INSO
7216-22
1st Edition
2021

Identical with
ISO/TR 10993-22:
2017

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

استاندارد ملی ایران
۷۲۱۶-۲۲
چاپ اول
۱۴۰۰

فناوری نانو- ارزشیابی زیست‌شناختی افزاره‌های پزشکی- قسمت ۲۲: راهنمای نانومواد

Nanotechnology — Biological evaluation of medical devices — Part 22: Guidance on nanomaterials

ICS: 07.100; 11.100.20

استاندارد ملی ایران شماره ۲۲-۷۲۱۶ (چاپ اول): سال ۱۴۰۰

سازمان ملی استاندارد ایران

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

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.gov.ir

وبگاه: http://www.isiri.gov.ir

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No. 2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

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

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

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

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.gov.ir

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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ تعیین، تدوین، به‌روزرسانی و نشر استانداردهای ملی را به‌عهده دارد.

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

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

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)[1]، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات ساخته ی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سامانه‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمونگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) افزاره‌های سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزشیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج افزاره‌های بین‌المللی یکاها، واسنجی افزاره‌های 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- ارزشیابی زیست‌شناختی افزاره‌های پزشکی- قسمت ۲۲: راهنمای نانومواد»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
قاضی خوانساری، محمود (دکتری تخصصی توکسیکولوژی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه علوم پزشکی تهران- دانشکده پزشکی
دبیر:	
کاکنج، مریم (دکتری تخصصی توکسیکولوژی)	عضو هیئت علمی- سازمان غذا و دارو- آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو و تجهیزات پزشکی
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اسلامی‌پور، الهه (کارشناسی ارشد زیست‌شناسی)	کارشناس- کارگروه استاندارد و ایمنی- ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
بنکدار، شاهین (دکتری تخصصی مهندسی پزشکی، بیومواد)	عضو هیئت علمی- انستیتو پاستور ایران- بخش بانک سلولی
سیفی، مهوش (کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)	کارشناس استاندارد- نایب رئیس کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISIRI/TC 229
سهرابی، ابوذر (دکتری تخصصی فناوری نانو)	مدیر عامل- شرکت راصد توسعه فناوری‌های پیشرفته
جعفری نژاد، سمیه (دکتری تخصصی نانو پزشکی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه علوم پزشکی ایران- مرکز تحقیقات ریزفناوری
کوهی، محمد کاظم (دکتری تخصصی توکسیکولوژی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه تهران- دانشکده دامپزشکی
منهاج‌نیا، رابعه (دکتری تخصصی توکسیکولوژی)	مدیرعامل- شرکت راهبران توسعهٔ سبز

ویراستار:

سیفی، مهوش
(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

سمت و/یا محل اشتغال:

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

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

پیش‌گفتار ط
مقدمه ی
۱ هدف و دامنهٔ کاربرد ۱
۲ مراجع الزامی ۲
۳ اصطلاحات و تعاریف ۳
۴ اصول کلی ۷
۴-۱ ملاحظات کلی ۷
۴-۲ ارزشیابی زیست‌شناختی نانومواد ۸
۴-۳ رده‌بندی نانومواد ۹
۴-۴ اکی‌والان نانوماده ۱۱
۵ مشخصه‌یابی نانومواد ۱۲
۵-۱ ملاحظات کلی ۱۲
۵-۲ پارامترها و روش‌های مشخصه‌یابی ۱۴
۵-۳ استفاده از مواد مرجع ۱۹
۶ آماده‌سازی نمونه ۲۰
۶-۱ ملاحظات کلی ۲۰
۶-۲ ملاحظات اختصاصی مواد ۲۰
۶-۳ ملاحظات اختصاصی نانواشیاء ۲۱
۶-۴ شناسایی، انبارش و پایداری نانومواد استوک ۲۳
۶-۵ توصیف ترکیب‌بندی شیمیایی پراکنش‌های استوک و دُزی ۲۴
۶-۶ مشخصه‌یابی پراکنش‌های استوک ۲۴
۶-۷ مشخصه‌یابی محلول‌های دُزی آماده‌شده از پراکنش‌های استوک ۲۵
۶-۸ دُزسنجی ۲۶
۶-۹ ملاحظات بیشتر ۲۶
۶-۹-۱ اندوتوکسین ۲۶
۶-۹-۲ سترون کردن ۲۸

عنوان **صفحه**

۷ رهایش نانواشیاء از افزاره‌های پزشکی ۳۰
۷-۱ ملاحظات کلی ۳۰
۷-۲ محصولات حاصل از تخریب ۳۰
۷-۳ رهایش نانواشیاء در اثر سایش ۳۰
۷-۴ فرایندهای درجا ۳۱
۸ توکسیکوکینتیک ۳۱
۸-۱ ملاحظات کلی ۳۱
۸-۲ عوامل تأثیرگذار بر توکسیکوکینتیک ۳۲
۸-۲-۱ خواص فیزیکوشیمیایی ۳۲
۸-۲-۲ جذب سطحی زیست‌مولکولی ۳۳
۸-۲-۳ مسیر مواجهه ۳۴
۸-۲-۴ دُز ۳۵
۸-۲-۵ گونه‌ها و جنس ۳۵
۸-۲-۶ روش‌های اندازه‌گیری ۳۶
۹ ارزشیابی توکسیکولوژی ۳۷
۹-۱ ملاحظات کلی ۳۷
۹-۲ آزمون سمیت سلولی در شرایط برون‌تن ۳۸
۹-۲-۱ ملاحظات کلی ۳۸
۹-۲-۲ ملاحظات تداخل نانوماده با سنجش‌ها ۴۰
۹-۲-۳ ملاحظات ارتباط دُز و دُزسنجی ۴۰
۹-۲-۴ ملاحظات کینتیک‌های نانوشیء ۴۰
۹-۳ سمیت ژنی، سرطان‌زایی و سمیت تولیدمثلی ۴۱
۹-۳-۱ ملاحظات کلی ۴۱
۹-۳-۲ آزمون‌های سمیت ژنی در شرایط برون‌تن ۴۳
۹-۳-۳ آزمون‌های سمیت ژنی در شرایط درون‌تن ۴۴
۹-۳-۴ سرطان‌زایی ۴۶
۹-۳-۵ سمیت تولیدمثلی ۴۶
۹-۴ سمیت ایمنی، تحریک‌زایی و حساسیت‌زایی ۴۸
۹-۴-۱ ملاحظات کلی ۴۸

