



جمهوری اسلامی ایران  
Islamic Republic of Iran  
سازمان ملی استاندارد ایران

Iran National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران  
۲۳۱۱۲  
چاپ اول  
۱۴۰۰

INSO  
23112  
1st Edition  
2022

Identical with  
ISO/TR 21624:  
2020

فناوری نانو- ملاحظات برای مطالعات  
برون تنی نانواشیاء هوابرد و انبوهه‌ها و  
کلوخه‌های آن‌ها (NOAA)

**Nanotechnologies — Considerations  
for in vitro studies of airborne  
nano-objects and their aggregates and  
agglomerates (NOAA)**



ICS: 07.120

استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۱۱۲ (چاپ اول): سال ۱۴۰۰

سازمان ملی استاندارد ایران

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

صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۳۹ تهران - ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۳۱۵۸۵-۱۶۳ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۸۱۱۴-۳۲۸۰ (۰۲۶)

رایانامه: [standard@isiri.gov.ir](mailto: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](mailto: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 ماده ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، وظیفه تعیین، تدوین، به روزرسانی و نشر استانداردهای ملی را برعهده دارد.

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

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)<sup>۱</sup>، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)<sup>۲</sup> و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)<sup>۳</sup> است و به‌عنوان تنها رابط<sup>۴</sup> کمیسیون کدکس غذایی (CAC)<sup>۵</sup> در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

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

1- International Organization for Standardization

2- International Electrotechnical Commission

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

4- Contact point

5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«فناوری نانو- ملاحظات برای مطالعات برون تنی نانواشیاء هوابرد و انبوهه‌ها و کلوخه‌های آن‌ها

«(NOAA)»

**رئیس:**

قاضی خوانساری، محمود  
(دکتری تخصصی سم‌شناسی)

**سمت و/یا محل اشتغال:**

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 - گروه استاندارد و ارزیابی محصولات ستاد ویژه  
توسعه فناوری نانو

سیفی، مهوش

(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

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

غیبی، علی

(کارشناسی ارشد مهندسی نساجی)

مسئول تحقیق و توسعه - شرکت فناوران نانومقیاس

فرهنگ دهقان، سمیه

(دکتری تخصصی بهداشت حرفه‌ای)

عضو هیئت علمی - دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

کلانتری، صبا

(دکتری تخصصی بهداشت حرفه‌ای)

عضو هیئت علمی - دانشگاه علوم پزشکی تهران

کوهی، محمد کاظم

(دکتری تخصصی سم‌شناسی)

عضو هیئت علمی - دانشگاه تهران

گشتی‌آذر، سمانه

(کارشناسی ارشد مهندسی مواد)

کارشناس مسئول - کارگروه ارزیابی محصولات ستاد توسعه  
فناوری نانو

**ویراستار:**

سیفی، مهوش

(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

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

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
و	پیش‌گفتار
ز	مقدمه
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۱	۳ اصطلاحات و تعاریف
۴	۴ کوتاه‌نوشت‌ها
۵	۵ ملاحظات مربوط به سیستم‌های برون‌تنی برای ارزیابی مواجهه استنشاقی با NOAA
۵	۱-۵ زمینه
۵	۲-۵ سیستم‌های مواجهه
۱۴	۳-۵ ملاحظات برای مشخصه‌یابی NOAA آزمون‌شده در مطالعات برون‌تنی نانومواد هوابرد
۱۶	۴-۵ انتخاب سیستم‌های سلولی
۲۶	۶ انتخاب دُز مناسب و سنجش‌های دُز
۲۶	۱-۶ کلیات
۲۸	۲-۶ روش‌های درون‌رایانه‌ای برای ارزیابی دُز/سنجش‌های دُز و نهشت
۲۹	۷ خلاصه
۳۰	پیوست الف (آگاهی‌دهنده) کاربرد مسیرهای پیامد نامطلوب (AOPs) برای طراحی رویکردهای مبتنی بر آزمون برون‌تنی
۳۲	کتابنامه

## پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو- ملاحظات برای مطالعات برون‌تنی نانواشیاء هوابرد و انبوهه‌ها و کلوخه‌های آن‌ها (NOAA)» 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 شماره ۵ تهیه و تدوین‌شده، در یکصدو هفتمین اجلاس هیئت کمیته ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۹/۱۱/۱۴۰۰ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران براساس استاندارد ملی ایران شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوه نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط، مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی 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 21624: 2020, Nanotechnologies — Considerations for in vitro studies of airborne nano-objects and their aggregates and agglomerates (NOAA)

استنشاق یکی از راه‌های مهمی است که از طریق آن انسان می‌تواند با نانواشیاء طبیعی، ناخواسته و مهندسی‌شده و انبوهه‌ها و کلوخه‌های آن‌ها (NOAA) تماس یابد. با توجه به تفاوت‌های فیزیولوژیکی (کاراندام‌شناختی)<sup>۱</sup>، زیست‌شیمیایی<sup>۲</sup> و کالبدشناختی<sup>۳</sup> بین انسان و حیوان و همچنین زمان، هزینه و تعداد قابل‌توجه حیوانات موردنیاز برای انجام آزمون‌های سمیت درون‌تنی، تمایل زیادی به تدوین راهبردهای برون‌تنی برای ارزیابی ریسک مبتنی بر سلول‌های انسانی و سازوکارهای سمیت، وجود دارد. توصیه می‌شود برای فراهم‌شدن امکان مقایسه نتایج سنجش برون‌تنی و اثرات درون‌تنی مشاهده‌شده پس از استنشاق NOAA، پارامترهای خاصی در نظر گرفته شود، از جمله:

الف - انتخاب نوع سلول؛

ب - مشخصه‌یابی NOAA در طول سنجش، از جمله دگرگونی‌های<sup>۴</sup> چرخه‌حیات<sup>۵</sup>؛

پ - انتخاب غلظت نانواشیاء مربوط به مواجهه‌های انسانی؛

ت - تولید شکلی<sup>۶</sup> از NOAA که مواجهات انسانی را شبیه‌سازی می‌کند؛

ث - استفاده از پراکنده‌ساز<sup>۷</sup> مرتبط؛

ج - استفاده از حالت<sup>۸</sup> مناسب مواجهه (غوطه‌وری یا واسط<sup>۹</sup> مایع- هوا) و مدت زمان مواجهه [1].

این استاندارد شامل توصیف پارامترهای اشاره‌شده در بالا با توجه به استفاده از راهبردهای مبتنی بر آزمون‌های برون‌تنی برای ارزیابی جنبه‌های خاص مربوط به سمیت استنشاقی NOAA است. به‌عنوان مثال، برای مطالعات استنشاقی، انتخاب تجهیزات مناسب برای تولید، مواجهه و مشخصه‌یابی نانواشیاء بسیار مهم است. این استاندارد شامل اطلاعاتی در مورد محفظه‌های مواجهه هواسل برون‌تنی و مدل‌های زیستی در دسترس است که برای ارزیابی سمیت استنشاقی NOAA استفاده می‌شود. این استاندارد شامل جزئیات مربوط به فنون تولید هواسل یا مشخصه‌یابی نانومواد خاص (NMs)<sup>۱۰</sup>، دگرگونی‌های چرخه‌حیات آن‌ها در آزمون درون‌تنی نمی‌شود. مروری بر تولید هواسل NMs و آزمون درون‌تنی در استاندارد ISO/TR 19601 ارائه شده است [2].

- 
- 1- Physiological
  - 2- Biochemical
  - 3- Anatomical
  - 4- Transformations
  - 5- Life-Cycle
  - 6- Form
  - 7- Dispersant
  - 8- Mode
  - 9- Interface
  - 10- Nanomaterials

## فناوری نانو- ملاحظات برای مطالعات برون تنی نانواشیاء هوابرد و انبوهه‌ها و کلوخه‌های آن‌ها (NOAA)

### ۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد گردآوری<sup>۱</sup> اطلاعات مربوط به سیستم‌های موجود برای مواجهه و ارزیابی نانواشیاء و انبوهه‌ها و کلوخه‌های آن‌ها (NOAA) برای مطالعات مواجهه برون تنی با هوا است. این استاندارد یک مرور کلی از سیستم‌های مواجهه مختلف و سیستم‌های سلولی برون تنی مورد استفاده برای انجام مطالعات برون تنی است که طرح مطالعه توکسیکولوژی استنشاقی را شبیه‌سازی می‌کند.

### ۲ مراجع الزامی

در این استاندارد هیچ مرجع الزامی وجود ندارد.

### ۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می‌رود<sup>۲</sup>.

۱-۳

#### هواسل

aerosol

سامانه‌ای از ذرات جامد یا مایع معلق در گاز است.

[منبع: زیربند ۲-۱، استاندارد ملی ایران شماره ۱۳۸۳۰: سال ۱۳۸۹]

۲-۳

#### کلوخه

agglomerate

مجموعه‌ای از ذرات که به شکل ضعیف یا نسبتاً قوی به یکدیگر متصل شده‌اند، به طوری که مساحت سطح خارجی حاصل آنها مشابه مجموع مساحت سطوح تک تک اجزاء تشکیل دهنده باشد.

---

1- Collates

۲- اصطلاحات و تعاریف به کاررفته در استانداردهای ISO و IEC در وبگاه‌های [www.iso.org/obp](http://www.iso.org/obp) و [www.electropedia.org](http://www.electropedia.org) قابل دسترس است.



یادآوری ۱- نیروهایی که کلوخه را نزدیک به یکدیگر نگه می‌دارد 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 اولیه نامیده می‌شوند.  
[منبع: زیربند ۳-۴، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۳

#### انبوهه

#### aggregate

مجموعه‌ای از ذرات با پیوندهای قوی یا جوش خورده که مساحت سطح خارجی حاصل آنها به‌طور قابل توجهی کمتر از مجموع مساحت سطوح تک‌تک اجزاء تشکیل‌دهنده باشد.

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

یادآوری ۲- انبوهه‌ها به‌عنوان ذرات ثانویه نیز در نظر گرفته می‌شوند و ذرات اصلی منشاء، ذرات اولیه نامیده می‌شوند.  
[منبع: زیربند ۳-۵، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۴-۳

#### نانوماده مهندسی شده

#### engineered nanomaterial

نانوماده طراحی شده به‌منظور هدف یا عملکرد خاص است.

[منبع: زیربند ۲-۸، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۵-۳

#### نانوماده تصادفی

#### incidental nanomaterial

نانوماده‌ای که به‌صورت محصول جانبی غیرهدفمند از یک فرآیند ایجاد شده است.

یادآوری ۱- این فرآیند شامل ساخت، فرآیندهای فناورانه- زیستی و سایر فرآیندها است.

یادآوری ۲- برای «ذره بسیارریز»<sup>۱</sup> به زیربند ۲-۲۱، استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۴۸۳: سال ۱۳۹۶ مراجعه شود.

[منبع: زیربند ۲-۱۰، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۶-۳

نانوماده ساخته شده

**manufactured nanomaterial**

نانوماده‌ای که برای داشتن خواص و یا ترکیبی خاص به‌طور هدفمند تولید شده‌است.

[منبع: زیربند ۲-۹، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۷-۳

نانوذره

**nanoparticle**

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

یادآوری- چنانچه ابعاد به‌طور قابل توجهی با یکدیگر تفاوت داشته باشند (معمولاً 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]

۸-۳

توزیع اندازه ذره

**particle size distribution**

توزیع ذرات به‌صورت تابعی از اندازه ذرات است.

یادآوری ۱- توزیع اندازه ذره را می‌توان به صورت توزیع انباشتی و یا چگالی توزیع (توزیع کسر حجمی ماده در رده اندازه‌های متفاوت تقسیم بر پهنای همان رده) بیان کرد.

یادآوری ۲- به‌عنوان مثال کمیت می‌تواند بر اساس عدد، جرم یا حجم باشد.

[منبع: زیربند 4.1.3، استاندارد ISO/TS 80004-6: 2021]

۴ کوتاه‌نوشت‌ها

کوتاه‌نوشت‌ها	معادل انگلیسی	معادل فارسی
Ag NPs	silver nanoparticles	نانوذرات نقره
ALI	air-liquid interface	واسط مایع - هوا
AOP	adverse outcome pathway	مسیر پیامدهای نامطلوب
Au NPs	gold nanoparticles	نانوذرات طلا
CCSP	clara cell secretary protein	پروتئین ترشحی سلول کلارا
CD	cluster of differentiation	خوشه تمایزی
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	تنظیم‌کننده هدایت تراغشایی فیبروز سیستیک
CNT	carbon nanotube	نانولوله کربنی
CO <sub>2</sub>	carbon dioxide	دی‌اکسید کربن
ENM	engineered nanomaterial	نانوماده مهندسی شده
IATA	integrated approach to testing an assessment	رویکرد یکپارچه برای آزمون یک ارزیابی
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1	مولکول چسبنده بین سلولی ۱
IL	interleukin	اینترلوکین
ISDD	in vitro sedimentation, diffusion and dosimetry	تشنشینی، انتشار و دزیمتری برون تنی
ISD3	in vitro sedimentation, diffusion, dissolution and dosimetry	تشنشینی، انتشار، انحلال و دزیمتری برون تنی
KE	key event	رویداد کلیدی
MIE	molecular initiating event	رویداد آغازگر مولکولی
MPPD	multiple-path particle dosimetry	دزیمتری چندمسیره ذره
MT	metallothionein	متالوتیونین
MUC 1	mucin 1	میوسین ۱
MWCNT	multi-walled carbon nanotubes	نانولوله‌های کربنی چنددیواره
NM	nanomaterial	نانوماده
NOAA	nano-objects and their aggregates and agglomerates	نانواشیاء و انبوهه‌ها و کلوخه‌های آن‌ها
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	سازمان همکاری و توسعه اقتصادی
QCM	quartz crystal microbalance	میکروبالانس بلور کوارتز
ROS	reactive oxygen species	گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر
SiO <sub>2</sub>	silicon dioxide	دی‌اکسید سیلیکون
SP-A	surfactant protein A	پروتئین سطح فعال A
SP-D	surfactant protein D	پروتئین سطح فعال D
TEER	transepithelial electrical resistance	مقاومت الکتریکی بین بافت پوششی
TiO <sub>2</sub>	titanium dioxide	دی‌اکسید تیتانیوم
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1	مولکول چسبنده سلول عروقی ۱

## ۵ ملاحظات مربوط به سیستم‌های برون‌تنی برای ارزیابی مواجهه استنشاقی با NOAA

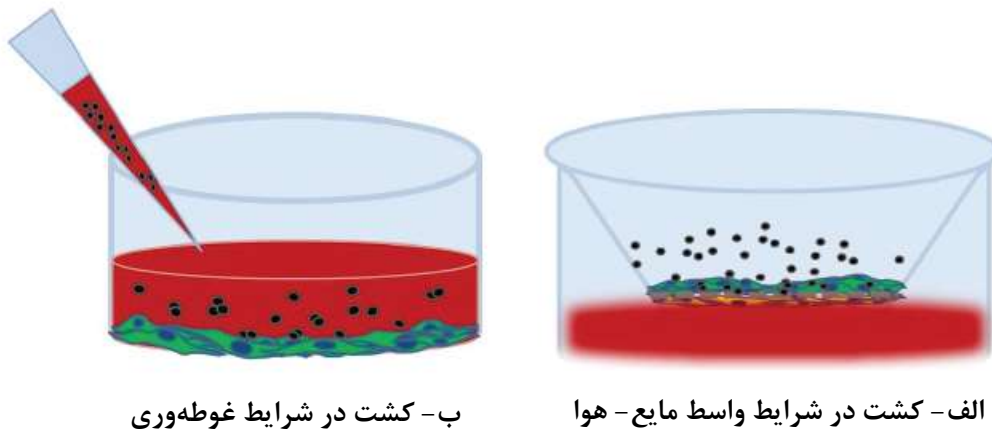
### ۱-۵ زمینه

نانواشیاء می‌توانند به صورت تصادفی تولید شده و یا از مواد مختلفی (به‌عنوان مثال فلزات، پلیمرها، کسیدهای فلزی) ساخته شوند و با ترکیبات و ریخت‌شناسی‌های بسیار مختلفی باشند. آزمون سمیت استنشاقی NOAA با استفاده از سیستم‌های برون‌تنی است و شامل ملاحظاتی از پارامترهای متعدد از جمله حالت مناسب مواجهه (به زیربند ۵-۲ مراجعه شود)، مشخصه‌یابی ماده آزمون (به زیربند ۵-۳ مراجعه شود) و انتخاب نوع سلول (به زیربند ۵-۴ مراجعه شود) می‌شود.

