 در برابر پلی‌استایرن با بار مثبت منجر به یک کاهش در زنده‌مانی سلول با افزایش غلظت و زمان می‌شود، همانگونه که در شکل پ-۳ و پ-۴ نشان داده شده‌است. از طرف دیگر، مواجهه سلول‌های RAW 264.7 با ذرات سریا (۲۰۰ نانومتر) زنده‌مانی را کاهش نمی‌دهد، اما باعث افزایش جذب می‌شود، همانگونه که در شکل پ-۵ نشان داده شده‌است. باز هم، پراکندگی قابل‌توجهی در داده‌های جذب وجود دارد.



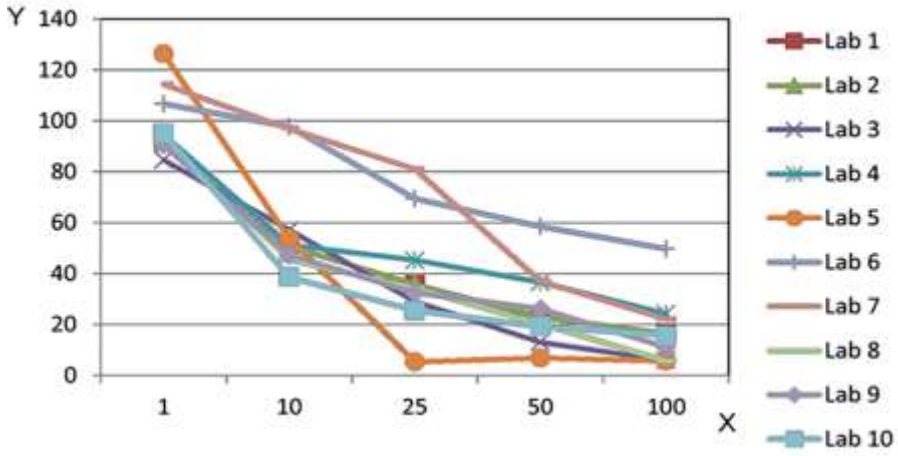
راهنما:

X دُز مواجهه (µg/ml)

Y زنده‌مانی سلول (٪)

شکل پ-۳- زنده‌مانی سلول RAW 264.7 پس از ۶ ساعت مواجهه با پلی‌استایرن با بار مثبت

ده آزمایشگاه نتایج را پس از ۶ ساعت مواجهه گزارش کرده‌اند که همگی با افزایش دُز مواجهه، کاهش زنده‌مانی سلول را گزارش داده‌اند؛ بااین‌حال، پراکندگی قابل‌توجهی در داده‌ها وجود دارد.



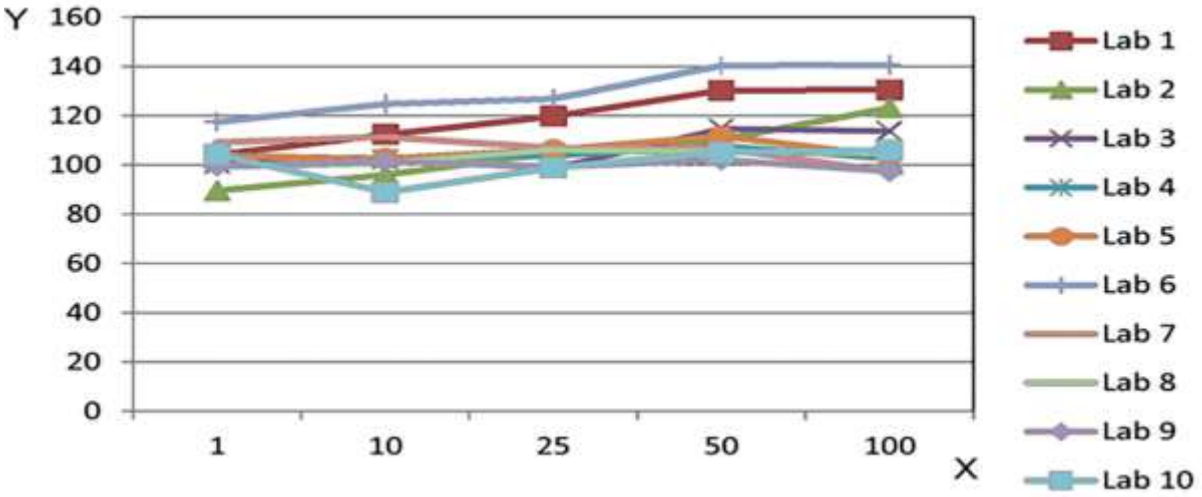
راهنما:

X دُز مواجهه (µg/ml)

Y زنده‌مانی سلول (٪)

شکل پ-۴- زنده‌مانی سلول RAW 264.7 پس از ۲۴ ساعت قرارگرفتن در معرض پلی استایرن با بار مثبت

ده آزمایشگاه نتایج را پس از ۲۴ ساعت مواجهه گزارش کرده‌اند که همگی با افزایش دُز مواجهه، کاهش زنده‌مانی سلول را گزارش داده‌اند؛ بااین‌حال، پراکندگی قابل‌توجهی در داده‌ها وجود دارد.