عنوان **صفحه**

۹-۴-۲ سمیت ایمنی ۴۸
۹-۴-۳ حساسیت‌زایی ۴۹
۹-۴-۴ تحریک‌زایی ۵۱
۹-۵ خون‌سازگاری ۵۲
۹-۵-۱ ملاحظات کلی ۵۲
۹-۵-۲ فعال‌شدن سامانهٔ کمپلمان ۵۳
۹-۵-۳ ملاحظات ویژهٔ آزمون خون‌سازگاری ۵۴
۹-۶ سمیت سیستمیک ۵۵
۹-۷ تب‌زایی ۵۶
۹-۸ کاشت ۵۷
۱۰ نحوهٔ ارائهٔ مشخصه‌یابی و نتایج آزمون ۵۷
۱۱ ارزیابی ریسک ۵۸
۱۱-۱ ملاحظات کلی ۵۸
۱۱-۲ ارزیابی مواجهه ۶۲
۱۱-۳ شناسایی مخاطره زیست شناختی ۶۳
۱۱-۴ تخمین ریسک ۶۳
۱۱-۵ ارزشیابی ریسک ۶۴
۱۲ گزارش ارزشیابی زیست‌شناختی ۶۴
کتاب‌نامه ۶۵

پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو- ارزشیابی زیست‌شناختی افزاره‌های پزشکی- قسمت ۲۲: راهنمای نانومواد» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تهیه و تدوین شده، در یکصد و یکمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد فناوری نانو، مورخ ۱۴۰۰/۰۶/۱۴ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، مصوب دی ماه ۱۳۹۶، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم وخدمات، 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 تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می‌باشد و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی مزبور است:

ISO/TR 10993-22: 2017, Biological evaluation of medical devices- Part 22: Guidance on nanomaterials

مقدمه

این استاندارد به‌عنوان راهنمایی برای ارزشیابی[1] زیست‌شناختی افزاره‌های پزشکی که حاوی نانومواد هستند، نانومواد از آنها ایجاد و یا از نانومواد تشکیل می‌شوند، ارائه می‌شود. برای واژهٔ نانوماده تعاریف متعددی توسعه یافته‌است. در مورد اهدافی که در این استاندارد دنبال می‌شود، از تعریف استاندارد ملی ایران استفاده خواهد شد: یک ماده وقتی نانوماده درنظر گرفته می‌شود که اندازهٔ ابعاد خارجی و داخلی در مقیاس نانو داشته باشد، یعنی، از اندازه یا ساختارهایی با طول تقریباً بین ۱ نانومتر و ۱۰۰ نانومتر (استاندارد ملی ایران- ایزو ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵) تشکیل می‌شود. توصیه می‌شود برای اهداف نظارتی، مقررات ملی یا منطقه‌ای خاص که در مورد این تعاریف کاربرد دارند، بررسی شوند. باید توجه داشت که سایر مشخصات (برای مثال، خواص ویژهٔ نانو) نیز می‌توانند در چنین تعاریفی گنجانده شوند.
همچنین ساختارهای ریخت‌شناسی ایجادشده روی سطح افزارهٔ پزشکی می‌توانند اندازه‌هایی در مقیاس نانو داشته باشند. بنابراین لازم است اثرات بالقوهٔ چنین ساختارهایی بر پاسخ زیست‌شناختی افزاره درنظر گرفته شوند.

نانواشیاء با دامنهٔ طولی ۱ نانومتر تا ۱۰۰ نانومتر می‌توانند در طول چرخهٔ عمر افزارهٔ پزشکی ایجاد شوند، بنابراین ارزشیابی اثرات سوء بالقوهٔ ناشی از ایجاد نانواشیاء از طریق آماده‌سازی، مصرف، سایش[2] یا تخریب[3] افزاره‌های پزشکی باید موردتوجه قرارگیرند. این موضوع در مورد افزاره‌های پزشکی که با استفاده از نانومواد ساخته شده‌اند و افزاره‌های پزشکی که با استفاده از نانومواد ساخته نمی‌شوند اما در اثر سایش و یا تخریب، پتانسیل تولید ذرات نانومقیاس را دارند، به‌کار می‌رود. در ارزشیابی زیست‌شناختی افزاره‌های پزشکی، آگاهی از ایجاد و/ یا رهایش بالقوهٔ نانواشیاء از چنین موادی ضروری است.

روش‌های اجرایی که در مجموعه استانداردهای ISO 10993 برای ارزشیابی زیست‌شناختی افزاره‌های پزشکی شرح داده‌شده‌اند نیز می‌توانند برای ارزشیابی زیست‌شناختی افزاره‌های پزشکی حاوی نانواشیایی که به علت یکپارچه بودن با بخشی از افزاره رها نمی‌شوند، مورداستفاده قرار گیرند. هرچند وقتی امکان رهایش نانواشیاء وجود دارد، توصیه می‌شود ارزشیابی ایمنی نانواشیاء رهاشده نیز انجام شود. علاوه‌بر ارزشیابی افزارهٔ پزشکی، ترکیبات یا اجزای تشکیل‌دهندهٔ نانوماده نیز می‌توانند به‌طور جداگانه ارزشیابی شوند.

1- Evaluation
2- Wear
3- Degradation

این استاندارد در زمینهٔ ارزشیابی افزارهٔ پزشکی به متخصصان آموزش‌دیده، یک رویکرد کلی برای ارزشیابی زیست‌شناختی نانومواد ارائه می‌کند و به نحوهٔ استفاده از سایر قسمت‌های مجموعه استانداردهای ISO 10993 هنگام ارزشیابی نانومواد می‌پردازد. این احتمال وجود دارد که سنجش‌های مختلف شرح داده‌شده در مجموعه استانداردهای ISO 10993 همواره در آزمون نانومواد مناسب نباشند.

نانومواد به‌خودی‌خود می‌توانند به‌صورت پودر یا پراکنش‌های کلوئیدی وجود داشته باشند، اما همچنین می‌توانند به‌صورت مادهٔ نانوساختاریافته یا ساختارهای سطحی در یک ماتریکس روی مواد و/یا افزاره‌های پزشکی ادغام شوند. به‌طورکلی، هنگام آزمون موادزیستی یا افزاره‌های پزشکی لازم است خود نانومواد به جای عصاره‌هایی که معمولاً استفاده می‌شوند، ارزشیابی شوند. نانومواد هنگام استفاده از سامانه‌های آزمونی که برای ارزشیابی افزارهٔ پزشکی استفاده می‌شوند و هنگام تفسیر نتایج آزمون، معمولاً چالش‌های خاصی را به‌همراه دارند.

حوزهٔ فناوری نانو، توسعهٔ نانومواد و ارزشیابی سمیت بالقوهٔ چنین مواد، از حوزه‌های نوظهور هستند و این استاندارد فقط دانش موجود در زمان تدوین این استاندارد را نشان می‌دهد. هرچند ابزار و روش‌های مناسب برای ارزشیابی نانومواد همچنان در دست توسعه هستند، اما داده‌های مربوط به مشخصه‌ها و اثرات زیست‌شناختی نانومواد برای ارجاع به موارد ایمنی در کاربرد آنها در حوزهٔ افزارهٔ پزشکی باید با درنظر گرفتن آنالیز ریسک/ فایده ارائه شوند.