### ۲-۵ سیستم‌های مواجهه

#### ۱-۲-۵ کلیات

برای ارزیابی نانوآشیاء هواسل‌شده، از دو روش مستقیم و غیرمستقیم با استفاده از سیستم‌های برون‌تنی استفاده می‌شود. روش‌های مستقیم شامل مواجهه هواسل موردآزمون، تولیدشده با استفاده از مولدهای هواسل، مستقیماً با سلول‌ها در شرایط غوطه‌وری، غوطه‌وری متناوب (به‌عنوان مثال بر روی سکوی موجی<sup>۱</sup>) یا شرایط واسط مایع- هوا (ALI) است [3][4][5]. شکل ۱ نمایش طرحواره‌ای از مواجهه NOAA در شرایط غوطه‌وری و ALI را نشان می‌دهد. روش‌های غیرمستقیم اغلب شامل جمع‌آوری هواسل‌ها (مانند نانوآشیاء یا ذرات محیطی اطراف جاده) با استفاده از دستگاه‌های مخصوص (به‌عنوان مثال نمونه‌گیر با تیغه چرخشی مرطوب<sup>۲</sup> یا جداسازهای مایع<sup>۳</sup>) یا روی یک بستر فیلترمانند و سپس تعلیق نمونه جمع‌آوری‌شده در یک محیط کشت قبل از مواجهه با سلول‌ها است [3][6][7][8][9].



شکل ۱- نمایش طرحواره‌ای کشت در شرایط غوطه‌وری و واسط مایع- هوا (ALI)

- 1- Rocking platform
- 2- Wetted rotating vane impactors
- 3- Liquid impingers

روش غیرمستقیم، امکان شناسایی پتانسیل سمیت ذرات هوابرد را فراهم می‌آورد. با این حال، مراحل مورد نیاز برای تهیه سوسپانسیون مواد آزمون جمع‌آوری شده (هنگام استفاده از روش‌های غیرمستقیم) و برهم‌کنش مواد آزمون با محیط کشت در سیستم‌های غوطه‌وری (هنگام استفاده از روش‌های مستقیم) می‌تواند باعث تغییر در خواص مواد آزمون و ارزیابی‌های نادرست شود. این امر به‌ویژه در مورد نانواشیاء به دلیل این واقعیت است که هم حالت کلوخگی و هم حرکت آنها تحت تأثیر محیط تعلیق قرار می‌گیرد. حرکت نانواشیاء توسط انتشار براونی<sup>۱</sup> یا ته‌نشینی براساس پارامترهای فیزیکوشیمیایی آنها مانند اندازه و چگالی کنترل می‌شود [10][11]. در نتیجه، احتمال تجمع کلوخه‌ها بر روی کشت سلولی بیشتر از ذرات منفرد است. علاوه بر این، کینتیک<sup>۲</sup> انحلال نانواشیاء در شرایط غوطه‌وری ممکن است به‌طور قابل‌توجهی با آنچه ذرات در شرایط درون‌تنی متحمل می‌شوند، متفاوت باشد. از آنجا که اندازه، شکل و حلالیت پارامترهای اصلی تعیین‌کننده سمیت نانواشیاء هستند، پیامدهای سمیت مشاهده‌شده در سیستم‌های غوطه‌وری ممکن است با آنچه که در ریه پس از مواجهه با نانواشیاء اتفاق می‌افتد، مطابقت نداشته باشد. یکی دیگر از محدودیت‌های سیستم‌های غوطه‌وری این است که فنوتیپ (رُخ‌نمود)<sup>۳</sup> سلول‌ها معمولاً با آنچه در شرایط درون‌تنی وجود دارد و به‌صورت عدم تشکیل اتصالات محکم و مخاط در سلول‌های پوششی مشاهده می‌شود، متفاوت است و این موضوعی است که برای مدل‌های استنشاقی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [12][13].

برای غلبه بر محدودیت‌های مربوط به سیستم‌های غوطه‌وری، سیستم‌های ALI استفاده می‌شوند که به‌دلیل ارتباط فیزیولوژیکی برای آزمون سمیت استنشاقی، ارجحیت دارند [14][15][16][18]. یک سیستم ALI از سلول‌هایی تشکیل می‌شود که روی غشای نیمه‌تراوا کشت داده می‌شوند، سطح زیرین<sup>۴</sup> آنها در معرض محیط کشت قرار می‌گیرد و سطح زبرین (آپیکال)<sup>۵</sup> در معرض هوا قرار می‌گیرد. چنین پیکربندی از نظر فیزیولوژیکی مناسب است، زیرا نشان داده شده است که باعث تمایز سلول‌هایی می‌شود که فیزیولوژی آنها از فنوتیپ درون‌تنی تقلید می‌کند [12][13][19]. علاوه بر داشتن سلول‌ها در پیکربندی/فنوتیپ «شبه‌درون‌تنی»<sup>۶</sup>، سیستم‌های ALI امکان ته‌نشینی نسبتاً مستقیم NOAA را بر روی سلول‌ها فراهم می‌آورند که ته‌نشینی ذرات ناشی از استنشاق را بهتر شبیه‌سازی می‌کند و ممکن است برای به‌دست آوردن رابطه پاسخ-غلظت مورد استفاده قرارگیرد [20]. توجه شود که مشابه شرایط مایع، تولید یک هواسل

1- Brownian diffusion  
2- Kinetics  
3- Phenotype  
4- Basal surface  
5- Apical surface  
6- In vivo-like

همچنین می‌تواند بر مشخصه‌های ذرات تأثیر گذارد. بنابراین، توصیه می‌شود در طی و پس از تولید هواسل، مشخصه‌یابی مناسب برای ذرات انجام شود.

شکل ۱ مواجهه NOAA را در سلول‌ها در شرایط غوطه‌وری و در ALI نشان می‌دهد. تحت شرایط غوطه‌وری، NOAA باید به عمق محیط گسترش یابد تا به سلول‌ها برسد. در شرایط واسط مایع-هوا، NOAA به دلیل حداقل لایه مایع روی سلول‌ها مستقیماً روی سلول‌ها مستقر می‌شود. در چندین مطالعه، سیستم‌های غوطه‌وری و ALI مواجهه‌یافته با NOAA مقایسه شده و تفاوت پاسخ‌های سلولی آن‌ها گزارش شده است [15]. به‌عنوان مثال، در مقایسه با کشت‌های غوطه‌وری، در ALI بیان بالاتری از اینترلوکین-۶ (IL-6)، اینترلوکین-۸ (IL-8) و همواکسیژناز-۱<sup>۱</sup> در سلول‌های مواجهه‌یافته با NOAA مشاهده شده است [20][21][22][23]. در چندین مطالعه، نتایج متناقضی برای نشانگرهای زیستی<sup>۲</sup> یادشده، مشاهده کرده‌اند [24][25][26]. با وجود تفاوت بین دو حالت مواجهه، هر دو سیستم هنوز برای ارزیابی سمیت NOAA مورد استفاده قرار می‌گیرند. می‌توان از کشت سلولی در شرایط غوطه‌وری برای شناسایی قدرت سمی<sup>۳</sup> ذرات معلق در هوا (به‌عنوان مثال در محیط یا خروجی<sup>۴</sup>) استفاده کرد. با این حال، برای ارزیابی نانوآشپاء مهندسی شده و ساخته شده، به‌ویژه هنگام در نظر گرفتن مواجهه شغلی، سیستم کشت ALI فاکتورهای مربوط به مواجهه ریوی را به‌درستی نشان می‌دهد.

## ۵-۲-۲ ملاحظات برای سیستم‌های مواجهه ALI

### ۵-۲-۲-۱ کلیات

تیمار سیستم‌های سلولی در ALI مستلزم سیستم‌های مواجهه‌ای است که می‌توانند مواد موردآزمون را به‌عنوان یک هواسل به سیستم سلولی به شکلی که مربوط به سناریوهای مواجهه انسانی است، برساند. سیستم‌های مواجهه مورد استفاده در آزمون NOAA می‌توانند از نوع «محفظه- بسته»<sup>۵</sup> یا «جریان- عبوری»<sup>۶</sup> باشند و به‌طور معمول شامل دو جزء اصلی است: مولد هواسل که اتمسفرآزمون را ایجاد می‌کند و محفظه مواجهه که سیستم سلولی را جای می‌دهد. سیستم‌های جریان- عبوری (همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است) معمولاً از اتصالات و لوازم جانبی انتقال، رقیق‌سازی، مشخصه‌یابی و

---

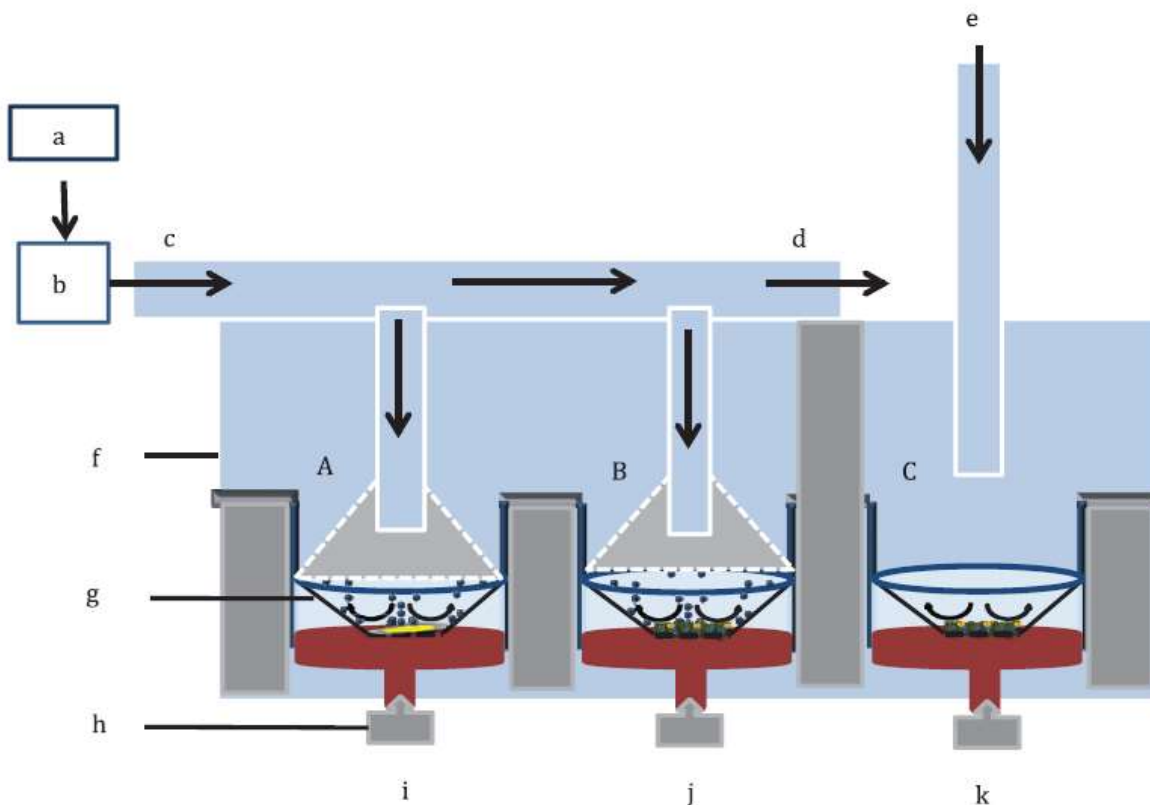
1- Hemeoxygenase-1  
2- Biomarkers  
3- Toxic potency  
4- Exhaust  
5- Closed-box  
6- Flow-through

حالت‌دهندگی هواسل قبل از رسیدن به سلول‌های داخل محفظه و یک اگزوز تشکیل شده‌است که می‌توانند برای نمونه‌برداری از اتمسفر مورد استفاده قرار گیرند.

شکل ۲ نمایش طرحواره‌ای از پیکربندی بنیادی یک سیستم شامل یک مولد هواسل و یک محفظه مواجهه سلول‌های هواسل شده (یا مه‌پاش شده)<sup>۱</sup> در معرض مواد را در ALI نشان می‌دهد. مواد با استفاده از یک مولد (یا مه‌پاش) که به محفظه مواجهه متصل است، هواسل (یا مه‌پاش) می‌شوند. غلظت NOAA نهشت‌یافته را می‌توان با داخل کردن توری‌های میکروسکوپی الکترونی (EM) و/یا میکروبالانس بلور کوارتز (QCM) در چاهک‌های بدون سلول (A) تعیین کرد. سلول‌ها روی جایگاه‌های<sup>۲</sup> غشایی کشت داده می‌شوند و در معرض هواسل‌های خشک یا مواد مه‌پاشی شده در ALI (B) قرار می‌گیرند. سلول‌هایی که فقط با هوا تیمار شده باشند به‌عنوان کنترل منفی (C) استفاده می‌شوند. برای به‌دست آوردن نمونه‌های هواسل یا محیط، می‌توان در چند نقطه واریسی، پورت‌های<sup>۳</sup> نمونه‌برداری را وارد کرد. اجزای مختلف سیستم مواجهه و کاربرد آنها در ارزیابی NOAA در زیربندهای ۲-۲-۲-۵ تا ۳-۲-۲-۵ شرح داده شده‌است.

---

1- Nebulized  
2- Inserts  
3- Ports



راهنما:

- a نمونه NM
- b مولد هواسل یا مه پاش
- c هواسل
- d خروجی
- e فقط هوا
- f محفظه مواجهه
- g جایگاه کشت سلول
- h خروجی برای نمونه برداری از محیط کشت
- i چاهک با یک QCM یا توری EM
- j چاهک با سلول های مواجهه یافته با NMs در ALI
- k چاهک با سلول های مواجهه یافته با هوای تمیز در ALI

یادآوری - برگرفته از مرجع [5].

شکل ۲- نمونه یک چیدمان سیستم مواجهه برون تنی در ALI

#### ۵-۲-۲- انتخاب مولد هواسل مناسب

مولدهای هواسل، در تجمیع با محفظه های مواجهه، یک مواجهه مستقیم با فاز گازی در سیستم های آزمون هواسل ها را امکان پذیر می کنند. این مولدها یک اتمسفر هواسل ایجاد می کنند که می تواند برای مواجهه سیستم های سلولی ALI در معرض ذرات هواسل شده و یا مه پاشی شده، مورد استفاده قرار گیرند. چندین روش



برای تولید هواسل‌ها استفاده شده‌است، اما انتخاب یک روش خاص به مشخصه‌های فیزیکی ماده موردنظر برای هواسل‌شدن مانند چگالی، گرانیروی<sup>۱</sup>، حالت ماده و اندازه هواسل هدف بستگی دارد [5]. به‌عنوان مثال، برای مایعات یا مواد زیستی، اغلب مه‌پاش‌های تصادمی<sup>۲</sup>، مه‌پاش‌های با سرعت بالا<sup>۳</sup>، ریزسازی فراصوتی<sup>۴</sup> یا مولدهای غشایی ارتعاشی<sup>۵</sup> استفاده می‌شود. درحالی‌که، تولید مواد جامد هواسل‌شده مستلزم استفاده از خشک‌کننده افشانه‌ای<sup>۶</sup>، کاردک دوار<sup>۷</sup>، پراکنش‌های پودر به شیوه ونتوری<sup>۸</sup> یا روش‌های بستر پودر سیال‌شده<sup>۹</sup> است [15][22][27][28]. اطلاعات تفصیلی در مورد مولدهای هواسل در ISO/TR 19601 ارائه شده‌است [2].

به‌طور کلی یک مولد هواسل از طریق اتصالات کمکی به محفظه مواجهه متصل می‌شود که به موجب آن انتقال اتمسفر ماده موردآزمون تولیدشده به محفظه‌ای که سیستم‌های سلولی در آن قرار دارد، فراهم می‌شود.

#### ۵-۲-۲-۳ انتخاب محفظه‌های مواجهه

انتخاب یک محفظه مواجهه خاص بستگی به طرح مطالعه اصلی و هدف آزمون، از جمله تعداد آزمون و شرایط کنترل و نمونه‌برداری (مواد آزمون، نشانگرهای زیستی و غیره) دارد. از محفظه‌های مواجهه می‌توان برای قراردادن سلول‌های کشت‌شده در ALI در مواجهه با NOAA هواسل‌شده (و سایر مواد) استفاده کرد. چندین محفظه مواجهه در متون علمی شرح داده شده‌است که هم سامانه تجاری موجود و هم آنهایی را که توسط محققان مستقل توسعه یافته‌اند، شامل می‌شود [29][30][31][32][33][34][35][36][37][38][39]. این محفظه‌ها از نظر فاکتورهای مانند هزینه، سازگاری با مولدهای هواسل، سهولت دسترسی و کاربرد، ماژولار بودن<sup>۱۰</sup>، توان عملیاتی<sup>۱۱</sup>، توانایی ارائه مداوم هواسل‌ها در رقت‌های متعدد، سهولت تمیز کردن و مدت زمان مواجهه، با یکدیگر متفاوت هستند [5] [29] باین‌حال، تمام سیستم‌های مواجهه، برخی از شباهت‌های کلی را دارند، از جمله همگی شامل یک محفظه جادادن سلول‌ها و تجهیزات برای تسهیل تولید، انتقال و/یا مشخصه‌یابی اتمسفر هواسل هستند.