راهنما:

X دُز مواجهه (µg/ml)

Y زنده‌مانی سلول (٪)

شکل پ-۵- زنده‌مانی سلول RAW 264.7 پس از ۲۴ ساعت مواجهه با ذرات سریا ۲۰۰ نانومتر

ده آزمایشگاه نتایج را پس از ۲۴ ساعت مواجهه گزارش کردند و همگی در این گزارش‌ها بیان کردند که با افزایش دُز مواجهه، هیچ کاهشی در زنده‌مانی سلولی وجود ندارد. بااین‌حال، پراکندگی قابل‌توجهی در داده‌ها وجود دارد.

یادآوری- تیم NanoGo سلول‌ها و نانوذرات را با مراحل سانتریفیوژ حذف کردند (به یادآوری ۲ در زیربند ۹-۶-۳ مراجعه شود) و یک توزیع بسیار محدودتر از زنده‌مانی سلول‌ها برای چندین رده سلولی و نانوذرات داشتند. آنها دریافتند که علاوه‌بر این، انحراف معیار میانگین تا ٪ ۳۰ بین آزمایشگاه‌ها با این مراحل کاهش می‌یابد. همچنین این مراحل موجب کاهش انحراف معیار میانگین تا ٪ ۴۰ در یک آزمایشگاه با چندین نانوذره و رده سلول می‌شود. بدین ترتیب، حذف سلول‌ها و نانوذرات باعث کاهش تغییرپذیری در نتایج سمیت‌سلولی می‌شود و مهم است.

کتاب‌نامه

[1] Xia T., Hamilton R.F., Bonner J.C., Crandall E.D., Elder A., Fazlollahi F. Interlaboratory Evaluation of *in Vitro* Cytotoxicity and Inflammatory Responses to Engineered Nanomaterials: The NIEHS NanoGo Consortium. Environ. Health Perspect. 2013, **121** pp. 683–690

[2] Elliott J.T., Rösslein M., Song N.W., Toman B., Kinsner-Ovaskainen A., Maniratanachote R., Salit M .L., P etersen E .J., S equeira F ., L ee J ., K im F. Rossi, S.J., Hirsch, C., Krug, H.F.,
Suchaoin, W., and Wick, P. Toward Achieving Harmonization in a Nano-cytotoxicity Assay Measurement through an Interlaboratory Comparison Study. ALTEX. 2016 Sep 29. doi:.10.14573/altex

[3] Cory A .H., O wen T .C., B arltrop J .A., C ory J .G. U se o f a n A queous S oluble Tetrazolium/ formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer Commun. 1991, **3** pp. 207–212

[4] Mossman T . R apid c olorimetric a ssay f or c ellular g rowth a nd s urvival: a pplication to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 1983, **65** pp. 55–63

[5] Roehm N.W., Rodgers G.H., Hatfield S.M., Glasebrook A.L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of lmmunological.*Methods. 1991, **142** pp. 257–265

[6] Choksakulnimitr S., Masuda S., Tokuda H., Takakura Y., Hashida M. In vitro cytotoxicity of macromolecules in different cell culture systems. J. Control. Release. 1995, **34** pp. 233–241

[7] Strober W . T rypan B lue E xclusion T est o f C ell V iability. *Current Protocols in Immunology*. A.3B.1–A.3B.2. (2001).: Altman, S. A., Randers, L. and Rao, G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. Biotechnol. Prog. 1993, **9** pp. 671–674

[8] Borenfreund E ., & Puerner J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). J. Tissue Cult. Methods. 1985, **9** pp. 7–9

[9] Xia T., Kovochich M., Liong M., Mädler L., Gilbert B., Shi H. Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. ACS Nano. 2008, **10** pp. 2121–2134

[10] Xia T., Kovochich M., Liong M., Zink J.I., Nel A.E. Cationic Polystyrene Nanosphere Toxicity Depends on Cell-Specific Endocytic and Mitochondrial Injury Pathways. ACS Nano. 2008, **2** pp. 85–96