این استاندارد در فرایند مدیریت ریسک شرح داده‌شده در مجموعه استانداردهای ISO 10993 در مورد چگونگی ارزشیابی زیست‌شناختی آن دسته از افزاره‌های پزشکی که حاوی نانومواد هستند یا نانومواد از آنها ایجاد و/ یا از نانومواد تشکیل می‌شوند، رهنمودهایی ارائه می‌کند.

فناوری نانو- ارزشیابی زیست‌شناختی افزاره‌های پزشکی- قسمت ۲۲: راهنمای نانومواد

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد توصیف ملاحظات مربوط به ارزشیابی زیست‌شناختی افزاره‌های پزشکی است که متشکل از/ یا حاوی نانومواد هستند. همچنین این استاندارد می‌تواند برای ارزشیابی نانواشیاء ساخته‌شده به‌صورت محصولات حاصل از تخریب، سایش یا ناشی از فرآیندهای عملیات مکانیکی[1] (به‌عنوان مثال، آسیاکاری درجا[2] و پرداخت[3] افزاره‌های پزشکی) اجزای افزاره‌های پزشکی که از نانومواد ساخته نشده‌اند نیز استفاده شود.

این استاندارد شامل ملاحظات زیر است:

- مشخصه‌یابی نانومواد؛
- آماده‌سازی نمونه برای آزمون نانومواد؛
- رهایش نانواشیاء از افزاره‌های پزشکی؛
- توکسیکوکینتیک نانواشیاء؛
- ارزشیابی زیست‌شناختی نانومواد؛
- ارائهٔ نتایج؛
- ارزیابی ریسک نانومواد در زمینه ارزشیابی افزارهٔ پزشکی؛
- گزارش ارزشیابی زیست‌شناختی؛
- نانوساختارهای تولیده‌شده به‌صورت عمدی روی سطح افزارهٔ پزشکی در طی مراحل مهندسی، ساخت یا فراوری آن.

این استاندارد در موارد زیر کاربرد ندارد:

- نانومواد طبیعی و زیست‌شناختی، به‌شرطی که برای استفاده در افزارهٔ پزشکی، مهندسی، ساخته یا فرایندنشده باشند؛
- نانوساختارهای ذاتی موجود در مادهٔ توده[4]؛
- نانوساختارهای روی سطح افزارهٔ پزشکی تولیدشده به‌صورت محصول جانبی ناخواسته در طی مراحل مهندسی، ساخت یا فراوری افزارهٔ پزشکی.

یادآوری- نمونه‌هایی از نانوساختارهای ناخواستهٔ روی سطح یک افزارهٔ پزشکی، خطوط بیرون‌زدگی طراحی[5] و علائم ماشین‌کاری/ ابزار[6] هستند.

1- Mechanical treatment processes
2- *In Situ* grinding
3- Polishing
4- Bulk
5- Extrusion draw lines
6- Machining/tool marks

این استاندارد برای ارائهٔ یک چارچوب کلی طراحی شده‌است و جنبه‌های مهمی را برجسته می‌کند که لازم است در هنگام ارزیابی ایمنی[1] افزاره‌های پزشکی متشکل از، حاوی و/یا ایجادکنندهٔ نانومواد درنظر گرفته شوند. همچنین، این استاندارد اشکالات غیرمنتظره[2] و موانع متداول شناسایی‌شده در آزمون نانومواد در مقایسه با مواد توده یا گونه‌های شیمیایی مولکول کوچک را شناسایی می‌کند. این استاندارد دانش فنّی فعلی مربوط به نانومواد را نشان می‌دهد. پروتکل‌های آزمون به‌هیچ‌وجه با جزئیات شرح و ارائه نشده‌اند. این استاندارد می‌تواند به‌عنوان مبنایی برای استانداردهای آینده از جمله پروتکل‌های دقیق با تمرکز بر آزمون نانومواد باشد.

۲ مراجع الزامی

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

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

2-1 ISO 10993 (all parts), Biological evaluation of medical devices

یادآوری- مجموعه استانداردهای ملی ایران شماره ۷۲۱۶، ارزشیابی زیست‌شناختی وسایل پزشکی، با استفاده از برخی قسمت‌های استاندارد ISO 10993 تدوین شده‌اند.

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

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۲۰۶: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو- راهنمای مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی مواد نانومقیاس مهندسی‌شده برای ارزیابی توکسیکولوژیک با استفاده از استاندارد ISO/TR 13014:2012/Cor.1: 2012 تدوین شده‌است.

2-3 ISO 14971, Medical devices — Application of risk management to medical devices

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۲۱۳۶: سال ۱۳۸۸، وسایل پزشکی- کاربرد مدیریت ریسک در وسایل پزشکی با استفاده از استاندارد ISO/TR 14971: 2007 تدوین شده‌است.

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و تعاریف ارائه‌شده در مجموعه استانداردهای ISO 10993 (تمام قسمت‌ها) و همچنین استانداردهای ISO/TR 13014 و ISO 14971 به‌کار می‌روند[3].

1- Assessing the safety
2- Pitfalls
۳- اصطلاحات و تعاریف به‌کاررفته در این استاندارد در وبگاه‌های www.iso.org/obp و www.electropedia.org قابل‌دسترس است.

۱-۳
انبوهه

aggregate

ذرّه متشکل از ذراتی با پیوندهای قوی یا جوش‌خورده که مساحت سطح خارجی حاصل آنها به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کمتر از مجموع مساحت سطوح تک‌تک اجزای تشکیل‌دهنده باشد.

یادآوری ۱- نیروهایی که انبوهه را کنار یکدیگر نگه‌می‌دارد نیروهایی قوی هستند، مانند پیوندهای کووالانسی[1] یا یونی و یا نتیجهٔ جوش‌خوردن و گره‌خوردگی فیزیکی پیچیده یا درغیر این‌صورت ذرات اولیه به‌هم چسبیده قبلی.

یادآوری ۲- انبوهه‌ها به‌عنوان «ذرات ثانویه» نیز درنظر گرفته می‌شوند و ذرات اصلی منشاء «ذرات اولیه» نامیده می‌شوند.

[منبع: زیربند ۳-۵، استاندارد ملی ایران – ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵، تغییریافته- یادآوری ۱ پذیرفته شده‌است.]

۲-۳
کلوخه

agglomerate

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

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

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

[منبع: زیربند ۳-۴، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۳
نانومادهٔ مهندسی‌شده

engineered nanomaterial

نانومادهٔ (۳-۷) طراحی‌شده به‌منظور هدف و یا عملکرد خاص است.