- 
- 1- Viscosity
  - 2- Collision nebulizers
  - 3- Jet nebulizers
  - 4- Ultra-sonic atomization
  - 5- Vibrating membrane generators
  - 6- Spray-drying
  - 7- Rotating scraper
  - 8- Venturi-style powder dispersions
  - 9- Fluidized powder bed
  - 10- Modularity
  - 11- Throughput

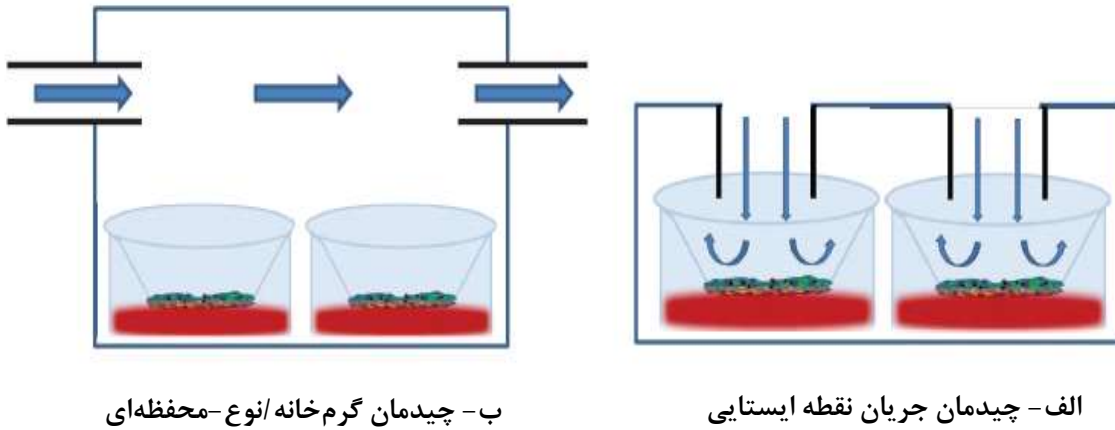
پیکربندی و انتخاب سیستم مواجهه بستگی به اهداف و الزامات آزمایشگاهی دارد. از سیستم‌های موجود که برای آزمون NOAA استفاده شده‌است، برخی از آنها در مقایسه با سایر سیستم‌ها که نیاز به درک عمیق از کنترل‌های مهندسی موجود در سیستم را دارند، کاربر پسندتر هستند.

شاخصه‌های<sup>۱</sup> متفاوت سیستم‌های مواجهه مختلف به شرح زیر است.

الف- نوع سیستم مواجهه: محفظه‌های مواجهه می‌توانند بر اساس چگونگی ورود<sup>۲</sup> هواسل آزمون به سیستم و انتقال<sup>۳</sup> به سلول‌های داخلی، از نوع سیستم‌های «محفظه-بسته» یا «جریان-عبوری» باشند. یکی از نمونه‌های سیستم محفظه-بسته، محفظه مواجهه‌ای است که در آن مواد آزمون به داخل آن مه‌پاش شده و در آنجا ابری متراکم ایجاد می‌شود که از پویایی ابر برای مخلوط کردن یکنواخت و نهشت (ته‌نشینی) هواسل بر روی غشا با سلول‌ها استفاده می‌شود. در سیستم نوع محفظه-بسته، جریان هوا به داخل یا خارج از افزاره وجود ندارد [40]. از سوی دیگر، در سیستم‌های جریان-عبوری، مواد آزمون هواسل شده و با جریان هوا وارد محفظه مواجهه می‌شود. درحالی‌که ابر هواسل روی سلول‌ها می‌نشیند، هوای عاری از ریزقطره‌ها<sup>۴</sup> از طریق اگزوز قرارگرفته در انتهای دیگر محفظه، خارج می‌شود [41].

ب- تنظیم<sup>۵</sup> جریان: بسته به نوع محفظه مواجهه، تنظیم جریان هوا می‌تواند افقی یا عمودی باشد. در یک چیدمان افقی یا گرم‌خانه/نوع- محفظه‌ای (به شکل ۳-ب مراجعه شود)، اتمسفر آزمون از طریق ورودی وارد محفظه مواجهه و از طریق خروجی خارج می‌شود که منجر به جریان مواجهه افقی در بالای جایگاه‌های کشت، می‌شود [18]. از سوی دیگر، در یک چیدمان جریان نقطه ایستایی<sup>۶</sup> (به شکل ۳-الف مراجعه شود)، جریان عمودی است و مستقیماً به سمت کشت‌های سلولی هدایت می‌شود که راهی دقیق‌تر<sup>۷</sup> برای مواجهه سلول‌ها فراهم می‌شود.

- 
- 1- Features
  - 2- Fed
  - 3- Deliverd
  - 4- Droplet-depleted
  - 5- Alignment
  - 6- Stagnation point flow set-up
  - 7- Precies



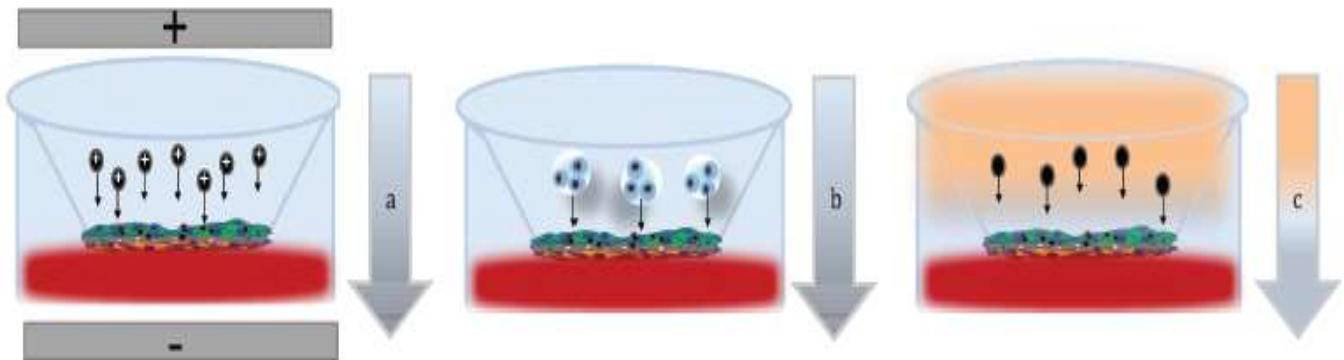
یادآوری - برگرفته از مرجع [18].

شکل ۳- نمونه‌ای از چیدمان‌های یک سیستم مواجهه برون تنی در شرایط واسط مایع - هوا

پ - افزایش بازده نهشت:

۱- نهشت الکترواستاتیک (به شکل ۴-ج مراجعه شود): افزایش نهشت الکتروایستایی روشی است که از بار، برای افزایش بازده نهشت NOAA استفاده می‌کند. اگرچه ارتباط فیزیولوژیکی استفاده از نهشت الکتروایستایی به دلیل اثرات نامطلوب احتمالی اعمال میدان‌های الکتریکی بالا بر روی سلول‌ها قابل بحث است، اما از این روش برای افزایش نهشت NOAA استفاده می‌شود [5] [18] [42].

۲- نهشت قطرات (به شکل ۴-ب مراجعه شود): نهشت قطرات شامل تعلیق یا حل شدن ماده آزمون در یک محیط مایع و سپس تولید هواسل قطره‌ای (به طور کلی با استفاده از یک مه‌پاش) برای مواجهه سلول‌ها است. اگرچه این روش راهی برای دستیابی به نهشت بالای مواد آزمون فراهم می‌کند، اما نمی‌توان از آن برای مواد آزمون در حالت خشک آن‌ها (یا هنگامی که نیاز است خواص فیزیکوشیمیایی حالت خشک آن‌ها حفظ شود) استفاده کرد [18] [42].



ج- نهشت الکتروایستایی

ب- نهشت قطرات

الف- جداساز گرمایی

راهنما:

a نیروهای الکتروایستایی

b نیروهای گرانشی

c گرادیان گرمایی

یادآوری- برگرفته از مرجع [18].

#### شکل ۴- روش‌های افزایش نهشت NOAA در ALI

۳- کوچ گرمایی<sup>۱</sup> (به شکل ۴-الف مراجعه شود): کوچ گرمایی یا ته‌نشینی گرمایی شامل نهشت ذرات بر روی سلول‌ها در امتداد یک گرادیان دمایی است. شیو دمایی به محدوده (۳۵ °C تا ۳۷ °C) می‌رسد که در نزدیکی سطح سلولی در کشت سلول طبیعی استفاده می‌شود. بنابراین، هیچ نگرانی خاصی در رابطه با اثرات نامطلوب بر سلول‌ها وجود ندارد و نیازی به پیش‌عمل‌آوری مواد آزمون نیست، بنابراین مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی حفظ می‌شوند [18][42].

ت- تعداد و تنظیم جایگاه‌ها: تعداد شرایط آزمون، تکرارها و کنترل‌های مناسب بستگی به هدف آزمون (به‌عنوان مثال ارزیابی یا شناسایی مخاطره) دارد، اما به‌طور کلی، توصیه می‌شود سیستم‌های مواجهه شامل کنترل هوای تمیز و غشای مرجع برای تعیین دُز نهشت‌یافته باشد (به‌عنوان مثال یک جایگاه بدون سلول یا ریزترازوی کوارتز). توانایی آزمون غلظت‌های متعدد و مدت زمان مواجهه به همان اندازه برای ایجاد رابطه دُز و/یا زمان پاسخ مهم است.

ث- کنترل و مشخصه‌یابی اتمسفر آزمون: بسته به محفظه مواجهه، پارامترهایی مانند نرخ جریان، دما و رطوبت باید پایش شوند. همچنین مهم است که بتوان شرایط سترون را در داخل محفظه مواجهه حفظ و اتمسفر هواسل را پایش و مشخصه‌یابی کرد.

ج- مشخصه‌یابی ذر نهشت‌یافته و محیط‌کشت:

۱- ذر نهشت‌یافته: تعیین ذر نهشت‌یافته برای تفسیر پاسخ زیستی مشاهده‌شده یا به‌عبارت دیگر برای ایجاد رابطه ذر-پاسخ مهم است. نهشت NOAA را می‌توان به‌طور کلی به‌عنوان تابعی از جرم [میکروبالانس بلور کوارتز (QCM)]، مساحت سطح یا تعداد ذرات (توری میکروسکوپی الکترونی) تعیین کرد. یک جایگاه غشایی مرجع معمولاً QCM یا توری EM را در خود جای می‌دهد. متناوباً، مواد نهشت‌یافته روی غشاء را می‌توان با استفاده از روش‌هایی برپایه ترکیب شیمیایی یا فلورسانس، بازیابی و آنالیز کرد. ذر نهشت‌یافته را می‌توان با استفاده از مدل‌های درون‌رایانه‌ای<sup>۱</sup> پیش‌بینی کرد، اما پیش‌بینی‌های انجام‌شده معمولاً براساس تعدادی از مفروضات مربوط به خواص NOAA هستند.

۲- نمونه محیط کشت سلولی برای اندازه‌گیری جابه‌جایی یا رهایش نشانگرهای زیستی و متابولیت‌ها توسط سلول‌ها: برای ایجاد پاسخ زیستی وابسته به ذر و زمان، مهم است که نشانگرهای زیستی مربوطه در زمان‌های مختلف در طول مدت آزمایش، ارزیابی شوند. چندین سیستم در دسترس است که از نظر سهولت جمع‌آوری نمونه‌ها از سیستم‌های سلولی، متفاوت است.

چ- سازگاری با مولدهای مختلف هواسل: سیستم‌های پیمان‌های که با انواع مولدهای هواسل سازگار هستند، انعطاف‌پذیری<sup>۲</sup> در آزمون انواع مختلف مواد، به‌دست آوردن اندازه خاص و محدوده غلظت ذرات و انتخاب مدت زمان مواجهه را فراهم می‌کنند.

### ۳-۵ ملاحظات برای مشخصه‌یابی NOAA آزمون‌شده در مطالعات برون‌تنی نانومواد هوابرد

مشخصه‌یابی کامل NOAA در مراحل مختلف استفاده از آزمون برون‌تنی (به‌عنوان مثال هنگام ساخته‌شدن، هواسل‌شدن، نهشت‌یافتن) برای تعیین روابط بین نتایج زیستی مشاهده‌شده، غلظت و خواص، بسیار مهم است. برخی از مشخصه‌های NOAA که در این زمینه بسیار مهم هستند عبارتند از: اندازه ذرات، توزیع اندازه، شکل، انبوهگی/کلوخگی، حلالیت (انحلال)<sup>۳</sup>، وجود ناخالصی‌های ناچیز<sup>۴</sup> (به‌عنوان مثال فلزات و

---

1- In silico  
2- Flexibility  
3- Solubility (dissolution)  
4- Trace impurities

اندوتوکسین‌ها)، مشخصه‌های سطحی (به‌عنوان مثال مساحت سطح و بار)، ساختار بلوری، قابلیت تولید گردوغبار<sup>۱</sup>، ترکیب‌بندی و خلوص. تعیین خواص فیزیکی و شیمیایی NOAA با استفاده از پروتکل‌های استاندارد شده بسیار مهم است، زیرا تغییرپذیری بین آزمایشگاهی<sup>۲</sup> را کاهش داده و مقایسه داده‌ها را تسهیل می‌کند. چندین سند راهنما و استاندارد برای مشخصه‌یابی وجود دارد، به مراجع [175] و [176] مراجعه شود. مواردی که به‌طور خاص مربوط به NOAA هواسل شده است در استاندارد ISO/TR 19601 ارائه شده است [2]. تعلیق نانواشیاء در مایعات شبیه‌سازی شده ریه می‌تواند دیدگاهی از پتانسیل نرخ انحلال آن‌ها (ماندگاری زیستی<sup>۳</sup> یا پایداری زیستی<sup>۴</sup>)، انبوهگی و کلوخگی و کینتیک در مایعات زیستی ارائه دهد. مایعات ریوی شبیه‌سازی شده متعددی برای ارزیابی پارامترهای NOAA مذکور استفاده شده است [43][44][45]. اطلاعات مربوط به سیستم‌های غیرسلولی<sup>۵</sup> در استاندارد ISO/TR 19057 ارائه شده است. اگر نانواشیاء در یک محیط تعلیق شوند (به‌عنوان مثال در صورت مه‌پاش‌سازی)، توصیه می‌شود مشخصه‌یابی کامل تعلیق آن انجام شود. جزئیات اطلاعات مربوط به مشخصه‌یابی تعلیق نانواشیاء در استاندارد ISO/TS 19337 [46] ارائه شده است.

علاوه بر ارزیابی خواص فیزیکی و شیمیایی نانواشیاء، تعیین غلظت و شکل کسر نهشت یافته بر روی سطح سلول، مهم است. برخلاف مواد شیمیایی که محلول همگنی را در محیط تشکیل می‌دهند، نانواشیاء یک پراکندگی ناهمگن با انبوهه‌هایی با اندازه‌های مختلف ایجاد می‌کنند. نهشت NOAA در محیط تا حد زیادی به اندازه و چگالی بستگی دارد: ذرات بزرگ از طریق اینرسی (لختی)<sup>۶</sup> نشست می‌یابند، اما با کاهش اندازه ذرات (به حدود ۰/۳ میکرومتر)، نهشت به حداقل می‌رسد. با کاهش بیشتر اندازه ذرات، نهشت به دلیل نیروهای انتشار، افزایش می‌یابد [۴۷]. به دلیل محدودیت ابزارهایی که به‌طور دقیق غلظت ذراتی را که به لایه سلولی می‌رسند پیش‌بینی می‌کنند، رفتار نانواشیاء در پراکنش‌ها، تعیین دُز-پاسخ را که برای ارزیابی توکسیکولوژیکی بسیار مهم است، پیچیده می‌کند.

مواجهه سیستم‌های سلولی در ALI با فراهم کردن امکان نهشت نسبتاً مستقیم هواسل‌ها بر روی سطح سلول، تا حدودی سبب نادیده گرفته شدن اثرات محیطی بر روی نانواشیاء می‌شود. اگرچه در داخل هواسل، تغییرات در مشخصه‌های نانواشیاء نیز ممکن است رخ دهد، به‌عنوان مثال به دلیل تبخیر حامل (آبی<sup>۷</sup>) یا

- 
- 1- Dustiness
  - 2- Interlaboratory variability
  - 3- Biodurability
  - 4- Biopersistence
  - 5- Acellular systems
  - 6- Inertia
  - 7- Watery

انبوهه شدن نانواشیاء در ریزقطرات هواسل. سیستم تنفسی انسان دارای منحنی نهشت (یا جمع‌آوری) وابسته به مشخصه اندازه ذرات است. نهشت ذرات هواسل روی سطح ریه‌ها و نفوذ به سطح مایعی که ریه‌ها را دربر می‌گیرد به عوامل مختلفی بستگی دارد، از جمله قطر ذرات، جریان هوا، کشش سطحی و وجود گرادیان‌های الکتروایستایی، گرمایی یا مولکولی. به‌طور مشابه، توزیع اندازه واردشده و نهشت‌یافته در سیستم‌های برون تنی در ALI بستگی به انتخاب تجهیزات مواجهه (مولد هواسل و محفظه مواجهه) دارد، برخی از سیستم‌ها می‌توانند در معرض مواجهه مداوم در یک دوره زمانی قرار گیرند و برخی دیگر قادر به یک بار مواجهه در یک غلظت ثابت هستند. مشخصه‌یابی کسر نهشت‌یافته می‌تواند اطلاعاتی را در مورد شکل و جرم NOAA که در واقع سلول‌ها در معرض آن قرار گرفته‌اند، ارائه دهد. هر دو روش کیفی (به‌عنوان مثال میکروسکوپی الکترونی) و روش‌های کمی (به‌عنوان مثال میکروبالانس بلور کوارتز و اندازه‌گیری جرم نهشت‌یافته با روش وزن‌سنجی) برای ارزیابی دُز نهشت‌یافته در دسترس است.