[11] Guadagnini R , H alamoda Kenzaoui B , Walker L , Pojana G , M agdolenova Z , Bilanicova D, Saunders M, Juillerat-Jeanneret L, Marcomini A, Huk A, Dusinska M, Fjellsbø LM, Marano F, Boland S Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. Nanotoxicology. 2015 May; **9** :13-24

[12] Coecke S ., Balls M ., Bowe G ., Davis J .C., Straunthaler G ., Hartung T. Guidance on Good Cell Culture Practice. *A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice*, ATLA, **33**, pp. 261-287, 2005; Freshney, R.I. (1993) Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, 3rd ed., New York: Wiley-Liss

[13] Vallee B.L., & Ulmer D.D. Biochemical effects of Mercury, Cadmium, and Lead. *Annual Reviews of Biochemistry*, **41**, pp. 91-128, 1972; Stohs, S.J.. Bagchi, D., Hassoun, E. and Bagchi, M. Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Chromium and Cadmium Ions. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, **20**, Issue 2 12 pages, 2001

[14] Xia T., Kovochich M., Brant J., Hotze M., Sempf J., Oberley T. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. Nano Lett. 2006, **6** pp. 1794–1807

[15] Warheit D .B., Webb T .R., Colvin V .L., R eed K .L., S ayes C .M. P ulmonary Bioassay Studies with Nanoscale and Fine-Quartz Particles in Rats: Toxicity is Not Dependent upon Particle Size but on Surface Characteristics. Toxicol. Sci. 2007, **95** pp. 270–280

[16] Preparation of Nanoparticle Dispersions from P owdered M aterial Using Ultrasonic Disruption. NIST Special Publication 1200-2 available under: http: //nvlpubs .nist.gov/nistpubs/SpecialPublications/NIST .SP .1200 -2 .pdf

[17] Bihari P., Vippola M., Schultes S., Praetner M., Khandoga A.G., Reichel C.A. Optimized dispersion of nanoparticles for biological *in vitro* and *in vivo* studies. Part. Fibre Toxicol. 2008, **5** p. 14

[18] Ramirez-Garcia S . C hen, L . Morris, M.A., and Dawson, K .A, A new methodology for studying nanoparticle interactions in biological systems: Dispersing titania in biocompatible media using chemical stabilisers. Nanoscale. 2011, **3** pp. 4617–4624

[19] Taurozzi J .S., H ackley V .A., W iesner M .R. A s tandardised a pproach f or t he d ispersion of titanium dioxide nanoparticles in biological media. Nanotoxicology. 2013, **7** pp. 389–401

[20] Porter D ., S riram K ., Wolfarth M ., J efferson A ., S chwegler-Berry D ., A ndrew M . A biocompatible medium for nanoparticle dispersion. *Nanotoxicology*. 2008, **2** pp. 144–154

[21] Strober W. (2001). "Monitoring cell growth". In Coligan J.E., Bierer B.E., Margulies D.H., Sherach E.M., Strober W. Current Protocols in Immunology **5**. USA: John Wiley & Sons. p. A.2A.1. doi: 10.1002/0471142735 .ima03as21

[22] Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer Commun. 1991, **3** pp. 207–212

[23] Rosslein M ., Elliott J .T., Salid M ., Petersen E .J., Hirsch C ., K rug H .F. U se of cause-andeffect analysis to design a high-quality nanocytotoxicology assay. Chem. Res. Toxicol. 2015, **28** pp. 21–30

[24] ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity

یادآوری- استاندارد ملی ایران- شماره ۵-۷۲۱۶: سال ۱۳۹۰، ارزیابی بیولوژیکی وسایل پزشکی- قسمت ۵: آزمون‌های سمیت سلولی برون‌تنی، با استفاده از استاندارد ISO 10993-5: 2009 تدوین شده است.

[25] ISO/TS 19337, Nanotechnologies — Characteristics of working suspensions of nano-objects for in vitro assays to evaluate inherent nano-object toxicity

یادآوری- استاندارد ملی ایران- شماره ۲۱۱۴۴: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو- مشخصه‌های سوسپانسیون‌های کاری نانواشیاء برای سنجش برون تن به‌منظور ارزیابی سمیت ذاتی نانوشیء، با استفاده از استاندارد ISO/TS 19337: 2016 تدوین شده است.

[26] ISO 29701, Nanotechnologies — Endotoxin test on nanomaterial samples for in

vitro systems — Limulus Amebocyte lysate (LAL) test

یادآوری- استاندارد ملی ایران- شماره ۱۴۱۵۳: سال ۱۳۹۰، فناوری نانو- آزمون اندوتوکسین نانومواد در سیستم‌های برون‌تن- روش آزمون Limulus Amebocyte Iysate (LAL)، با استفاده از استاندارد ISO 29701: 2010 تدوین شده‌است.