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

۴-۳
نانوماده تصادفی

incidental nanomaterial

نانومادهای (۳-۷) که به‌صورت محصول جانبی غیرهدفمند یک فرایند ایجاد شده‌است.

یادآوری ۱- این فرایند شامل ساخت، فرایندهای فناوری زیستی و یا سایر فرایندها است.

1- Covalant bonds

یادآوری ۲- برای بخش «ذرات بسیار ریز» به زیربند ۲-۲۱ استاندارد ISO/TR 27628: 2007 مراجعه شود.

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

۵-۳

نانوماده ساخته‌شده

manufactured nanomaterial

نانومادهای (۳-۷) که برای داشتن خواص و یا ترکیبی خاص به‌طور هدفمند تهیه شده‌است.

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

۶-۳

نانولیف

nanofiber

نانوشیئی (۳-۸) است که در دو بعد خارجی، *نانومقیاس* (۳-۱۲) مشابه بوده و در بعد دیگر به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بزرگتر باشد.

یادآوری ۱- یک نانولیف می‌تواند منعطف یا صلب باشد.

یادآوری ۲- دو بعد خارجی مشابه و نانومقیاس باید با یکدیگر کمتر از ۳ برابر، تفاوت اندازه داشته و بعد خارجی بزرگتر نیز با دو بعد دیگر بیش از سه برابر، تفاوت اندازه داشته‌باشد.

یادآوری ۳- بعد خارجی بزرگتر در نانومقیاس بودن اهمیت ندارد.

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

۷-۳

نانوماده

nanomaterial

ماده‌ای که هر بعد خارجی آن یا ساختار داخلی یا ساختار سطحی آن *نانومقیاس* (۳-۱۲) است.

یادآوری ۱- این اصطلاح عمومی شامل *نانوشیء* (۳-۸) و ماده *نانوساختار* (۳-۱۷) است.

یادآوری ۲- زیربندهای ۳-۳ تا ۳-۵ را مشاهده کنید.

یادآوری ۳- توصیه می‌شود برای اهداف نظارتی، کاربرد تعاریف خاص در مقررات ملی یا منطقه‌ای بررسی شود. باید توجه شود که محدوده‌های مختلف اندازه یا سایر خواص ممکن است در چنین تعاریفی موجود باشد.

[منبع: زیربند ۲-۴، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵، تغییریافته- یادآوری ۲ اصلاح شده و یادآوری ۳ اضافه شده‌است.]

۸-۳

نانوشیء

nano-object

هر قطعه مجزا از یک ماده با یک، دو و یا سه بعد خارجی در *نانومقیاس* (۳-۱۲) است.

یادآوری ۱- ابعاد خارجی دوم و سوم عمود بر بعد اول و همچنین عمود بر یکدیگر هستند.

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

۳-۹

نانوذره

nanoparticle

نانوشیئی (۳-۸) با تمام ابعاد خارجی در *مقیاس نانو* (۳-۱۲) که در آن طول بلندترین و کوتاه‌ترین محورهای نانوشیء به‌طورقابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت نداشته‌باشد.

یادآوری ۱- چنانچه ابعاد به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت داشته‌باشند (معمولا بیشتر از سه برابر)، ممکن است اصطلاحاتی مانند *نانولیف* (۳-۶) یا *نانوصفحه* (۳-۱۰) بر نانوذره ترجیح داده‌شود.

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

۳-۱۰

نانوصفحه

nanoplate

نانوشیئی (۳-۸) است که در یک بعد خارجی *نانومقیاس* (۳-۱۲) بوده و در دو بعد دیگر به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بزرگتر باشد.

یادآوری ۱- کوچکترین بعد خارجی ضخامت نانوصفحه است.

یادآوری ۲- دو بعدی که خیلی بزرگترند، بیش از سه برابر ابعاد در مقیاس نانو هستند.

یادآوری ۳- ابعاد خارجی بزرگتر لزوماً نانومقیاس نیستند.

[منبع: زیربند ۲-۴، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۶-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۶]

۳-۱۱

نانومیله

nanorod

نانولیف (۳-۶) توپُر است.

[منبع: زیربند ۴-۷، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲- ۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۱۲

نانومقیاس

nanoscale

گسترهٔ اندازه تقریباً ۱ نانومتر تا ۱۰۰ نانومتر است.

یادآوری ۱- خواصی که از اندازه‌های بزرگتر برون‌یابی نمی‌شوند، غالباً در این گستره اندازه نشان داده می‌شوند.

یادآوری ۲- خواص موثر بر زیست‌سازگاری همچنین می‌توانند در اندازه‌های بزرگتری به‌طور مثال بین ۱۰۰ نانومتر و ۱ میکرومتر به‌وجود بیایند.

[منبع: زیربند ۲-۱، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵، تغییریافته- یادآوری ۲ اضافه شده‌است.]

۳-۱۳

پدیدهٔ نانومقیاس

nanoscale phenomenon

اثری که حاصل *نانواشیاء* (۳-۸) یا وجود نواحی *نانومقیاس* (۳-۱۲) است.

[منبع: زیربند ۲-۱۳، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۱۴

خاصیت نانومقیاس

nanoscle property

مشخصهٔ یک *نانوشیء* (۳-۸) و یا ناحیهٔ *نانومقیاس* (۳-۱۲) است.

[منبع: زیربند ۲-۱۴، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۱۵

علم نانو/ نانوعلم

nanoscience

مطالعه، کشف و درک ماده در شرایطی که خواص و پدیده‌های وابسته به ساختار و اندازه، غالباً در *نانومقیاس* (۳-۱۲) ظاهر می‌شوند. این خواص متمایز با خواص اتم‌ها و مولکول‌های منفرد و غیرقابل برون‌یابی (استنتاج) از شکل همان ماده هستند.

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

۳-۱۶

نانوساختار

nanostructure

ترکیبی از اجزای تشکیل‌دهنده مرتبط با هم که یک یا بیشتر از یک جزء آنها در محدودهٔ *نانومقیاس* (۳-۱۲) قرار دارند.

یادآوری ۱- یک ناحیه که به‌صورت یک مرز مشخص‌شده از ناپیوستگی در خواص تعریف می‌شود.

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

۳-۱۷

مادهٔ نانوساختاریافته

nanostructured material

ماده‌ای که دارای *نانوساختار* (۳-۱۶) داخلی یا نانوساختار سطحی باشد.

یادآوری ۱- این تعریف امکان اینکه *نانوشیء* (۳-۸) ساختار داخلی یا ساختار سطحی نانومقیاس را داشته باشد، رد نمی‌کند. اگر ابعاد خارجی شیئی در *نانومقیاس* (۳-۱۲) باشند، عبارت نانوشیء توصیه می‌شود.