هنگام انتخاب سیستم مواجهه، لازم است برای هر نوع و شکل NOAA، فاکتورهایی مانند این که آیا افزاره، منحنی نهشت ریوی را به‌عنوان تابعی از قطر ذرات شبیه‌سازی می‌کند یا صرفاً دارای بازده‌های بالای نهشت به‌عنوان تابعی از قطر ذرات است، در نظر گرفته شده و بررسی شود. شاخصه‌های بیشتر که انتخاب محفظه‌های مواجهه را تعیین می‌کند، در زیربند ۵-۲-۲-۳ ارائه شده است.

#### ۴-۵ انتخاب سیستم‌های سلولی

##### ۱-۴-۵ کلیات

سیستم تنفسی را می‌توان به سه ناحیه اصلی تقسیم کرد: حلق و بینی<sup>۱</sup>، نای و نایژه‌ای<sup>۲</sup> و حبابچه‌ای<sup>۳</sup>. این مناطق از بیش از ۴۰ نوع سلول اختصاصی مانند سلول‌های پوششی تشکیل‌دهنده آستر<sup>۴</sup>، ماکروفاژهایی (درشتخوارهایی)<sup>۵</sup> که مواد خارجی را در خود فرومی‌برند<sup>۶</sup> و سلول‌های حبابچه‌ای که عامل سطح‌فعال ریوی را ترشح می‌کنند و در تبادل گاز نقش دارند، تشکیل شده است. سلول‌های جامی<sup>۷</sup> تولیدکننده مخاط<sup>۸</sup> و سلول‌های پوششی مژکدار، سیستم مژکی-مخاطی<sup>۹</sup> را تشکیل می‌دهند که به‌طور فعال، مواد و میکروب‌های خارجی را از مجاری تنفسی حذف می‌کنند. در حال حاضر ایجاد یک مدل آزمایشگاهی شامل

- 
- 1- Nasopharyngeal
  - 2- Tracheobronchial
  - 3- Alveolar
  - 4- Lining
  - 5- Macrophage
  - 6- Engulf
  - 7- Goblet cells
  - 8- Mucus
  - 9- Muco-ciliary system

همه انواع سلول‌های ریوی از نظر فنی امکان‌پذیر نیست. هرچند، مدل‌های حاوی انواع سلول‌های کلیدی را می‌توان برای پیش‌بینی اثرات مواد استنشاقی بر ریه‌ها استفاده کرد. انتخاب انواع سلول‌ها نیز بستگی دارد به ناحیه‌ای از دستگاه تنفسی که پیش‌بینی می‌شود و یا مشخص شده‌است ماده موردآزمون در آن‌جا متمرکز بوده و همچنین به نتیجه زیستی مرتبط. چندین سیستم مبتنی بر سلول که برای ارزیابی اثرات نانوآشپا مورد استفاده قرار گرفته‌اند در زیربندهای ۲-۴-۵ تا ۳-۴-۵ شرح داده شده‌است.

#### ۲-۴-۵ سیستم‌های تک‌کشتی<sup>۱</sup>

سیستم‌های تک‌کشتی سلول‌ها و رده‌های سلولی گرفته‌شده<sup>۲</sup> از انسان به‌طور گسترده‌ای برای ارزیابی سمیت NOAA در شرایط غوطه‌وری و در ALI استفاده شده‌است [53][52][51][50][49][48]. مدل‌های کشت تک‌کشتی نشانه خوبی از سمیت آشکار NOAA ارائه می‌دهند و اغلب به‌عنوان اولین مرحله<sup>۳</sup> برای اولویت‌بندی آزمون بیشتر موردنیاز در سیستم‌های برون‌تنی پیچیده‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرند. از آن‌جایی که هر نوع سلول از نظر کارکردی ویژه است، انتخاب نوع سلول بستگی به محل موردانتظار در داخل بدن (در دستگاه تنفسی یا سیستمیک) دارد. جدول ۱ نمونه‌هایی از انواع سلول‌های مبتنی بر انسان را که برای آزمون NOAA استفاده شده‌اند و شرح مختصری برای هر یک را نشان می‌دهد [54][55][56]. این نوع سلول‌های ریوی به‌صورت تجاری در دسترس هستند و سلول‌های پرایمری<sup>۴</sup> را می‌توان از بیمارستان‌ها تهیه کرد.

---

1- Mono-culture  
2- Derived  
3- Tier  
4- Primary cells



جدول ۱- نمونه‌هایی از چند نوع سلول بر پایه انسانی استفاده‌شده برای آزمون NOAA

مراجع	ارزیابی نقاط پایانی	شاخصه‌ها	منبع	نوع	نوع سلول
[54] [57] [58] [59] [60] [61] [62]	- آپوپتوز (خران یاخته‌ای) <sup>۸</sup> - تنش اکسایشی <sup>۹</sup> - جزء جزء شدن DNA <sup>۱۰</sup> - سمیت ژنتیکی - پاسخ التهابی - یکپارچگی سدی <sup>۱۱</sup> - سمیت سلولی	پس از تمایز، یک فنوتیپ پوششی مطابق کاذب <sup>۴</sup> را نشان می‌دهند، متشکل از سلول‌های مژک‌دار <sup>۵</sup> ، غیرمژگانی <sup>۶</sup> و پایه <sup>۷</sup>	نمونه‌برداری‌های بافتی <sup>۲</sup> از نای و کارینال <sup>۳</sup> (در بالای محل دوشاخه شدن نای در ریه)	پرایمری	سلول‌های پوششی نایژک انسانی (HBE) <sup>۱</sup>
[57] [63] [64] [65]	- جزء جزء شدن DNA - سمیت ژنتیکی - پاسخ التهابی - یکپارچگی سدی	16HBE140- سلول‌ها دارای یک فنوتیپ انتقال- یون کلرید (Cl) <sup>۱۳</sup> هستند، تک‌لایه‌های قطبی را تشکیل می‌دهند، دارای کمپلکس‌های اتصال محکم <sup>۱۴</sup> هستند، مقاومت الکتریکی بالا بین بافت پوششی (TEER) ایجاد می‌کنند و حرکت نشانگرها و درشت‌مولکول‌های <sup>۱۵</sup> سلولی را محدود می‌کنند. سطوح بالایی از mRNA <sup>۱۶</sup> و پروتئین تنظیم‌کننده هدایت تراغشایی فیروز سیستمیک (CFTR) را بیان می‌کنند.	پوشش نایژه‌ای	رده سلولی	16HBE140 <sup>۱۲</sup>
[66] [67] [68] [69] [70] [71]	- زنده‌مانی سلولی - تکثیر سلولی - چرخه سلولی - گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) - پراکسیداسیون <sup>۲۰</sup> چربی DNA (به‌عنوان مثال آسیب DNA و متیلاسیون) - متالوتیونین (MT) <sup>۲۱</sup>		۱ میلی‌متر ناحیه نایژکی	پرایمری	سلول‌های پوششی راه هوایی کوچک (SAEC) <sup>۱۷</sup>

جدول ۱- (ادامه)

مراجع	ارزیابی نقاط پایانی	شاخصه‌ها	منبع	نوع	نوع سلول
[72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] [82] [83] [84] [85] [86] [87] [88] [89]	- سمیت سلولی - پاسخ پیش التهابی - سمیت ژنتیکی - آپوپتوز - تنش اکسایشی - یکپارچگی غشاء - دگرگونی سلولی <sup>۲۵</sup> - گذار مزانشیمی پوششی <sup>۲۶</sup>	ویتامین، کلاژن <sup>۲۳</sup> I E-کاده‌رین <sup>۲۴</sup> ، ICAM-1 VCAM-1 و پروتئین ترش‌حی سلول کلارا (CCSP) را بیان می‌کنند. این رده سلولی قطبی نمی‌شود و اتصالات محکمی ایجاد نمی‌کند.	نایژه	رده سلولی	رده سلول پوششی نایژک انسانی (BEAS-2B) <sup>۲۲</sup>
[90] [91] [92] [93] [94] [95] [96] [97]	- خواص سدی - آسیب <sup>۲۹</sup> - بیماری‌های سلول پوششی نایژک	این رده سلولی به دلیل سطوح نسبتاً بالایی از بیان تنظیم‌کننده هدایت تراغشایی فیبروز سیستیک (CFTR) به‌عنوان مدلی از «سلول سرورزی غدد زیرمخاطی راه‌های هوایی» <sup>۲۸</sup> مورد استفاده قرار می‌گیرد. این رده سلولی، جمعیت سلول‌های مزگانی و ترش‌حی، تک‌لایه‌های محکم در ALI را تشکیل می‌دهند و همچنین بیانگر SP-C و میوسین هستند.	سلول‌های پوششی راه هوایی	رده سلولی	Calu-3 <sup>۲۷</sup>
[54] [62] [98] [99] [100] [101] [102] [103] [104] [105] [106] [107]	- تنش اکسایشی - سمیت سلولی - سمیت ژنتیکی - آپوپتوز - جابه‌جایی	این رده سلولی برای نشان دادن سلول‌های پوششی ریوی نوع II استفاده می‌شود زیرا دارای اجسام تیغ‌های <sup>۳۱</sup> و ریزپرزه‌ها <sup>۳۲</sup> است و توانایی بیان CFTR، مواد سطح فعال پروتئین A، C، D و	سلول پوششی ریوی	رده سلولی	A549 <sup>۳۰</sup>

جدول ۱- (ادامه)

مراجع	ارزیابی نقاط پایانی	شاخصه‌ها	منبع	نوع	نوع سلول
[108] [109] [110] [111] [112] [113]		میوسین ۱ (MUC1) را دارد.			
[54] [101] [114]	- سمیت سلولی - التهاب - تنش اکسایشی	این سلول‌ها کاتین‌ها <sup>۳۴</sup> ، ICAM-1، خوشه‌تمایزی <sup>۳۵</sup> (CD) 58، CD44 و سطوح پایین CFTR را بیان می‌کنند، اما سلکتین‌ها <sup>۳۶</sup> و VCAM-1 را بیان نمی‌کنند. هنگامی که روی غشاهای نفوذپذیر کشت می‌شوند، TEER انجام می‌شود. سلول‌های NCI-H292 برای مطالعه مهاجرت پاراسلولی <sup>۳۷</sup> استفاده می‌شوند.	سلول پوششی ریوی	رده سلولی	<sup>۳۳</sup> NCI-H292
[115] [116]	- سمیت سلولی - یکپارچگی سدی - جابه‌جایی	این یک رده سلولی نامیراشده شبیه به نوع حبابچه انسانی است. سلول‌های hAELVi <sup>۳۸</sup> اتصالات محکم بین سلولی <sup>۳۹</sup> را تشکیل می‌دهند.	سلول پوششی ریوی	رده سلولی	رده سلولی نامیراشده لنتی‌ویروس پوششی حبابچه انسان <sup>۳۸</sup> (hAELVi)
[117]	- سمیت سلولی - التهاب - فعال‌سازی PPAR- $\gamma$ <sup>۴۶</sup>	این سلول‌ها از خون محیطی یک مرد مبتلا به لوسمی مونوسیتیک حاد <sup>۴۱</sup> گرفته شده بودند. سلول‌های THP-1 دارای گیرنده‌های <sup>۴۲</sup> Fc و <sup>۴۳</sup> C3b هستند و فاقد ایمونوگلوبین‌های سطحی <sup>۴۴</sup> و سیتوپلاسمی <sup>۴۵</sup> هستند.	خون	رده سلولی	<sup>40</sup> THP-1

جدول ۱- (ادامه)

مراجع	ارزیابی نقاط پایانی	شاخصه‌ها	منبع	نوع	نوع سلول
1	Human bronchial epithelial (HBE) cells				
2	Biopsies				
3	Carinal				
4	Pseudostratified				
5	Ciliated				
6	Non-ciliated				
7	Basal				
8	Apoptosis				
9	Oxidative stress				
10	DNA fragmentation				
11	Barrier integrity				
12	Human bronchial epithelial cell line				
13	Wild-type chloride				
14	Tight junctional complexes				
15	Macromolecules				
16	Messenger ribonucleic acid				
17	Small airway epithelial cells				
18	Aquaporin 3				
19	Express				
20	Lipid peroxidation				
21	Metallothionein				
22	Human bronchial epithelial cell line				
23	Collagen I				
24	E-cadherin				
25	Cellular transformation				
26	Epithelial-mesenchymal transition				
27	Calu-3				
28	Airway submucosal gland acinar serous cell				
29	Injury				
30	Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells				
31	Lamellar bodies				
32	Microvilli				
33	Human pulmonary mucoepidermoid carcinoma cell line				
34	Catenins				
35	Cluster of differentiation				
36	Selectins				
37	Paracellular				
38	Human alveolar epithelial lentivirus immortalized cell line				
39	Intercellular				
40	A human monocytic cell line				
41	Acute monocytic leukaemia				
42	Fc receptor				
43	C3b receptor				
44	Surface immunoglobulins				
45	Cytoplasmic immunoglobulins				
46	Peroxisome proliferator- activated receptor gamma				

### ۳-۴-۵ کشت‌های هم‌زمان / سیستم‌های سه‌بعدی

اگرچه سیستم‌های تک‌کشتی به‌طور گسترده‌ای برای ارزیابی سمیت غیراختصاصی NOAAها مورد استفاده قرار گرفته‌اند، اما سیستم‌های کشت‌هم‌زمان با چندین نوع سلول می‌توانند، شباهت بیشتری به وضعیت درون‌تنی داشته‌باشند و برای مطالعه تعامل بین‌سلولی، بین چندین نوع سلول استفاده شوند. انواع سلول‌های ذکرشده در جدول ۱ در ترکیب با انواع دیگر سلول‌ها برای ارزیابی تأثیر NOAA بر دستگاه تنفسی استفاده شده‌است. انتخاب سلول‌ها برای گنجاندن در یک سیستم کشت‌هم‌زمان بستگی به هدف مطالعه دارد [55].

به‌عنوان مثال، می‌توان از یک کشت هم‌زمان سلول‌های اندوتلیال (درون‌رگی)<sup>۱</sup> و پوششی برای شبیه‌سازی سد خونی-ریوی استفاده کرد، درحالی‌که ماکروفاژها و/یا سلول‌های دندریتیک (دارینه‌ای)<sup>۲</sup> را می‌توان با سایر سلول‌های ریوی برای مطالعه نقش سلول‌های ایمنی کشت کرد. نکته قابل‌توجه این است که انتخاب مولد هواسل و محفظه مواجهه فقط مربوط به سیستم‌هایی است که سلول‌ها در معرض مواد آزمون در ALI قرار می‌گیرند.

در جدول ۲ نمونه‌هایی از سیستم‌های کشت هم‌زمان (غوطه‌وری و در ALI) را که در مطالعات سمیت NOAA همراه با نقاط پایانی ارزیابی شده در آن مطالعات مورد استفاده قرار گرفته، فهرست شده است.