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

۳-۱۸

فناوری نانو

nanotechnology

استفاده از دانسته‌های علمی در دست‌کاری و کنترل ماده، غالباً در *نانومقیاس* (۳-۱۲) برای بهره‌برداری از پدیده‌ها و خواص وابسته به ساختار و اندازه است. این خواص متمایز با خواص اتم‌ها و مولکول‌های منفرد و غیرقابل برون‌یابی (استنتاج) از شکل توده همان ماده هستند.

یادآوری- دست‌کاری و کنترل شامل سنتز مواد هم می‌شود.

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

۳-۱۹

نانولوله

nanotube

نانولیف (۳-۶) توخالی است.

[منبع: زیربند ۴-۸، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۲۰

مادهٔ نماینده برای آزمون

representative test material
RTM

ماده‌ای که با توجه به یک یا چند خواص ویژه، به اندازهٔ کافی همگن و پایدار است و به‌طور ضمنی در توسعهٔ روش‌های آزمون و اندازه‌گیری که هدف آنها خواص دیگری به‌جز موارد همگنی و پایداری است، مناسب فرض می‌شود.

[منبع: زیربند ۳-۱، استاندارد ISO/TR 16195: 2013، تغییریافته- یادآوری ۱ و ۲ حذف شده‌اند.]

۴ اصول کلی

۴-۱ ملاحظات کلی

نانومواد به‌علت خواص ویژه‌ای که می‌تواند با کاهش اندازه همراه با افزایش مساحت سطح مرتبط باشد، ساخته و استفاده می‌شوند. همچنین مواد با ابعادی در محدودهٔ اندازهٔ بیشتر از ۱۰۰ نانومتر یا کمتر از ۱ میکرون می‌توانند

خواص متفاوتی از آن ابعاد در مقیاس ماکرو (بیشتر از ۱ میکرون) بروز دهند. برای این نوع مواد ذره‌ای ممکن است انجام یک ارزیابی مشابه نانومواد در محدودهٔ اندازهٔ بین ۱ نانومتر تا ۱۰۰ نانومتر درنظر گرفته شود.
ارزشیابی زیست‌شناختی هر ماده یا افزارهٔ پزشکی مورداستفاده برای انسان باید بخشی از برنامهٔ ارزشیابی ساختاریافته در یک فرایند مدیریت ریسک مطابق با استانداردهای ISO 14971 و ISO 10993-1 باشد. فرآیند مدیریت ریسک برای افزاره‌هایی که حاوی نانومواد هستند یا از نانومواد تشکیل می‌شوند، کاربرد دارد. همچنین فرآیند مدیریت ریسک برای افزاره‌هایی که نانواشیاء را به‌عنوان محصولات حاصل از تخریب، سایش یا فرآیندهای عملیات مکانیکی (به‌عنوان مثال آسیاکاری درجا، پرداخت افزاره‌های پزشکی) ایجاد می‌کنند، کاربردی است. به‌همین ترتیب، درصورت رهایش نانواشیاء، چالش‌های خاصی در ارزشیابی ایمنی چنین محصولاتی وجود دارد. ارزشیابی ایمنی و ارزیابی ریسک نانومواد نیاز به تمرکز ویژه‌ای دارد، زیرا نانومواد مختلفی که از مواد شیمیایی یکسان تشکیل شده‌اند بسته به تعدادی از متغیّرها از جمله اندازه، شیمی سطح، خواص فیزیکوشیمیایی و کاربرد موردنظر از نظر توکسیکولوژی می‌توانند پروفایل ریسک مختلفی داشته باشند. برنامهٔ ارزشیابی ایمنی برای افزاره‌های پزشکی که از نانومواد تشکیل می‌شوند یا حاوی نانومواد هستند، به‌طور خاص باید مربوط به موضوعات مرتبط با ارزشیابی ایمنی نانومواد باشد. مجموعه استانداردهای ISO 10993، ISO/TR 13014، ISO 14971 و مراجع [5] [14] [15] [16] [۲۱] [23] [24] [28] [46] [۴۷] و [۴۹] با هدف ارزشیابی زیست‌شناختی افزاره‌های پزشکی و جنبه‌های مختلف نانومواد سروکار دارند.

نانومواد در سطوح درون‌سلولی اندازه‌های مشابه، ساختارهایی مانند DNA دارند و بنابراین (ازنظر تئوری) می‌توانند به چنین ساختارهایی دسترسی‌یافته و با آنها برهم‌کنش داشته‌باشند. همچنین افزاره‌های پزشکی حاوی مواد با ساختارهای داخلی نانومقیاس یا با خصوصیات سطح نانومقیاس مرتبط با پوشش‌ها، عامل‌دارکردن[1] یا با سایر خصوصیات مکان‌نگاری[2] نانومقیاس که به‌عنوان بخشی از کارکرد افزاره درنظر گرفته شده‌اند، می‌توانند خواص منحصربه‌فرد و خاصی داشته باشند که ممکن است لازم باشد در ارزشیابی زیست‌شناختی موردتوجه قرار گیرند. به‌عنوان مثال نشان داده شده‌است که مکان‌نگاری سطح نانومقیاس می‌تواند بر روی هم‌ترازی سلولی[3]، ریخت‌شناسی سلول، سیگنالینگ سلولی، بیان ژن و ماتریکس خارج سلولی تأثیر بگذارد [52] [53] [54]. به‌نظر می‌رسد، رهایش نانواشیاء و استفاده از نانومواد آزاد از نظر مواجههٔ داخلی بالقوه‌ای که می‌تواند رخ دهد، دارای بالاترین پتانسیل ریسک باشد.

۲-۴ ارزشیابی زیست‌شناختی نانومواد

پیوست A استاندارد ISO 10993-1:2009، برای توسعهٔ یک برنامه ارزیابی ریسک‌های زیست‌شناختی، چارچوبی ارائه می‌کند که باید براساس نوع افزاره و طول دورهٔ تماس با بدن موردتوجه قرار گیرد. به‌طور کلی این چارچوب برای افزاره‌هایی که حاوی نانومواد هستند، نانومواد ایجاد می‌کنند و یا از نانومواد تشکیل می‌شوند نیز کاربرد دارد. انجام

1- Functionalization
2- Topographical features
3- Cell alignment

چنین آزمون‌هایی باید براساس خصوصیات هر افزاره باشد. همانطور که در این استاندارد توضیح داده شده‌است، به‌دلیل وجود نانومواد، ملاحظات خاصی برای آزمون‌های مجموعه استانداردهای ISO 10993 به‌کار رفته است.

استاندارد ISO 10993-1: 2009 رهنمودی در مورد فرایند مدیریت ریسک ارائه می‌کند که شامل شناسایی مخاطره[1]، ارزیابی مواجهه و تخمین ریسک است. این فرآیند معمولاً به اندازهٔ کافی قدرتمند و انعطاف‌پذیر است تا بتواند مبنایی برای ارزشیابی نانومواد فراهم کند، حتی اگر نانومواد خواصی داشته‌باشند که آنها را از مادهٔ اصلی‌شان متفاوت کند. با توجه به موارد ذکرشده در استاندارد ISO 10993-1 این فرآیند ازجمله راهبرد ارزشیابی زیست‌شناختی، محتوای برنامه و معیارهای قابل‌قبول ریسک مربوط به نانومواد باید توسط متخصصان آگاه و مجرب طراحی، اجرا و مستند شود. مطابق رویکرد کلی ارائه‌شده در استاندارد ISO 10993-1، اولین گام در ارزشیابی زیست‌شناختی نانومواد، جمع‌آوری اطلاعات موجود در مورد نانومادهٔ موردنظر است. بررسی داده‌های مقالات مروری بالینی و غیربالینی باید طبق پیوست C استاندارد ISO 10993-1: 2009 انجام شود تا خلاصه‌ای دقیق و عینی از اطلاعات موجود در مورد نانوماده و کاربرد موردنظر آن ارائه دهد. در مرجع [55] مکان‌های مختلفی که می‌توان اطلاعات مربوط به نانومواد را به‌دست آورد، ارائه شده‌است. مطابق استدلال استانداردهای ISO 10993-1 وISO 14971، اگر از داده‌های ارزشیابی ایمنی زیست‌شناختی موجود نتیجه‌گیری شود که ریسک‌های شناسایی‌شده موردقبول هستند، دیگر نیازی به آزمون بیشتر نیست. درغیراین‌صورت، باید اطلاعات بیشتری به‌دست آورد. به‌منظور استفاده از داده‌های موجود برای ارزشیابی زیست‌شناختی، اثبات اکی‌والان[2] نانوماده لازم است (به زیربند ۴-۴ مراجعه شود).

۴-۳ رده‌بندی نانومواد

ارزیابی مواجهه و شناسایی مخاطره باید بر مبنای مشخصه‌های افزارهٔ پزشکی نهایی و کاربرد موردنظر باشد. در شناسایی مخاطره، خواص فیزیکوشیمیایی و توکسیکولوژیکی نانوماده از جمله مواد افزودنی و مواد فراوری‌کننده کمکی را باید موردتوجه قرار داد. در ارزیابی مواجهه، غلظت نانومادهٔ به‌کار رفته در افزارهٔ پزشکی، کاربرد موردنظر و مسیر مواجهه، سرعت[3] الگوی رهایش و مواجههٔ تخمین زده‌شدهٔ بیمار را باید درنظر داشت. حالتی که نانوماده در افزارهٔ پزشکی نهایی به‌کار می‌رود می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی مشخصه‌های مواجهه را تغییر دهد [56]. ملاحظات کلی در مورد رده‌های مختلف نانومواد و افزاره‌های پزشکی در جدول ۱ ارائه شده‌اند. برخی از افزاره‌ها ممکن است در بیش از یک رده قرارگیرند که دراین‌صورت در هر رده باید ارزشیابی مناسبی درنظر گرفته شود. ارزشیابی هر افزاره‌ای که در یکی از رده‌های توصیف‌شده قرار نگیرد، باید از اصول کلی مندرج در استاندارد ISO 10993-1 همراه با ملاحظات خاص ذکرشده در این استاندارد پیروی کند.

1- Hazard
2- Equivalence
3- Rate

جدول ۱- ملاحظات ارزشیابی زیست‌شناختی افزاره‌های پزشکی حاوی نانومواد، ایجادکنندهٔ نانومواد یا متشکل از نانومواد

رده[الف]	نوع نانومادهٔ موجود در افزارهٔ پزشکی	ملاحظاتی علاوه‌بر ارزشیابی زیست‌شناختی طبق استاندارد ISO 10993-1
۱	نانوساختارهای موجود در سطح	- پتانسیل اثرات سلولی یا بافتی ناشی از برهم‌کنش مستقیم با نانوساختارهای موجود در سطح (مفید یا نامطلوب) را درنظر بگیرید. - پتانسیل رهایش ساختارها از سطح (جداشدن) را درنظر بگیرید. - پتانسیل ایجاد نانواشیاء از طریق فرایندهای تخریب، سایش یا عملیات مکانیکی را درنظر بگیرید. - مشخصه‌یابی نانوساختارها را درنظر بگیرید (به بند ۵ مراجعه شود).
۲	نانواشیاء متصل به افزارهٔ پزشکی/ یا افزارهٔ پزشکی حاوی نانواشیاء، بدون قصد رهایش	- پتانسیل اثرات سلولی یا بافتی ناشی از برهم‌کنش مستقیم با نانومواد / نانوساختارهای متصل بر سطح (مفید یا نامطلوب) را درنظر بگیرید. - پتانسیل رهایش نانواشیاء از افزاره را درنظر بگیرید. - پتانسیل ایجاد نانواشیاء از طریق فرایندهای تخریب، سایش یا عملیات مکانیکی را درنظر بگیرید. - مشخصه‌یابی خواص فیزیکوشیمیایی نانواشیاء را درنظر بگیرید (به بند ۵ مراجعه شود).
۳	نانواشیاء/ نانوساختارهای روی سطح یا درون افزارهٔ پزشکی؛ با رهایش آگاهانه/ مورد انتظار از افزاره	- جنبش‌شناسی[۱] رهایش (سرعت و مقدار) نانواشیاء و طول دورهٔ تماس افزارهٔ پزشکی را درنظر بگیرید. - پتانسیل اثرات سلولی یا بافتی ناشی از برهم‌کنش مستقیم با نانواشیاء/ نانومواد (مفید یا نامطلوب) را درنظر بگیرید. - مشخصه‌یابی خواص فیزیکوشیمیایی نانواشیاء رهاشده را درنظر بگیرید (به بند ۵ مراجعه شود). - توکسیکوکینتیک‌ها و توزیع بافتی نانواشیاء را درنظر بگیرید (به بند ۸ مراجعه شود). - ارزشیابی زیست‌شناختی نانواشیاء را درنظر بگیرید (به بند ۹ مراجعه شود). پتانسیل ایجاد نانواشیاء از طریق فرایندهای تخریب، سایش یا عملیات مکانیکی را درنظر بگیرید.