جدول ۲- نمونه‌هایی از چند سیستم کشت هم‌زمان بر پایه انسانی استفاده شده برای آزمون NOAA

سیستم کشت هم‌زمان	نقاط پایانی آزمون شده	مواد آزمون	مراجع
کشت هم‌زمان SAECs و سلول‌های اندوتلیال ریزعروق <sup>۱</sup> انسانی	- سمیت سلولی - التهاب - تنش اکسایشی - برداشت <sup>۲</sup> - ریخت‌شناسی - رگ‌زایی <sup>۳</sup>	- نانولوله‌های کربنی چنددیواره (MWCNTs) - نانوذرات منتشرشده از چاپگر	[118] [119] [120]
کشت هم‌زمان hAELVi و THP-1	- یکپارچگی سدی - سمیت سلولی - جابه‌جایی <sup>۴</sup>	- نانوذرات نقره (Ag NPs)	[115]
Calu-3، ماکروفاژها (THP-1) و سلول‌های اندوتلیال (رده سلولی HPMEC-ST1.6R) <sup>۵</sup>	- جابه‌جایی	- نانوذانه‌های پلی‌استایرن <sup>۶</sup>	[94]
کشت هم‌زمان سه‌گانه <sup>۷</sup> سلول‌های A549، سلول‌های دندریتیک گرفته‌شده از مونسیت‌های خون محیطی انسان (MDDC) <sup>۸</sup> و ماکروفاژهای گرفته‌شده از مونسیت‌ها (MDM) <sup>۹</sup>	- سمیت سلولی - پاسخ پیش و ضدالتهابی - تنش اکسایشی	- Ag NPs - NPs طلا (Au) - MWCNTs	[118] [121] [122] [123] [124] [125] [126]
کشت هم‌زمان سه‌گانه	- سمیت سلولی	- NPs رنگ	[127]

1- Endothelial  
2- Dendritic cells

جدول ۲- (ادامه)

سیستم کشت هم‌زمان	نقاط پایانی آزمون شده	مواد آزمون	مراجع
16HBE14o، THP-1 و سلول‌های اندوتلیال ریزعروق ریه انسان <sup>۱۰</sup> (HLMVEC)	- التهاب - یکپارچگی سدی	- NPs دی‌اکسید تیتانیوم (TiO <sub>2</sub> ) - Ag NPs - NPs دی‌اکسید سیلیکون (SiO <sub>2</sub> )	
کشت هم‌زمان سه‌گانه MDDC، 6HBE14o و MDMs کشت داده‌شده در ALI	- سمیت سلولی - پاسخ پیش‌التهابی - تنش اکسایشی	- MWCNTs - CNTs تک‌جداره (SWCNT)	[128]
کشت هم‌زمان سه‌گانه سلول‌های پوششی A549، THP-1 و سلول‌های اندوتلیال (EA.hy 926 <sup>۱۱</sup> یا HUVEC)	- سمیت سلولی - تکثیر - التهاب - یکپارچگی سدی - تنش اکسایشی	- SiO <sub>2</sub> - MWCNTs	[129] [130]
کشت هم‌زمان سه‌گانه رده سلولی پوششی حبابچه‌ای NCI-H441، رده سلولی اندوتلیوم ریزعروق انسانی ISO-HAS1 و سلول‌های THP-1	- سمیت سلولی - یکپارچگی سدی - پیش‌التهاب - تنش اکسایشی - برداشت	- نانوذرات SiO <sub>2</sub>	[131]
کشت چهارگانه <sup>۱۲</sup> رده سلولی A549، THP-1، مَسْت‌سل‌ها (HMC-1) <sup>۱۳</sup> و سلول‌های اندوتلیال (EA.hy 926)	- تنش اکسایشی - یکپارچگی سدی - پیش‌التهاب	- نانوذرات ردآمین- <sup>۱۴</sup> SiO <sub>2</sub>	[26]
کشت هم‌زمان سلول‌های پوششی حبابچه انسان و سلول‌های اندوتلیال ریزعروق ریوی انسانی در ALI، در طرف مقابل غشا در یک محفظه ریزسیالی <sup>۱۵</sup> قادر به ایجاد جریان مایع و فشار مکانیکی (برای شبیه‌سازی تنفس) به سلول‌ها است.	- یکپارچگی سدی - التهاب	- SiO <sub>2</sub>	[132]

جدول ۲- (ادامه)

سیستم کشت همزمان	نقاط پایانی آزمون شده	مواد آزمون	مراجع
			1 Microvascular
			2 Uptake
			3 Angiogenesis
			4 Translocation
			5 The immortalized human pulmonary microvascular endothelial cell line
			6 Polystyrene nanobeads
			7 Triple co-culture
			8 Human peripheral blood monocyte derived dendritic cells
			9 Monocyte derived macrophages
			10 Human lung microvascular endothelial cells
			11 Immortalized Human Vascular Endothelial Cell (developed via fusion between a HUVE cell with an A549/8 cells)
			12 Tetra-culture
			13 Mast cells
			14 SiO <sub>2</sub> -Rhodamine nps
			15 Microfluidic

علاوه بر سیستم‌هایی که در جداول ۱ و ۲ مورد بحث قرار گرفته است، چندین مدل برون‌تنی برپایه ساخت مجدد بافت انسانی در بازار به صورت تجاری در دسترس است که برای ارزیابی سایر مواد (به‌عنوان مثال دود سیگار) استفاده می‌شود و می‌تواند برای آزمون تأثیر NOAA بر سیستم تنفسی در پی مواجهه استنشاقی مورد استفاده قرار گیرد [134] [133] [135] [136] [137] [138] [139] [140] [141] [142] [143] [144] [145] [146] [147] [148] [149] [150] [151] [152].

این مدل‌ها حاوی سلول‌های انسانی در پیکربندی فیزیولوژیکی مرتبط هستند و می‌توانند برای مطالعه نتایج پیچیده زیستی مربوط به مواجهه ذرات مورد استفاده قرار گیرند. افزودن لایه‌ای دیگر از ارتباط فیزیولوژیکی به مدل‌های مبتنی بر بافت، مدل‌های اندام بر روی تراشه است که جنبه‌های مکانیکی ریه (به‌عنوان مثال حرکت تنفسی و تنش برشی) را شامل می‌شود [153] [154]. آزمون برون‌زیوه‌ای<sup>۱</sup> (خارج از بدن) دقیق باریکه‌های برش ریه انسان، نمونه دیگری از سیستمی است که می‌تواند برای آزمون اثرات NOAA در انسان مورد استفاده قرار گیرد [155] [156] [157].

انتخاب انواع سلول و نقاط پایانی بستگی به هدف مطالعه دارد. استفاده از رده‌های سلولی دو بعدی تک‌کشتی نسبتاً آسان و ارزان است، اما ممکن است ارتباط فیزیولوژیکی کمتری داشته باشند. پیچیدگی، هزینه‌ها و ارتباط فیزیولوژیکی، با کشت همزمان، کشت‌های سه‌بعدی، مدل‌های سه‌بعدی مجدد ساخته شده و آزمون برون‌زیوه‌ای دقیق باریکه‌های برش ریه انسانی افزایش می‌یابد. هنگام انتخاب مدل سلولی، توصیه می‌شود ناحیه‌ای از ریه که پیش‌بینی می‌شود یا مشخص شده است که NOAA در آنجا متمرکز می‌شود نیز در نظر گرفته شود. سایر مشخصه‌های سیستم سلولی که باید هنگام طراحی مطالعه مورد توجه قرار گیرد

1- Ex vivo

عبارتند از: مناسب بودن برای کشت در ALI، توانایی ایجاد اتصالات محکم، توانایی مواجهه سلول‌ها در مواجهه یک‌باره یا مکرر، بازخوانی‌ها یا نقاط پایانی احتمالی که می‌تواند اندازه‌گیری شود، همبستگی با داده‌های موجود (از مطالعات موجود در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی) و در صورت وجود، تنوع اهداکننده. همچنین مهم است که شامل کنترل‌های مناسب در طرح مطالعه شامل مثبت، منفی، هوای تمیز و کنترل‌های گرم‌خانه‌ای باشد. کنترل‌های مثبت و منفی، سلول‌هایی هستند که در معرض مواد (مرجع) با پاسخ مثبت و منفی شناخته‌شده قرار داده شده‌اند. کنترل‌های هوای تمیز، سلول‌هایی هستند که در معرض هوای تمیز قرار می‌گیرند. کنترل‌های گرم‌خانه‌ای، سلول‌هایی هستند که در معرض نبوده، اما تحت شرایط مشابه سلول‌های در معرض کشت، قرار می‌گیرند.

سیستم‌های مبتنی بر سلول که در بالا توضیح داده شد برای مطالعه جنبه‌های مکانیکی مربوط به نتایج زیستی مشاهده‌شده پس از مواجهه NOAA استفاده می‌شود. اما به دلیل پیچیدگی سیستم‌ها و پاسخ‌های زیستی، ممکن است مجموعه‌ای از این سیستم‌های سلولی همراه با رویکردهای دیگر (به‌عنوان مثال رویکردهای مدل‌سازی) برای پیش‌بینی پاسخ‌های انسانی مورد نیاز باشد. پیوست الف مروری اجمالی بر کاربرد مسیرهای پیامدهای نامطلوب (AOP) را برای طراحی رویکردهای مبتنی بر ارزیابی‌های برون‌تنی برای پیش‌بینی پیامدهای نامطلوب پیچیده، ارائه می‌دهد.

به‌منظور افزایش بیشتر درستی<sup>۱</sup> این سیستم‌های برون‌تنی برای پیش‌بینی اثرات انسانی، عوامل بیشتری باید در نظر گرفته و گزارش شوند. به‌عنوان مثال، اطلاعات مربوط به مشخصه‌یابی مدل‌های سلولی، پروتکل‌ها و شرایط کشت سلولی، وسایل آزمایشگاهی (به‌عنوان مثال ظروف کشت)، محیط کشت و مکمل‌ها و شماره پاساژ<sup>۲</sup> سلول باید گزارش شود، زیرا این عوامل بر رفتار سلول‌ها در کشت تأثیر می‌گذارند [158] [159]. هنگامی که سلول‌ها برای تکثیر<sup>۳</sup> در مرحله آماده‌سازی در شرایط غوطه‌وری در فلاسک‌ها/دیسک‌های<sup>۴</sup> کشت بافت، کشت می‌شوند، شرایط کشت مورد استفاده باید گزارش شود. استفاده از سلول‌ها و رده‌های سلولی از منابع شناخته‌شده در تعداد پاساژ اولیه<sup>۵</sup> و استفاده از یک محیط شیمیایی تعریف‌شده<sup>۶</sup> می‌تواند تکرارپذیری و مقایسه بین آزمایشگاهی را تسهیل کند [160][161].

- 
- 1- Accuracy
  - 2- Passage
  - 3- Propagation
  - 4- Disk
  - 5- Early passage
  - 6- Chemically-defined



پس از انتخاب یک سیستم آزمون برون تنی و نقاط پایانی برای ارزیابی، آزمون شکل NOAA و غلظت آن که مواجهه واقعی انسان را نشان می دهد، مهم است.

## ۶ انتخاب دُز مناسب و سنجش‌های دُز<sup>۱</sup>

### ۱-۶ کلیات

دُزیمتری به برآورد یا اندازه‌گیری مقدار یک ماده در یک موضع زیستی هدف در یک مقطع زمانی خاص اشاره دارد [162]. سنجش کمی<sup>۲</sup> دُز برای استنتاج روابط غلظت/دُز- پاسخ در ارزیابی ریسک نقش حساسی و مهم است. به‌طور کلی، جرم، رایج‌ترین سنجش برای توصیف غلظت مواد شیمیایی در مطالعات، سمیت است، اما برای نانوآشپاء، جرم به تنهایی ممکن است دُز را به‌طور مناسب توصیف نکند. نانوآشپاء با ترکیب شیمیایی یکسان می‌توانند دُز و توزیع داخلی کاملاً متفاوتی در بین ارگان‌ها داشته‌باشند [163][164]. بنابراین، سنجش‌های دیگر دُز مانند تعداد ذرات، حجم یا مساحت سطح نیز باید در نظر گرفته شوند، زیرا مشخص شده‌است که این خواص در سمیت NMs نقش دارند.

استنشاق مهمترین مسیر مواجهه نانوآشپاء است و خواص فیزیکوشیمیایی آنها بر الگوی نهشت در ریه‌ها تأثیر می‌گذارد. مطالعات متعددی برای به‌دست‌آوردن سنجش دُز مناسب برای NOAA پس از استنشاق انجام شده‌است. یک رویکرد برای تعیین مناسب‌ترین توصیف دُز پیشنهاد شده‌است [165] که از لحاظ نظری می‌تواند شامل خواص فیزیکوشیمیایی ذرات مانند اندازه ذرات، پتانسیل زتا، واکنش‌پذیری سطح و شاخص پراکندگی یا ترکیبی از آن باشد [165]. برای نانوآشپاء که به‌راحتی در بدن حل می‌شوند، جرم می‌تواند سنجش مفیدی باشد، زیرا اثر مربوط به یون‌های آزادشده، مشابه مواد معمولی است [166]. توجه شود، پیش از آنکه نهشت و انحلال ذرات رخ دهد، طبیعت ذره‌ای مواجهه نانوآشپاء بر دُز موضعی و سمیت حاکم است. بنابراین، پیش از آنکه انحلال رخ دهد، تعداد ذرات ممکن است در یک سنجش دُز، مناسب باشد. نشان داده شده‌است مساحت سطح ذرات، سنجش مفیدی برای برون‌یابی نانوآشپاء در طیف وسیعی از اندازه‌ها [163] و همچنین طبقه‌بندی پودرهای نانوشیء [167] است. برای نانوآشپائی که از تعریف سازمان بهداشت جهانی (WHO)<sup>۳</sup> برای یک لیف پیروی می‌کنند [یعنی: یک لیف دارای طول (L) بیشتر از ۵ میکرومتر، قطر (D) کمتر از ۳ میکرومتر و نسبت منظری<sup>۴</sup> (L/D) بزرگتر از ۳ است]، پیشنهاد شده‌است که تعداد ذرات، سنجش مناسبی است، زیرا نانوآشپاء ممکن است سازوکار فعالیتی مشابه با الیاف آریست داشته‌باشند. هرچند بهتر است در نظر گرفته شود که این خواص به شرایط تجربی بستگی دارند و بنابراین مناسب‌ترین سنجش‌های دُز برای NOAA نیز به احتمال زیاد برای شرایط مختلف تجربی و موقعیت‌های زندگی واقعی، از جمله مسیرهای مختلف مواجهه یا حتی برای نقاط پایانی مختلف سمیت، متفاوت است. بنابراین، در محاسبه چنین تغییراتی، ترکیبی از دو یا چند سنجش برای ارزیابی سمیت پیشنهاد شده‌است، به‌عنوان مثال توزیع

1- Dose metrics  
2- Quantitation  
3- World Health Organization  
4- Aspect ratio

اندازه به همراه غلظت‌های جرمی یا مساحت سطح کل، به یک تمایز سازوکاری بیشتری در پاسخ‌های ریوی به مواجهه با NOAA، کمک می‌کند [168]. علاوه بر سنجش‌های دُز، یکی دیگر از جنبه‌های مهم، دُز نهشت‌یافته است. شناسایی سناریوی مواجهه انسانی که از سیستم برون‌تنی برای ارزیابی و انتخاب غلظتی که نشان‌دهنده آن سناریوی خاص است، استفاده می‌کند، بسیار مهم است. به‌عنوان مثال، پیشنهاد می‌شود برای ارزیابی NOAA مربوط به مواجهه شغلی، غلظت‌های هواسل آزمون، شامل حدود دُز توصیه‌شده توسط اداره ایمنی و بهداشت شغلی (OSHA)<sup>۱</sup> باشد. متوسط مواجهه محیط شهری و مواجهه شغلی با استاندارد فعلی توصیه شده OSHA برای گردوغبار مزاحم به‌عنوان مرزهای مواجهه انسانی، محدوده متناظر به جرم حد-بالا تر و شار عددی وارد شده به بافت ریه، به ترتیب  $3 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  تا  $5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  و  $2 \text{ p}/\text{c}/\text{h}$  تا  $300 \text{ p}/\text{c}/\text{h}$  است [16]. در نظر گرفتن غلظت‌های مرتبط با مواجهه واقعی انسان می‌تواند به برون‌یابی داده‌های برون‌تنی به پیامدهای<sup>۲</sup> انسانی کمک کند. برای استنتاج روابط دُز-پاسخ، اطلاعاتی در مورد مقدار NOAA که در موضع تحت‌تاثیر نهشته می‌شود، موردنیاز است. با بیان دُز نهشت‌یافته به‌صورت جرم ذره، توزیع اندازه ذرات بر اساس تعداد، تعداد ذرات یا مساحت سطح در سانتی‌متر مربع، می‌توان دُزها را بین مطالعات مختلف مقایسه کرد. بنابراین، توصیه می‌شود غلظت (یا دُز) در سنجش‌های مختلف، از جمله جرم، توزیع اندازه ذرات بر اساس تعداد، تعداد ذرات و مساحت سطح (شامل اطلاعات مربوط به قطر داخلی و خارجی و پایداری سطح<sup>۳</sup>، در صورت لزوم) بیان شود. هنگامی که این داده‌ها شناخته می‌شوند، امکان تبدیل به سنجش دُز دیگری برای ارزشیابی یک رابطه دُز-پاسخ فراهم می‌شود.

برای تسهیل بیشتر مقایسه دُز در مطالعات، استفاده از روش‌ها و رویکردهای استاندارد برای آزمون NOAA مهم است. رویکردهای یکپارچه‌ای برای NMs پیشنهاد شده‌است که شامل آماده‌سازی و مشخصه‌یابی مناسب تعلیق‌های NOAA و استفاده از روش‌های مدل‌سازی عددی پیشرفته برای سرنوشت و انتقال (ترکیبات شیمیایی در بدن) برای برآورد سنجش‌های دُز دریافت‌شده<sup>۴</sup> است [169]. برای یک سیستم کشت غوطه‌وری، یک پاسخ دُز می‌تواند با تغییر غلظت NOAA که باید در پراکنش اضافه‌شود، به‌دست آید. برای مواجهه با هواسل، سیستم‌های مواجهه هواسل چالش برانگیزتر هستند و اغلب برای استفاده از دُزهای مختلف به‌طور همزمان در همان سیستم مواجهه امکان‌پذیر نیستند. با این حال، برای ارزشیابی دُزهای مختلف

---

1- Occupational Safety and Health Administration  
 2- Outcomes  
 3- Surface stabilization  
 4- Delivered

مواجهه در یک سیستم ALI، می‌توان از غلظت ثابت NOAA در هواسل استفاده کرد یا سیستم‌های چندگانه مواجهه هواسل می‌توانند به‌طور همزمان با غلظت/دُزهای مختلف در هر یک، استفاده شود.

## ۶-۲ روش‌های درون‌رایانه‌ای برای ارزیابی دُز/سنجش‌های دُز و نهشت

برای برآورد دُز نهشت‌یافته (از نظر جرم و سطح) در داخل بدن، چندین مدل درون‌رایانه‌ای می‌توان استفاده کرد که ممکن است به غلظت نهشته‌شده در شرایط برون‌تنی در ALI، تفسیرشود. از دینامیک محاسباتی سیالات (CFD)<sup>۱</sup> یا مدل دُزیمتری ذرات مسیر-چندگانه (MPPD) می‌توان برای پیش‌بینی نهشت نانوشتی در داخل مجاری تنفسی استفاده کرد که سپس می‌تواند برای تعیین غلظت مواد آزمون برای آزمایشات برون‌تنی استفاده شود. این رویکردهای مدل‌سازی به پارامترهای ورودی مانند قطر میانه شمارش ذرات (CMD)<sup>۲</sup>، قطر آیرودینامیکی میانه جرم (MMAD)<sup>۳</sup>، انحراف معیار هندسی (GSD)<sup>۴</sup> و چگالی برای پیش‌بینی پروفایل (رخ‌نما)<sup>۵</sup> نهشت و کارایی، وابسته هستند. براساس محل نهشت پیش‌بینی‌شده با استفاده از رویکردهای مدل‌سازی، انواع سلول‌ها را می‌توان برای طراحی مطالعه برون‌تنی انتخاب کرد.

علاوه بر مدل‌های CFD و MPPD، مدل‌هایی نیز وجود دارند که مخصوص مواجهه شرایط برون‌تنی تحت شرایط غوطه‌وری هستند: مانند مدل‌های ته‌نشینی، انتشار و دُزیمتری برون‌تنی (ISDD)، ته‌نشینی، انتشار، انحلال و دُزیمتری برون‌تنی (ISD3) [171][170]. برای تعیین دُزهای سلولی ذرات تک‌پراکنه<sup>۶</sup>، می‌توان از ISDD استفاده کرد که به پارامترهای ورودی شامل دما، چگالی و گرانشی محیط، ارتفاع محیط، اندازه هیدرودینامیکی ذرات در محیط آزمون و چگالی ذرات، نیاز دارد. مدل ISD3 مکملی برای ISDD است که تأثیر انحلال بر دُزیمتری سلولی را در نظر می‌گیرد.

علاوه بر این، روش‌های مدل‌سازی مانند روش سانتریفیوژ حجمی<sup>۷</sup>، (ISDD - VCM) ISDD، یا مدل توری اعوجاج‌یافته (DG)<sup>۸</sup> وجود دارد که می‌تواند برای پیش‌بینی غلظت تجویز شده برای دستیابی به دُز دریافت‌شده هدف، مورد استفاده قرار گیرد [172].

- 
- 1- Computational fluid dynamics
  - 2- Particle count median diameter
  - 3- Mass median aerodynamic diameter
  - 4- Geometric standard deviation
  - 5- Profile
  - 6- Monodispersed
  - 7- Volumetric Centrifugation Method
  - 8- Distorted Grid

## ۷ خلاصه

هنگام طراحی مطالعات برون تنی NOAA هوابرد، چندین پارامتر در نظر گرفته می‌شود، مانند انتخاب روش مناسب مواجهه، انواع سلول‌های مربوطه، سیستم‌های مواجهه و غلظت که نشان‌دهنده مواجهه واقعی انسان باشد (به شکل ۵ مراجعه شود). این پارامترها به‌طور کلی برای آزمون هر نوع NOAA (تصادفی یا ساخته‌شده) کاربرد دارد. درک سازوکاری اطلاعات موجود همراه با مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی مواد آزمون می‌تواند به آگاهی‌ها در طراحی مطالعه کمک کند. علاوه بر این، استفاده از پروتکل‌های استاندارد شده برای انجام هر یک از مراحل مطالعه می‌تواند به مقایسه بین‌آزمایشگاهی در نتایج آزمون کمک کرده و برداشت روش‌های آزمون برون تنی را برای اهداف مقرراتی و غیرمقرراتی تسهیل کند.



شکل ۵ - طرحواره‌ای از فهرست پارامترهای در نظر گرفته شده مهم هنگام طراحی مطالعات برون تنی NOAA هوابرد

## پیوست الف (آگاهی‌دهنده)

### کاربرد مسیرهای پیامد نامطلوب (AOPs) برای طراحی رویکردهای مبتنی بر آزمون برون تنی

با توجه به پیچیدگی پاسخ‌های سلولی پس از مواجهه استنشاقی NOAA (یا سایر ترکیبات شیمیایی)، هر یک از سنجش‌های برون‌تنی ممکن است برای ثبت پیشرفت یک اثر مشخص نامطلوب، کافی نباشند. هرچند، ترکیبی از سنجش‌های برون‌تنی در ارتباط با داده‌های موجود (به‌عنوان مثال، درون‌تنی، برون‌تنی، درون‌رایانه‌ای) می‌تواند در رویکردهای یکپارچه که پیامدهای انسانی را پیش‌بینی می‌کنند، مورد استفاده قرار گیرد. با وجود این، توجه شود وقتی که داده‌ها از ترکیبی از سنجش‌های برون‌تنی به‌دست می‌آیند، پارامترهای مورد استفاده (به‌عنوان مثال شرایط مواجهه) در این سیستم‌های برون‌تنی به وضوح شناسایی شوند، به‌خصوص وقتی که داده‌های حاصل از کشت غوطه‌وری و سیستم‌های ALI مواجهه‌یافته با هوا ترکیب می‌شوند تا در مورد اثرات نامطلوب/سمی احتمالی NOAA نتیجه‌گیری شود. به‌عنوان مثال یک رویکرد یکپارچه برای آزمون ارزیابی (IATA) که در سند راهنمای OECD منتشر شده‌است، خوردگی و تحریک پوست است، اگرچه مختص NOAA نیست [173]. چنین رویکردهای یکپارچه‌ای می‌تواند بر اساس AOPs باشد که نمایانگر توالی رویدادهای کلیدی است که منجر به یک پیامد نامطلوب با شروع یک رویداد آغازگر مولکولی (MIE)<sup>۱</sup> می‌شوند. به‌نظر می‌رسد NOAA و اثرات نامطلوب ناشی از مواد شیمیایی عمدتاً در رویدادهای کلیدی اولیه (KEs)<sup>۲</sup>، متفاوت هستند. بنابراین، اکثر اطلاعات سازوکاری جمع‌آوری‌شده برای AOPs مربوط به مواد شیمیایی، در مورد اثرات نامطلوب القاء‌شده NOAA است و گسترش کاربردی این AOPs در ارزیابی ریسک NOAA است [115].

مسیرهای پیامد نامطلوب مستقل - از ماده<sup>۳</sup> هستند و می‌توانند به موارد زیر کمک کنند:

الف - سازماندهی اطلاعات علمی موجود در مورد پیامدهای نامطلوب ارزیابی‌شده؛

ب - شناسایی خلاءهای اطلاعاتی؛

پ - شناسایی سنجش‌های برون‌تنی و درون‌رایانه‌ای که می‌توانند برای ارزیابی رویدادهای کلیدی منجر به پیامدهای نامطلوب استفاده شود یا توسعه داده‌شود [56].

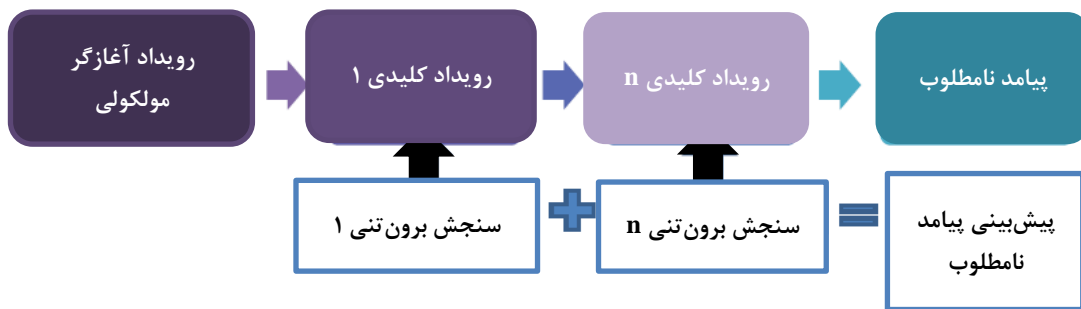
بنابراین، AOPs می‌توانند به شناسایی سنجش‌های برون‌تنی مناسب برای هدف کمک کنند که به درک سازوکاری پیامدهای نامطلوب مرتبط است [174]. شکل الف-۱ طرح کلی پیش‌بینی این که چگونه می‌توان از سنجش‌های برون‌تنی در یک رویکرد پیامد نامطلوب استفاده کرد را نشان می‌دهد. از سنجش‌های برون‌تنی

---

1- Molecular Initiating Event  
2- Initial Key Events  
3- Substance-agnostic

می‌توان برای ارزشیابی نشانگرهای زیستی قابل اندازه‌گیری مربوط به هر KE استفاده کرد. مجموعه سنجش‌های اندازه‌گیری KEs مختلف می‌توانند در مجموع، پیامدهای آسیب‌شناختی پیچیده‌ای را در انسان پیش‌بینی کنند.

باین‌حال، توجه شود هنگام ساخت یک AOP برای سمیت استنشاقی NOAA براساس سیستم‌های برون‌تنی، مواجهه در شرایط ALI ممکن است باعث ایجاد MIE متفاوت در مقایسه با واکنش سلول‌ها به NOAA در شرایط غوطه‌وری شود. بنابراین، توصیه می‌شود MIE همچنین در مواجهه با هوا سل تعیین شود. اگر فقط اطلاعاتی در مورد MIE بر اساس پاسخ سلولی در شرایط کشت سلولی غوطه‌وری وجود داشته باشد، شباهت پاسخ سلولی در شرایط غوطه‌وری لازم است در برابر چنین پاسخی در شرایط ALI ارزشیابی شود. تعدادی AOPs در OECD در دست نندوین هستند، به مرجع [177] مراجعه شود.



شکل الف-۱- نمایش یک مسیر پیامد نامطلوب شروع شده با یک رویداد آغازگر مولکولی به دنبال رویدادهای کلیدی منجر به پیامد نامطلوب

### کتابنامه

- [1] Clippinger A.J., Ahluwalia A., Allen D. et al. ,Expert consensus on an in vitro approach to assess pulmonary fibrogenic potential of aerosolized nanomaterials. *Archives of toxicology*. 2016, 90(7), pp. 1769–1783
- [2] ISO/TR 19601, Nanotechnologies — Aerosol generation for air exposure studies of nano-objects and their aggregates and agglomerates (NOAA)
- یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۹۶۰: سال ۱۳۹۸، فناوری نانو- تولید هواسل برای مطالعات مواجهه با نانواشیاء و انبوهه‌ها و کلوخه‌های آن‌ها از طریق هوا، با استفاده از استاندارد ISO/TR 19601: 2017 تدوین شده‌است.
- [3] Hayes A, Bakand S, Winder C. Novel In-Vitro Exposure Techniques for Toxicity Testing and Biomonitoring of Airborne Contaminants. In: *Drug Testing in vitro*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, pp. 103–123
- [4] Morin J-P, Fouquet F, Monteil C, Le Prieur E, Vaz E, Dionnet F, Development of a new in vitro system for continuous in vitro exposure of lung tissue to complex atmospheres: Application to diesel exhaust toxicology. *Cell Biology and Toxicology*. 1999, 15(3), pp. 143–152
- [5] Polk W.W, Sharma M, Sayes C.M, Hotchkiss J.A, Clippinger A.J, Aerosol generation and characterization of multi-walled carbon nanotubes exposed to cells cultured at the air-liquid interface. *Part Fibre Toxicol*. 2016, 13, pp. 20
- [6] Sánchez Jiménez A, Brouwer D, van Tongeren M. *Workplace Inhalation Exposure to Engineered Nanomaterials*. 2014
- [7] Sayes C.M, Reed K.L, Warheit D.B Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 2007, 97(1), pp. 163–180
- [8] Cho S.H, Tong H, McGee J.K, Baldauf R.W, Krantz Q.T, Gilmour M.I, Comparative toxicity of size-fractionated airborne particulate matter collected at different distances from an urban highway. *Environmental health perspectives*. 2009, 117(11), pp. 1682–1689
- [9] Yamaguchi T, Yamazaki H., Cytotoxicity of Airborne Particulates Sampled Roadside in Rodent and Human Lung Fibroblasts. *Journal of Health Science*. 2001, 47(3), pp. 272–277
- [10] Brandenberger C, Rothen-Rutishauser B, Mühlfeld C et al. , Effects and uptake of gold nanoparticles deposited at the air-liquid interface of a human epithelial airway model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010, 242(1), pp. 56–65
- [11] Fröhlich E, Salar-Behzadi S., Toxicological Assessment of Inhaled Nanoparticles: Role of in Vivo, ex Vivo, in Vitro, and in Silico Studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, 15(3), pp. 4795–4822
- [12] Ahmad S, Ahmad A, Neeves K.B et al. In vitro cell culture model for toxic inhaled

chemical testing. *J Vis Exp.* 2014(87)

- [13] Blank F, Rothen-Rutishauser B.M, Schurch S, Gehr P, An optimized in vitro model of the respiratory tract wall to study particle cell interactions. *Journal of aerosol medicine.* 2006, 19(3), pp. 392–405
- [14] Nanoreg. NANoREG Deliverables & SOPs. <http://www.nanoreg.eu/media-and-downloads/deliverable-reports/312-nanoreg-deliverables-sops>. Accessed January 19, 2018. Published 2017
- [15] Frohlich E, Bonstingl G, Hofler A et al. Comparison of two in vitro systems to assess cellular effects of nanoparticles-containing aerosols. *Toxicology in vitro: An international journal published in association with BIBRA.* 2013, 27(1), pp. 409–417
- [16] Paur H.-R, Cassee F.R, Teeguarden J et al. , In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung — A dialog between aerosol science and biology. *Journal of Aerosol Science.* 2011, 42(10), pp. 668–692
- [17] ISO/TR 19057, Nanotechnologies — Use and application of acellular in vitro tests and methodologies to assess nanomaterial bi durability
- یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۱۵۶: سال ۱۳۹۸، فناوری نانو- استفاده و کاربرد آزمون‌های برون‌تنی بدون سلولی روش‌شناسی‌های ارزیابی ماندگاری زیستی نانوماده، با استفاده از استاندارد ISO/TR 19057: 2017 تدوین شده‌است.
- [18] Lacroix G, Koch W, Ritter D et al. , Air–Liquid Interface In Vitro Models for Respiratory Toxicology Research: Consensus Workshop and Recommendations. *Applied In Vitro Toxicology.* 2018, 4(2), pp. 91–106
- [19] Ghio A.J, Dailey L.A, Soukup J.M, Stonehuerner J, Richards J.H, Devlin R.B, Growth of human bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle exposure. *Part Fibre Toxicol.* 2013, 10, pp. 25
- [20] Lenz A.-G, Karg E, Brendel E et al. , Inflammatory and Oxidative Stress Responses of an Alveolar Epithelial Cell Line to Airborne Zinc Oxide Nanoparticles at the Air-Liquid Interface: A Comparison with Conventional, Submerged Cell-Culture Conditions. *BioMed Research International.* 2013, 2013, pp. 12
- [21] Bitterle E, Karg E, Schroepel A et al. , Dose-controlled exposure of A549 epithelial cells at the air-liquid interface to airborne ultrafine carbonaceous particles. *Chemosphere.* 2006, pp. 65
- [22] Lenz A.G, Karg E, Lentner B et al. , A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2009, 6(32)
- [23] Raemy D.O, Grass R.N, Stark W.J et al. , Effects of flame made zinc oxide particles in human lung cells — a comparison of aerosol and suspension exposures. *Part Fibre Toxicol.* 2012, 9, pp. 33



- [24] Holder A.L, Lucas D, Goth-Goldstein R, Koshland C.P, Cellular Response to Diesel Exhaust Particles Strongly Depends on the Exposure Metho. *Toxicological Sciences*. 2008, 103(1), pp. 108–115
- [25] Panas A, Comouth A, Saathoff H et al. , Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air–liquid interface compared to conventional submerged exposure. *Beilstein journal of nanotechnology*. 2014, 5, pp. 1590–1602
- [26] Klein S.G, Serchi T, Hoffmann L, Blömeke B, Gutleb A.C, An improved 3D tetraculture system mimicking the cellular organisation at the alveolar barrier to study the potential toxic effects of particles on the lung. *Part Fibre Toxicol*. 2013, 10, pp. 31–31
- [27] Nurkiewicz T.R, Porter D.W, Hubbs AF et al. , Nanoparticle inhalation augments particle-dependent systemic microvascular dysfunction. *Part Fibre Toxicol*. 2008, 5(1)
- [28] Persoz C, Leleu C, Achard S et al. , Sequential air-liquid exposure of human respiratory cells to chemical and biological pollutants. *Toxicol Lett*. 2011, 207(1), pp. 53–59
- [29] Geiser M, Jeannet N, Fierz M, Burtscher H., Evaluating Adverse Effects of Inhaled Nanoparticles by Realistic In Vitro Technology. *Nanomaterials (Basel)*. 2017, 7(2)
- [30] Bitterle E, Karg E, Schroepel A et al. , Dose-controlled exposure of A549 epithelial cells at the air–liquid interface to airborne ultrafine carbonaceous particles. *Chemosphere*. 2006, 65(10), pp. 1784–1790
- [31] de Bruijne K, Ebersviller S, Sexton K.G et al. , Design and testing of Electrostatic Aerosol in Vitro Exposure System (EAVES): an alternative exposure system for particles. *Inhal Toxicol*. 2009, 21(2), pp. 91–101
- [32] Frijns E, Verstraelen S, Stoehr L.C et al. , A Novel Exposure System Termed NAVETTA for In Vitro Laminar Flow Electrodeposition of Nanoaerosol and Evaluation of Immune Effects in Human Lung Reporter Cells. *Environ Sci Technol*. 2017, 51(9), pp. 5259–5269
- [33] Mertes P, Praplan A.P, Kunzi L et al. , A compact and portable deposition chamber to study nanoparticles in air-exposed tissue. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*. 2013, 26(4), pp. 228–235
- [34] Zavala J, O'Brien B, Lichtveld K et al. , Assessment of biological responses of EpiAirway 3-D cell constructs versus A549 cells for determining toxicity of ambient air pollution. *Inhal Toxicol*. 2016, 28(6), pp. 251–259
- [35] Kim JS, Peters T.M, O'Shaughnessy P.T, Adamcakova-Dodd A, Thorne P.S, Validation of an in vitro exposure system for toxicity assessment of air-delivered nanomaterials. *Toxicology in Vitro*. 2013, 27(1), pp. 164–173
- [36] Bakand S, Winder C, Khalil C, Hayes A, An experimental in vitro model for dynamic direct exposure of human cells to airborne contaminants. *Toxicol Lett*.