جدول ۱ - (ادامه)

رده	نوع نانومادهٔ موجود در افزارهٔ پزشکی	ملاحظاتی علاوه‌بر ارزشیابی زیست‌شناختی طبق استاندارد ISO 10993-1
۴	افزارهٔ پزشکی نانوشیء	- مشخصه‌یابی خواص فیزیکوشیمیایی نانواشیاء را درنظر بگیرید (به بند ۵ مراجعه شود). - توکسیکوکینتیک‌ها و توزیع بافتی نانواشیاء را درنظر بگیرید (به بند ۸ مراجعه شود). ارزشیابی زیست‌شناختی نانواشیاء را درنظر بگیرید (به بند ۹ مراجعه شود).
۵	نانواشیاء[ب] رهاشده از افزارهٔ پزشکی به‌صورت محصول ناشی از فرایندهای تخریب، سایش یا عملیات مکانیکی[پ] (مانند آسیاکاری درجا یا پرداخت)	- مشخصه‌یابی خواص فیزیکوشیمیایی نانواشیاء را درنظر بگیرید (به بند ۵ مراجعه شود). - بند ۷ ملاحظات بیشتری را برای نانواشیاء رهاشده از طریق سایش یا ایجادشده از طریق فراوری درجا شرح می‌دهد. - توکسیکوکینتیک و توزیع بافتی نانواشیاء را درنظر بگیرید (به بند ۸ مراجعه شود). - ارزشیابی زیست‌شناختی نانواشیاء را درنظر بگیرید (به بند ۹ مراجعه شود). - طول دورهٔ تماس و کینتیک رهایش را در نظر بگیرید (سرعت و مقدار).

1- Kinetics

الف- یک افزاره حاوی نانومواد می‌تواند در بیشتر از یک رده قرار گیرد.

ب- نانواشیاء می‌توانند از یک افزارهٔ پزشکی که حاوی نانواشیاء نیستند، ایجاد شوند.

پ- تخریب، سایش یا عملیات یک افزارهٔ پزشکی حاوی نانواشیاء می‌توانند نانواشیاء جدید یا ناخواسته‌ای را ایجاد کنند.

۴-۴ اکی‌والان نانوماده

شناسایی و مشخصه‌یابی صحیح نانوماده ضروری است. در مورد نانومواد، اکی‌والان بستگی به چندین عامل دارد. ترکیب‌بندی شیمیایی به‌تنهایی برای نشان‌دادن اکی‌والان کافی نیست، چون خواص اختصاصی نانوماده می‌تواند تحت‌تأثیر تعدادی از عوامل دیگر مانند اندازه، شکل و خواص سطح نانوماده و/یا منبع (سازنده) این نانومواد، فرایند ساخت و شرایط انبارش قرار گیرد. اکی‌والان نانومواد تنها موقعی می‌تواند مورد ادعا قرارگیرد که به‌درستی نشان داده‌شود و با داده‌های همراه، توجیه شود.

به‌طور کلی برای برون‌یابی نتایج نمی‌توان از داده‌های موجود محصولات دیگری که از نانومواد استفاده می‌کنند/یا حاوی نانومواد مشابه هستند یا از ترکیب اولیهٔ متناظر همان ماده استفاده کرد، هرچند ممکن است چنین محصولاتی نشانه‌ای از نگرانی‌های ایمنی احتمالی باشند. درصورتی‌که انجام آزمونی لازم باشد، آزمون باید بر روی محصول واقعی و/یا هر نانومواد‌ی که در تماس با بیماران است، انجام شود.

۵ مشخصه‌یابی نانومواد

۵-۱ ملاحظات کلی

آگاهی از خواص فیزیکوشیمیایی نانومواد برای درک رفتار آنها در سامانه‌های زیست‌شناختی لازم و ضروری است. برای شناسایی نانومواد خاص، مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی ضروری است. مشخصه‌یابی خواص فیزیکوشیمیایی نانومواد/ نانواشیاء موجود در افزاره‌های پزشکی و/یا ایجادشده در اثر تخریب، سایش یا فرایندهای عملیات مکانیکی افزاره، یک مرحلهٔ مهم در تکمیل ارزشیابی زیست‌شناختی افزارهٔ پزشکی است. همچنین مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی می‌تواند در غربالگری نانومواد جدید بالقوه از جهت مناسب بودن برای یک افزارهٔ پزشکی با کاربرد پیشنهادشده، مفید باشد. علاوه‌بر این، مشخصه‌یابی صحیح برای نشان‌دادن یا تأیید ویژگی‌های یک نانوماده در محیط و شرایط معین ضروری است.

مشخصه‌یابی فیزیکوشیمایی به سه سوال اساسی در مورد نانومادهٔ مورداستفاده یا رهاشده از یک افزارهٔ پزشکی پاسخ می‌دهد.

- **ترکیب‌بندی شیمیایی:** از چه چیزی ساخته شده‌است؟
- **توصیف فیزیکی:** به چه چیزی شباهت دارد؟
- **خواص غیرذاتی:** چگونه با محیط اطراف برهم‌کنش دارد؟

خواص فیزیکوشیمیایی مرتبط با این سوالات محدودهٔ وسیعی از مشخصه‌های نانواشیاء را شامل می‌شود. مطابق راهنمای ارزشیابی مواد رایج مورداستفاده در افزاره‌های پزشکی، هدف از مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی مواد در مقیاس نانو، به خواصی مربوط است که با ارزشیابی زیست‌شناختی و کاربرد موردنظر افزاره (کاربرد بالینی و طول دورهٔ استفاده) مرتبط هستند.

اصول‌کلی مشخصه‌یابی شیمیایی، فیزیکوشیمیایی، ریخت‌شناسی و مکان‌نگاری مواد مورداستفاده در افزاره‌های پزشکی در استانداردهای ISO 10993-18 و ISO/TS 10993-19 ذکر شده‌اند. شناسایی و کمّی‌سازی[1] محصولات حاصل از تخریب در افزاره‌های پزشکی در استانداردهای ISO 10993-9، ISO 10993-13، ISO 10993-14 و ISO 10993-15 ارائه شده‌اند. راهنمای دقیق به‌ویژه برای مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی نانومواد در دست تدوین است. به‌تازگی استانداردهای ISO/TR 13014 و ISO/TR 14187 و راهنماهایی برای غذا و خوراک دام، اجزای تشکیل‌دهندهٔ مواد آرایشی و افزاره‌های پزشکی توسط کمیتهٔ اروپایی (EC)[2] منتشر شده‌اند [57] [58] [59].