2006, 165(1), pp. 1–10

- [37] Savi M, Kalberer M, Lang D et al. , A novel exposure system for the efficient and controlled deposition of aerosol particles onto cell cultures. *Environ Sci Technol*. 2008, 42(15), pp. 5667–5674
- [38] Aufderheide M, Scheffler S, Moehle N, Halter B, Hochrainer D, Analytical in vitro approach for studying cyto- and genotoxic effects of particulate airborne material. *Anal Bioanal Chem*. 2011, 401(10), pp. 3213–3220
- [39] Jeannet N, Fierz M, Kalberer M, Burtscher H, Geiser M, Nano aerosol chamber for in-vitro toxicity (NACIVT) studies. *Nanotoxicology*. 2015, 9(1), pp. 34–42
- [40] Lenz A.-G, Stoeger T, Cei D et al. , Efficient Bioactive Delivery of Aerosolized Drugs to Human Pulmonary Epithelial Cells Cultured in Air–Liquid Interface Conditions. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2014, 51(4), pp. 526–535
- [41] Lenz A.G, Karg E, Lentner B et al. , A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2009, 6(32)
- [42] Latvala S, Hedberg J, Möller L, Odnevall Wallinder I, Karlsson H.L, Elihn K, Optimization of an air–liquid interface exposure system for assessing toxicity of airborne nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*. 2016, 36(10), pp. 1294–1301
- [43] Osmond-McLeod M.J, Poland C.A, Murphy F et al. , Durability and inflammogenic impact of carbon nanotubes compared with asbestos fibres. *Part Fibre Toxicol*. 2011, 8, pp. 15
- [44] Vranic S, Garcia-Verdugo I, Darnis C et al. , Internalization of SiO<sub>2</sub> nanoparticles by alveolar macrophages and lung epithelial cells and its modulation by the lung surfactant substitute Curosurf®. *Environmental Science and Pollution Research*. 2013, 20(5), pp. 2761–2770
- [45] Pelfrène A, Cave M.R, Wragg J, Douay F, In Vitro Investigations of Human Bioaccessibility from Reference Materials Using Simulated Lung Fluids. *International journal of environmental research and public health*. 2017, 14(2), pp. 112
- [46] 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 نانوآشياء برای سنجش برون‌تن به‌منظور ارزیابی سمیت ذاتی نانوشی با استفاده از استاندارد ISO/TR 19337: 2016 تدوین شده‌است.

[۴۷] استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۴۸۳: سال ۱۳۹۶، اتمسفرهای محل کار- ذرات معلق (آئروسول) بسیار ریز، نانوذرات و نانوساختار- خصوصیات و ارزیابی مواجهه استنشاقی با

استفاده از استاندارد ISO/TR 27628: 2007 تدوین شده است.

- [48] Rotoli B.M, Bussolati O, Bianchi M.G et al. , Non-functionalized multi-walled carbon nanotubes alter the paracellular permeability of human airway epithelial cells. *Toxicol Lett.* 2008, 178(2), pp. 95–102
- [49] Banga A, Witzmann F.A, Petrache H.I, Blazer-Yost B.L Functional effects of nanoparticle exposure on Calu-3 airway epithelial cells. *Cellular physiology and biochemistry: International journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology.* 2012, 29(1-2), pp. 197–212
- [50] Gliga A.R, Skoglund S, Wallinder I.O, Fadeel B, Karlsson H.L, Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol.* 2014, 11, pp. 11
- [51] Nymark P, Catalán J, Suhonen S et al. , Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology.* 2013, 313(1), pp. 38–48
- [52] McCarthy J, Gong X, Nahirney D, Duszyk M, Radomski M, Polystyrene nanoparticles activate ion transport in human airway epithelial cells. *International Journal of Nanomedicine.* 2011, 6, pp. 1343–1356
- [53] Bhattacharya K, Andón F.T, El-Sayed R, Fadeel B, Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on pulmonary inflammation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013, 65(15), pp. 2087–2097
- [54] Bhowmick R, Gappa-Fahlenkamp H., Cells and Culture Systems Used to Model the Small Airway Epithelium. *Lung.* 2016, 194(3), pp. 419–428
- [55] Frohlich E., Comparison of conventional and advanced in vitro models in the toxicity testing of nanoparticles. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology.* 2018, pp. 1–17
- [56] Clippinger A.J, Allen D, Behrsing H et al. , Pathway-based predictive approaches for non-animal assessment of acute inhalation toxicity. *Toxicology in Vitro.* 2018, 52, pp. 131–145
- [57] Gruenert D.C, Finkbeiner W.E, Widdicombe J.H, Culture and transformation of human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology — Lung Cellular and Molecular Physiology.* 1995, 268(3), pp. L347–L360
- [58] Jeannet N, Fierz M, Schneider S et al. , Acute toxicity of silver and carbon nanoaerosols to normal and cystic fibrosis human bronchial epithelial cells. *Nanotoxicology.* 2016, 10(3), pp. 279–291
- [59] Hussain S, Thomassen L.C, Ferecatu I et al. , Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol.* 2010, 7, pp. 10
- [60] Herzog E, Byrne HJ, Casey A et al. , SWCNT suppress inflammatory mediator responses in human lung epithelium in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2009, 234(3), pp. 378-390

- [61] Schlinkert P, Casals E, Boyles M et al. , The oxidative potential of differently charged silver and gold nanoparticles on three human lung epithelial cell types. *Journal of Nanobiotechnology*. 2015, 13(1), pp. 1
- [62] Jing X, Park JH, Peters TM, Thorne P.S Toxicity of copper oxide nanoparticles in lung epithelial cells exposed at the air-liquid interface compared with in vivo assessment. *Toxicology in vitro: An international journal published in association with BIBRA*. 2015, 29(3), pp. 502-511
- [63] Ghosh M, Öner D, Duca R.-C et al. , Cyto-genotoxic and DNA methylation changes induced by different crystal phases of TiO<sub>2</sub>-np in bronchial epithelial (16-HBE) cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2017, 796, pp. 1–12
- [64] Val S, Hussain S, Boland S, Hamel R, Baeza-Squiban A, Marano F, Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: Need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts. *Inhal Toxicol*. 2009, 21, pp. 115–122
- [65] Forbes B, Shah A, Martin G.P, Lansley A.B, The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o– as a model system of the airways for studying drug transport. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003, 257(1), pp. 161–167
- [66] Siegrist K.J, Reynolds S.H, Kashon M.L et al. , Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes at occupationally relevant doses. *Part Fibre Toxicol*. 2014, 11(1), pp. 6
- [67] Ng C.T, Li J.J, Gurung R.L, Hande M.P, Ong C.N, Bay B.H, Toxicological profile of small airway epithelial cells exposed to gold nanoparticles. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013, pp. 238
- [68] Sisler J.D, Pirela S.V, Shaffer J et al. Toxicological Assessment of CoO and La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Metal Oxide Nanoparticles in Human Small Airway Epithelial Cells. *Toxicological sciences: An official journal of the Society of Toxicology*. 2016, 150(2), pp. 418–428
- [69] Mihalchik A.L, Ding W, Porter D.W et al. , Effects of nitrogen-doped multi-walled carbon nanotubes compared to pristine multi-walled carbon nanotubes on human small airway epithelial cells. *Toxicology*. 2015, 333, pp. 25–36
- [70] Lu X, Miousse I.R, Pirela S.V, Melnyk S, Koturbash I, Demokritou P, Short-term exposure to engineered nanomaterials affects cellular epigenome. *Nanotoxicology*. 2016, 10(2), pp. 140–150
- [71] Luanpitpong S, Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y, Induction of stem-like cells with malignant properties by chronic exposure of human lung epithelial cells to single-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol*. 2014, 11(1), pp. 22
- [72] Chatterjee N, Yang J, Choi J, Differential genotoxic and epigenotoxic effects of graphene family nanomaterials (GFNs) in human bronchial epithelial cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2016, 798–799, pp. 1–10

- [73] Xia T, Hamilton R.F, Bonner J.C et al. , Interlaboratory evaluation of in vitro cytotoxicity and inflammatory responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium. *Environmental health perspectives*. 2013, 121(6), pp. 683–690
- [74] Kumbıçak Ü, Çavaş T, Çinkılıç N, Kumbıçak Z, Vatan Ö, Yılmaz D., Evaluation of in vitro cytotoxicity and genotoxicity of copper–zinc alloy nanoparticles in human lung epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2014, 73, pp. 105–112
- [75] Duan W.-X, He M.-D, Mao L et al. , NiO nanoparticles induce apoptosis through repressing SIRT1 in human bronchial epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2015, 286(2), pp. 80–91
- [76] George S, Pokhrel S, Xia T et al. , Use of a rapid cytotoxicity screening approach to engineer a safer zinc oxide nanoparticle through iron doping. *ACS Nano*. 2010, 4(1), pp. 15–29
- [77] Capasso L, Camatini M, Gualtieri M, Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. *Toxicol Lett*. 2014, 226(1), pp. 28–34
- [78] Huang C.-C, Aronstam R.S, Chen D.-R, Huang Y.-W, Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicology in Vitro*. 2010, 24(1), pp. 45–55
- [79] Veranth J.M, Kaser E.G, Veranth M.M, Koch M, Yost G.S, Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Part Fibre Toxicol*. 2007, 4, pp. 2
- [80] Park E.-J, Yi J, Chung K.-H, Ryu D.-Y, Choi J, Park K, Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett*. 2008, 180(3), pp. 222–229
- [81] Huang C.C, Aronstam R.S, Chen D.R, Huang Y.W Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicology in vitro: An international journal published in association with BIBRA*. 2010, 24(1), pp. 45–55
- [82] Eom H.-J, Choi J, Oxidative stress of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicology in Vitro*. 2009, 23(7), pp. 1326–1332
- [83] Eom H.-J, Choi J SiO(2) Nanoparticles Induced Cytotoxicity by Oxidative Stress in Human Bronchial Epithelial Cell, Beas-2B. *Environmental Health and Toxicology*. 2011, 26, pp. e2011013
- [84] Heng B.C, Zhao X, Xiong S, Woei Ng K, Yin-Chiang Boey F, Say-Chye Loo J. Toxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) is accentuated by oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*. 2010, 48(6), pp. 1762–1766
- [85] Gurr J.-R, Wang A.S, Chen C.-H, Jan K.-Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial

- epithelial cells. *Toxicology*. 2005, 213(1), pp. 66–73
- [86] Kim H.R, Kim M.J, Lee S.Y, Oh S.M, Chung K.H. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2011, 726(2), pp. 129–135
- [87] Vales G, Rubio L, Marcos R. Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells. *Nanotoxicology*. 2015, 9(5), pp. 568–578
- [88] Polimeni M, Gulino G, R. Gazzano E., et al. Multi-walled carbon nanotubes directly induce epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells via the TGF-beta-mediated Akt/GSK-3beta/SNAIL-1 signalling pathway. *Part Fibre Toxicol*. 2016, 13(1), pp. 27
- [89] Papazian D, Würtzen P, A. Hansen S, W.K. Polarized Airway Epithelial Models for Immunological Co-Culture Studies. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2016, 170(1), pp. 1–21
- [90] Kreda S, M. Okada S, F. van Heusden C.A., et al. Coordinated release of nucleotides and mucin from human airway epithelial Calu-3 cells. *J Physiol*. 2007, 584(Pt 1), pp. 245–259
- [91] George I, Naudin G, Boland S., et al. Metallic oxide nanoparticle translocation across the human bronchial epithelial barrier. *Nanoscale*. 2015, 7(10), pp. 4529–4544
- [92] George I, Vranic S, Boland S, Courtois A., Baeza-Squiban A. Development of an in vitro model of human bronchial epithelial barrier to study nanoparticle translocation. *Toxicology in Vitro*. 2015, 29(1), pp. 51–58
- [93] Derk R, Davidson D, C. Manke A, Stueckle T, A. Rojanasakul Y, Wang L. Potential in vitro model for testing the effect of exposure to nanoparticles on the lung alveolar epithelial barrier. *Sensing and Bio-Sensing Research*. 2015, 3, pp. 38–45
- [94] Dekali S, Gamez C, Kortulewski T, Blazy K, Rat P, Lacroix G. Assessment of an in vitro model of pulmonary barrier to study the translocation of nanoparticles. *Toxicology Reports*. 2014, 1, pp. 157–171
- [95] Farcas L, Torres Andon F, Di Cristo L., et al. Comprehensive In Vitro Toxicity Testing of a Panel of Representative Oxide Nanomaterials: First Steps towards an Intelligent Testing Strategy. *PLoS one*. 2015, 10(5), pp. e0127174
- [96] Schulze C, Schaefer Ulrich F, Voetz M, Wohlleben W, Venzago C, Lehr C.-M. Transport of Metal Oxide Nanoparticles Across Calu-3 Cell Monolayers Modelling the Air-Blood Barrier. In. *EURO-NanoTox-Letters*. Vol 32011:1
- [97] Banga A., Witzmann F A., Petrache HI, Blazer-Yost BL. *Functional Effects of Nanoparticle Exposure on Calu-3 Airway Epithelial Cells*. Vol 292012
- [98] Hurley B.P, Williams N.L, McCormick B.A, Involvement of phospholipase A2 in Pseudomonas aeruginosa-mediated PMN transepithelial migration. *American Journal of Physiology — Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2006, 290(4),

pp. L703–L709

- [99] Garcia-Canton C, Minet E, Anadon A, Meredith C, Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: Lung cell system BEAS-2B as a working example. *Toxicology in Vitro*. 2013, 27(6), pp. 1719–1727
- [100] Alinovi R, Goldoni M, Pinelli S et al. , Titanium dioxide aggregating nanoparticles induce autophagy and under-expression of microRNA 21 and 30a in A549 cell line: A comparative study with cobalt(II, III) oxide nanoparticles. *Toxicology in Vitro*. 2017, 42, pp. 76–85
- [101] Kermanizadeh A, Gosens I, MacCalman L et al. , A Multilaboratory Toxicological Assessment of a Panel of 10 Engineered Nanomaterials to Human Health—ENPRA Project—The Highlights Limitations, and Current and Future Challenges. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2016, 19(1), pp. 1–28
- [102] Wang J, Jiang C, Alattar M et al. , Oxidative injury induced by cadmium sulfide nanoparticles in A549 cells and rat lungs. *Inhal Toxicol*. 2015, 27(12), pp. 649–658
- [103] Miyayama T, Matsuoka M, Involvement of lysosomal dysfunction in silver nanoparticle-induced cellular damage in A549 human lung alveolar epithelial cells. *J Occup Med Toxicol*. 2016, 11, pp. 1
- [104] Visalli G, Bertuccio MP, Iannazzo D, Piperno A, Pistone A, Di Pietro A, Toxicological assessment of multi-walled carbon nanotubes on A549 human lung epithelial cells. *Toxicology in Vitro*. 2015, 29(2), pp. 352–362
- [105] Kermanizadeh A, Jantzen K, Ward M.B et al. , Nanomaterial-induced cell death in pulmonary and hepatic cells following exposure to three different metallic materials: The role of autophagy and apoptosis. *Nanotoxicology*. 2017, 11(2), pp. 184–200
- [106] Hwang S.-H, Thielbeer F, Jeong J et al. , Dual contribution of surface charge and protein-binding affinity to the cytotoxicity of polystyrene nanoparticles in nonphagocytic A549 cells and phagocytic THP-1 cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2016, 79(20), pp. 925–937
- [107] Brown D.M, Varet J, Johnston H, Chrystie A, Stone V, Silica nanoparticles and biological dispersants: genotoxic effects on A549 lung epithelial cells. *Journal of Nanoparticle Research*. 2015, 17(10), pp. 410
- [108] Kumarathanan P, Breznan D, Das D et al. , Cytotoxicity of carbon nanotube variants: A comparative in vitro exposure study with A549 epithelial and J774 macrophage cells. *Nanotoxicology*. 2015, 9(2), pp. 148–161
- [109] Che B, Luo Q, Zhai B et al. Cytotoxicity and genotoxicity of nanosilver in stable GADD45 $\alpha$  promoter-driven luciferase reporter HepG2 and A549 cells. *Environmental Toxicology*. n/a-n/a
- [110] Shumbula P, Harris R, Nyembe S, Keter F.K, Sikhwivhilu L, Tshikhudo R, Cytotoxicity Effects of Citrate, Glucose and Cetyltrimethyl Ammonium Chloride-capped Silver Nanoparticles in Lung Epithelial Carcinoma Cells (A549). *Materials*

*Today: Proceedings*. 2015, 2(7), pp. 4118–4124

- [111] Wang L, Pal A.K, Isaacs JA, Bello D, Carrier R.L, Nanomaterial induction of oxidative stress in lung epithelial cells and macrophages. *Journal of Nanoparticle Research*. 2014, 16(9), pp. 2591
- [112] Biola-Clier M, Beal D, Caillat S et al. , Comparison of the DNA damage response in BEAS-2B and A549 cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Mutagenesis*. 2017, 32(1), pp. 161–172
- [113] Bachler G, Losert S, Umehara Y et al. , Translocation of gold nanoparticles across the lung epithelial tissue barrier: Combining in vitro and in silico methods to substitute in vivo experiments. *Part Fibre Toxicol*. 2015, 12(1), pp. 18
- [114] Delaval M, Wohlleben W, Landsiedel R, Baeza-Squiban A, Boland S, Assessment of the oxidative potential of nanoparticles by the cytochrome c assay: assay improvement and development of a high-throughput method to predict the toxicity of nanoparticles. *Archives of toxicology*. 2017, 91(1), pp. 163–177
- [115] Gerloff K, Landesmann B, Worth A, Munn S, Palosaari T, Whelan M., The Adverse Outcome Pathway approach in nanotoxicology. *Computational Toxicology*. 2017, 1, pp. 3–11
- [116] Kuehn A, Kletting S, de Souza Carvalho-Wodarz C et al. , Human alveolar epithelial cells expressing tight junctions to model the air-blood barrier. *Altex*. 2016, 33(3), pp. 251–260
- [117] Kiliç G, Costa P.M, Fadeel B, Cytotoxicity screening and cytokine profiling of nineteen nanomaterials enables hazard ranking and grouping based on inflammogenic potential AU — Bhattacharya, Kunal. *Nanotoxicology*. 2017, 11(6), pp. 809–826
- [118] Snyder-Talkington B.N, Schwegler-Berry D, Castranova V, Qian Y, Guo N.L, Multi-walled carbon nanotubes induce human microvascular endothelial cellular effects in an alveolar-capillary co-culture with small airway epithelial cells. *Part Fibre Toxicol*. 2013, 10, pp. 35
- [119] Sisler J.D, Pirela S.V, Friend S et al. , Small airway epithelial cells exposure to printer-emitted engineered nanoparticles induces cellular effects on human microvascular endothelial cells in an alveolar-capillary co-culture model. *Nanotoxicology*. 2015, 9(6), pp. 769–779
- [120] Snyder-Talkington B.N, Dong C, Zhao X et al. , Multi-walled carbon nanotube-induced gene expression in vitro: concordance with in vivo studies. *Toxicology*. 2015, 328, pp. 66–74
- [121] Herzog F, Loza K, Balog S et al. , Mimicking exposures to acute and lifetime concentrations of inhaled silver nanoparticles by two different *in vitro* approaches. *Beilstein journal of nanotechnology*. 2014, 5, pp. 1357–1370
- [122] Herzog F, Clift M.J, Piccapietra F et al. , Exposure of silver-nanoparticles and silver-ions to lung cells in vitro at the air-liquid interface. *Part Fibre Toxicol*.



2013, 10(1), pp. 11

- [123] Brandenberger C, Rothen-Rutishauser B, Muehlfeld C et al. , Effects and uptake of gold nanoparticles deposited at the air-liquid interface of a human epithelial airway model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010, 242(1), pp. 56–65
- [124] Chortarea S, Clift M.J.D, Vanhecke D et al. , Repeated exposure to carbon nanotube-based aerosols does not affect the functional properties of a 3D human epithelial airway model. *Nanotoxicology*. 2015, 0(0), pp. 1–11
- [125] Rothen-Rutishauser B, Mueller L, Blank F, Brandenberger C, Muehlfeld C, Gehr P., A newly developed in vitro model of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of nanoparticles. *Altex*. 2008, 25(3), pp. 191–196
- [126] Rothen-Rutishauser B.M, Kiama S.G, Gehr P, A three-dimensional cellular model of the human respiratory tract to study the interaction with particles. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2005, 32(4), pp. 281–289
- [127] Smulders S, Luyts K, Brabants G et al. , Toxicity of nanoparticles embedded in paints compared to pristine nanoparticles, in vitro study. *Toxicol Lett*. 2015, 232(2), pp. 333–339
- [128] Clift M.J, Endes C, Vanhecke D et al. A comparative study of different in vitro lung cell culture systems to assess the most beneficial tool for screening the potential adverse effects of carbon nanotubes. *Toxicological sciences: An official journal of the Society of Toxicology*. 2014, 137(1), pp. 55–64
- [129] Napierska D, Thomassen L.C.J, Vanaudenaerde B et al. , Cytokine production by co-cultures exposed to monodisperse amorphous silica nanoparticles: The role of size and surface area. *Toxicol Lett*. 2012, 211(2), pp. 98–104
- [130] Cao Y, Roursgaard M, Jacobsen N.R, Møller P, Loft S, Monocyte adhesion induced by multi-walled carbon nanotubes and palmitic acid in endothelial cells and alveolar–endothelial co-cultures. *Nanotoxicology*. 2016, 10(2), pp. 235–244
- [131] Farcas L.R, Uboldi C, Mehn D et al. , Mechanisms of toxicity induced by SiO<sub>2</sub> nanoparticles of in vitro human alveolar barrier: effects on cytokine production, oxidative stress induction, surfactant proteins A mRNA expression and nanoparticles uptake. *Nanotoxicology*. 2013, 7(6), pp. 1095–1110
- [132] Huh D, Matthews B.D, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin H.Y, Ingber D.E, Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*. 2010, 328(5986), pp. 1662–1668
- [133] Baxter A, Thain S, Banerjee A et al. Targeted omics analyses, and metabolic enzyme activity assays demonstrate maintenance of key mucociliary characteristics in long term cultures of reconstituted human airway epithelia. *Toxicology in vitro: An international journal published in association with BIBRA*. 2015, 29(5), pp. 864–875
- [134] Iskandar A.R, Mathis C, Schlage W.K et al. , A systems toxicology approach for comparative assessment: Biological impact of an aerosol from a candidate modified-risk tobacco product and cigarette smoke on human organotypic

bronchial epithelial cultures. *Toxicology in Vitro*. 2017, 39, pp. 29–51

- [135] Banerjee A, Haswell L.E, Baxter A et al. , Differential Gene Expression Using RNA Sequencing Profiling in a Reconstituted Airway Epithelium Exposed to Conventional Cigarette Smoke or Electronic Cigarette Aerosols. *Applied In Vitro Toxicology*. 2017, 3(1), pp. 84–98
- [136] Mathis C, Poussin C, Weisensee D et al. , Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to cigarette smoke at the air-liquid interface resemble bronchial epithelium from human smokers. *American Journal of Physiology — Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2013, 304(7), pp. L489–L503
- [137] Mathis C, Gebel S, Poussin C et al. , A Systems Biology Approach Reveals the Dose- and Time-Dependent Effect of Primary Human Airway Epithelium Tissue Culture After Exposure to Cigarette Smoke In Vitro. *Bioinformatics and Biology Insights*. 2015, 9, pp. 19–35
- [138] Neilson L, Mankus C, Thorne D, Jackson G, DeBay J, Meredith C, Development of an in vitro cytotoxicity model for aerosol exposure using 3D reconstructed human airway tissue, application for assessment of e-cigarette aerosol. *Toxicology in Vitro*. 2015, 29(7), pp. 1952–1962
- [139] Balharry D, Sexton K, BeruBe K.A. , An in vitro approach to assess the toxicity of inhaled tobacco smoke components: nicotine, cadmium, formaldehyde and urethane. *Toxicology*. 2008, 244(1), pp. 66–76
- [140] Sexton K, Balharry D, Brennan P, McLaren J, Brewis I.A, BeruBe K.A. Proteomic profiling of human respiratory epithelia by iTRAQ reveals biomarkers of exposure and harm by tobacco smoke components. *Biomarkers: Biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2011, 16(7), pp. 567–576
- [141] Sexton K, Balharry D, BeruBe K.A., Genomic biomarkers of pulmonary exposure to tobacco smoke components. *Pharmacogenetics and genomics*. 2008, 18(10), pp. 853–860
- [142] Mathis C, Poussin C, Weisensee D et al. , Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to cigarette smoke at the air-liquid interface resemble bronchial epithelium from human smokers. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2013, 304(7), pp. L489–503
- [143] Willoughby Sr. J.A. , Predicting Respiratory Toxicity Using a Human 3D Airway (EpiAirway™) Model Combined with Multiple Parametric Analysis. *Applied In Vitro Toxicology*. 2015, 1(1), pp. 55–65
- [144] Hayden P.J, Jackson G.RJr, Hunter A et al. , Development of an {in vitro} inhalation toxicity test using the EpiAirway model for improved protection of human health. *Toxicol Lett*. 2016, 258, Supplement: S56
- [145] B.R. FWRKBMB. Nrf2 response to whole smoke in three dimensional (3D) airway cultures. *TSRC, Tob Sci Res Conf*. 2015, 69, abstr. 24
- [146] Gomperts B.N, Kim L.J, Flaherty S.A, Hackett B.P, IL-13 Regulates Cilia Loss and foxj1 Expression in Human Airway Epithelium. *American journal of*

*respiratory cell and molecular biology*. 2007, 37(3), pp. 339–346

- [147] Sedelnikova O.A, Nakamura A, Kovalchuk O et al. , DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. *Cancer research*. 2007, 67(9), pp. 4295–4302
- [148] Sharma M, Schoop R, Hudson J.B, The efficacy of Echinacea in a 3-D tissue model of human airway epithelium. *Phytotherapy research: PTR*. 2010, 24(6), pp. 900–904
- [149] Mitchell D, Paniker L, Sanchez G et al. , Molecular response of nasal mucosa to therapeutic exposure to broad-band ultraviolet radiation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010, 14(1-2), pp. 313–322
- [150] Moscona A, Porotto M, Palmer S et al. , A recombinant sialidase fusion protein effectively inhibits human parainfluenza viral infection in vitro and in vivo. *J Infect Dis*. 2010, 202(2), pp. 234–241
- [151] Seagrave J, Weber W.M, Grotendorst G.R, Sulfur mustard vapor effects on differentiated human lung cells. *Inhal Toxicol*. 2010, 22(11), pp. 896–902
- [152] Frieke Kuper C, Gröllers-Mulderij M, Maarschalkerweerd T et al. , Toxicity assessment of aggregated/agglomerated cerium oxide nanoparticles in an in vitro 3D airway model: The influence of mucociliary clearance. *Toxicology in Vitro*. 2015, 29(2), pp. 389–397
- [153] Stucki A.O, Stucki J.D, Hall S.R et al. , A lung-on-a-chip array with an integrated bio-inspired respiration mechanism. *Lab on a chip*. 2015, 15(5), pp. 1302–1310
- [154] Huh D, Matthews B.D, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin H.Y, Ingber D.E, Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science*. 2010, 328(5986), pp. 1662
- [155] Alsafadi H.N, Staab-Weijnitz C.A, Lehmann M et al. , An ex vivo model to induce early fibrosis-like changes in human precision-cut lung slices. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2017, 312(6), pp. L896–L902
- [156] Lauenstein L, Switalla S, Prenzler F et al. , Assessment of immunotoxicity induced by chemicals in human precision-cut lung slices (PCLS). *Toxicology in Vitro*. 2014, 28(4), pp. 588–599
- [157] Neuhaus V, Schwarz K, Klee A., et al. Functional testing of an inhalable nanoparticle based influenza vaccine using a human precision cut lung slice technique. *PLoS one*. 2013, 8(8), pp. e71728
- [158] Hartung T, Gstraunthaler G, Coecke S, Lewis D, Blanck O, Balls M. [Good cell culture practice (GCCP) — An initiative for standardization and quality control of in vitro studies. The establishment of an ECVAM Task Force on GCCP]. *Altex*. 2001, 18(1), pp. 75–78
- [159] Coecke S, Balls M, Bowe G et al. , Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Alternatives to laboratory animals: ATLA*. 2005, 33(3), pp. 261–287

- [160] Palecanda A, Kobzik L, Receptors for unopsonized particles: the role of alveolar macrophage scavenger receptors. *Current molecular medicine*. 2001, 1(5), pp. 589–595
- [161] Mishra A, Stueckle T.A, Mercer R.R et al. , Identification of TGF-beta receptor-1 as a key regulator of carbon nanotube-induced fibrogenesis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2015, 309(8), pp. L821–833
- [162] OECD. ENV/JM/MONO(2012)40. Guidance on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials. In: 2012
- [163] Braakhuis H.M, Cassee F.R, Fokkens P.H et al. , Identification of the appropriate dose metric for pulmonary inflammation of silver nanoparticles in an inhalation toxicity study. *Nanotoxicology*. 2016, 10(1), pp. 63–73
- [164] Braakhuis H.M, Gosens I, Krystek P et al. , Particle size dependent deposition and pulmonary inflammation after short-term inhalation of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2014, 11, pp. 49
- [165] Delmaar C.J, Peijnenburg W.J, Oomen A.G et al. A practical approach to determine dose metrics for nanomaterials. *Environmental toxicology and chemistry/SETAC*. 2015, 34(5), pp. 1015–1022
- [166] Jeong J, Lee S, Kim S.H et al. , Evaluation of the dose metric for acute lung inflammogenicity of fast-dissolving metal oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2016, 10(10), pp. 1448–1457
- [167] Wohlleben W, Mielke J, Bianchin A et al. , Reliable nanomaterial classification of powders using the volume-specific surface area method. *J Nanopart Res*. 2017, 19(2), pp. 61
- [168] Noel A, Truchon G, Cloutier Y, Charbonneau M, Maghni K, Tardif R, Mass or total surface area with aerosol size distribution as exposure metrics for inflammatory, cytotoxic and oxidative lung responses in rats exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology and industrial health*. 2017, 33(4), pp. 351–364
- [169] DeLoid G.M, Cohen J.M, Pyrgiotakis G, Demokritou P, Preparation, characterization, and in vitro dosimetry of dispersed, engineered nanomaterials. *Nature protocols*. 2017, 12(2), pp. 355–371
- [170] Thomas D.G, Smith J.N, Thrall B.D et al. , ISD3: a particokinetic model for predicting the combined effects of particle sedimentation, diffusion and dissolution on cellular dosimetry for in vitro systems. *Part Fibre Toxicol*. 2018, 15(6)
- [171] Herzog F, Loza K, Balog S et al. , Mimicking exposures to acute and lifetime concentrations of inhaled silver nanoparticles by two different in vitro approaches. *Beilstein journal of nanotechnology*. 2014, 5, pp. 1357–1370
- [172] DeLoid G.M, Cohen J.M, Pyrgiotakis G et al. , Advanced computational modeling for in vitro nanomaterial dosimetry. *Part Fibre Toxicol*. 2015, 12(1), pp. 32
- [173] OECD. ENV/JM/MONO(2014)19. New guidance document on an integrated approach on testing and assessment (IATA) for skin corrosion and irritation. In:

2014

- [174] McMullen P.D, Andersen M.E, Cholewa B et al. , Evaluating opportunities for advancing the use of alternative methods in risk assessment through the development of fit-for-purpose in vitro assays. *Toxicology in Vitro*. 2018, 48, pp. 310–317
- [175] OECD. *Publications in the Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials*. (online). Available from: [www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm](http://www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm)
- [176] ISO. *ISO/TC 229, Nanotechnologies*. (online). Available from: <https://www.iso.org/committee/381983/x/catalogue>
- [177] *Collaborative Adverse Outcome Pathway Wiki (AOP-Wiki)*. (online). Available from: <https://aopwiki.org/aops>
- [۱۷۸] استاندارد ملی ایران شماره ۱۳۸۳۰: سال ۱۳۸۹، تعیین توزیع اندازه ذره- تحلیل قابلیت حرکت الکتریکی تفاضلی برای ذرات ابروسل با استفاده از استاندارد ISO/TR 15900: 2009 تدوین شده است.
- [۱۷۹] استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو- واژه‌نامه - قسمت ۱: اصطلاحات اصلی
- [۱۸۰] استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو- واژه‌نامه- قسمت ۲: نانواشیاء
- [۱۸۱] استاندارد ملی ایران شماره ۴-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۳، فناوری نانو- واژه‌نامه- قسمت ۴: مواد نانساختاریافته
- [182] ISO/TS 80004-6: 2013, Nanotechnologies — Vocabulary — Part 6: Nano-object characterization
- یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۶-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۶، فناوری نانو- واژه‌نامه- قسمت ۶: مشخصه‌یابی نانوشیء با استفاده از استاندارد ISO/TR 80004-6: 2013 تدوین شده است.