استاندارد ISO/TR 13014 فهرستی از موارد زیر را به‌عنوان خواص نانومواد مهندسی‌شده برای مشخصه‌یابی در زمینه آزمون توکسیکولوژیک ذکر می‌کند:

- ترکیب‌بندی شیمیایی؛
- خلوص؛
- اندازه و توزیع اندازهٔ شیء؛

1- Quantification
2- European commission

- حالت انبوهه‌ای‌شدن و کلوخه‌ای‌شدن؛
- شکل؛
- مساحت سطح؛
- شیمی سطح؛
- بار سطح؛
- انحلال‌پذیری؛
- قابلیت پراکنش؛

این خواص باید به‌عنوان نقطهٔ شروعی برای ارزشیابی نانومواد مورداستفاده در افزاره موردتوجه قرارگیرند؛ بسته به طراحی، کاربرد موردنظر و مشخصه‌های سایش افزاره، ممکن است مشخصه‌یابی بیشتری لازم باشد. نمونه‌هایی از خواص فیزیکوشیمیایی دیگری که ممکن است به‌صورت مورد به مورد درنظر گرفته شوند، عبارتند از:

- قابلیت بلورینگی؛
- تخلخل؛
- پتانسیل اکسایش و کاهش؛
- (نور) کاتالیزگری؛
- پتانسیل تشکیل رادیکال؛
- ضریب تقسیم اکتانول/ آب (ممکن است برای مواد جامد قابل‌استفاده نباشد).

به‌منظور دستیابی به داده‌های موردنیاز مانند آنچه در قسمت‌های بالا نشان داده‌شد، برای توسعهٔ یک برنامهٔ مشخصه‌یابی قابل‌اعتماد و مرتبط برای یک افزارهٔ حاوی نانومادهٔ خاص، همکاری‌های میان‌رشته‌ای بین توکسیکولوژیست‌ها، کارشناسان شیمی- فیزیک، مهندسان و سایر متخصصان در حوزه‌های مربوطه ضروری است. راهنمای اختصاصی مشخصه‌یابی برای برخی نانومواد به‌عنوان مثال، نانولوله‌های کربنی تک‌دیواره (SWCNT)[1] و چنددیواره (MWCNT)[2]، پودر کربنات کلسیم نانومقیاس، پودر دی‌اکسید تیتانیم نانومقیاس، نانوذرات طلا و نقره و نانورس موجود است. برای جزئیات بیشتر به سایت زیر مراجعه شود[3].

افزاره‌هایی که دارای سطوح نانوساختاریافته هستند، علاوه‌بر مشخصه‌یابی خواص فیزیکوشیمیایی فهرست‌شدهٔ بالا می‌توانند به مشخصه‌یابی خصیصه‌های ریخت‌شناسی نیز نیاز داشته باشند. اصلاح ساختار سطح افزارهٔ پزشکی در مقیاس نانو، با هدف اصلاح برهم‌کنش‌های سلولی و میکروبی با افزاره‌ها، همچنان دردست بررسی هستند. پارامترهای اندازه‌گیری موردنیاز برای مشخصه‌یابی مناسب معماری سطح، به‌کاربرد اختصاصی بستگی دارد [60] [61]. برای مثال وب و همکارانش[4] [42] پیشنهاد استفاده از حداقل سه پارامتر آماری به‌عنوان یک استاندارد برای توصیف نانومعماری[5] سطوح افقی و عمودی در زمینهٔ چسبندگی باکتریایی ارائه کرده‌اند.

1- Singlewall carbon nanotubes
2- Multiwall carbon nanotubes
3- http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_tc_browse.htm?commid=381983
4- Webb et al
5- Nanoarchitecture

– میانگین زبری سطح (Ra)[1]: متوسط انحراف مقادیر ارتفاع سطح از میانگین صفحه؛
– اختلاف مساحت سطح (Rsa)[2]: افزایش مساحت سطح ناشی از زبری، یعنی درصد تفاوت بین مساحت سطح واقعی و مساحت سطح پیش‌بینی‌شده. اگر امکان اندازه‌گیری دقیق مساحت سطح وجود داشته‌باشد، می‌توان از این پارامتر استفاده کرد؛
– شمارش پیک (Rpc)[3]: تعداد پیک‌ها در پروفایل مورد اندازه‌گیری؛

علاوه‌بر این، ارتفاع پیک و فاصلهٔ پیک تا پیک می‌تواند پارامترهای مفید فضایی باشند.

مواد نانومتخلخل برای کاربردهای افزاره‌ای از قبیل دارورسانی و داربست بافتی[4] دردست توسعه هستند. اطلاعات مفید برای مشخصه‌یابی مواد متخلخل شامل موارد زیر است:

– اندازه و ساختار منفذها یا حفره‌ها؛
– تراکم منفذها یا حفره‌ها؛
– توزیع منفذها یا حفره‌ها.

نانومواد به‌شکلی که به مصرف‌کنندهٔ نهایی تحویل داده می‌شود، باید مشخصه‌یابی شوند، یعنی به‌عنوان افزارهٔ نهایی. همچنین، به‌منظور ارزشیابی مستقیم جزء نانوماده، نمونه‌های نماینده از افزارهٔ نهایی یا مواد فراوری‌شده می‌توانند در حالتی مشابه مانند افزارهٔ نهایی مشخصه‌یابی شوند. علاوه‌براین، وقتی که نانوماده ساخته شد ممکن است هنگام انجام مطالعات توکسیکولوژی و آزمون‌های زیست‌سازگاری، مشخصه‌یابی ضروری باشد. برای ارزشیابی ایمنی زیست‌شناختی، باید مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی نانومواد ذکرشده در قسمت‌های بالا نیز در محیط زیستی مورداستفاده در سامانهٔ آزمون تعیین شوند. برهم‌کنش بین این محیط‌ها و نانومواد می‌تواند تأثیر زیادی بر رفتار نانومواد در سامانهٔ آزمون بگذارد. این عامل درطی روش‌های اجرایی آزمون و در طی ارزشیابی نتایج آزمون باید موردتوجه قرار گیرد.

تماس با مایعات بدن می‌تواند مشخصه‌های سطح نانومواد و بنابراین رفتار زیست‌شناختی آنها را تغییر دهد که می‌تواند روی مخاطرهٔ ناشی از نانوماده تأثیر داشته‌باشد (به زیربند ۸-۲-۲ مراجعه شود).

ایزوله‌کردن[5] و مشخصه‌یابی نانواشیاء ایجادشده از طریق سایش افزاره‌های پزشکی به‌صورت یک چالش باقی‌مانده است. روش‌های برون‌تن برای شبیه‌سازی تولید درجا نانومواد/ نانواشیاء باید نمایندهٔ کاربرد بالینی باشد.

۵-۲ پارامترها و روش‌های مشخصه‌یابی

در جدول ۲، پارامترهای بنیادی که به‌عنوان نقطهٔ شروعی برای مشخصه‌یابی نانومواد مورداستفاده در افزاره‌های پزشکی مفید هستند، خلاصه شده‌اند. اطلاعات دقیق در مورد این پارامترها با ارزشیابی زیست‌شناختی در استاندارد ISO/TR 13014 ارائه شده‌اند.

1- Averge surface roughness
2- Surface area difference
3- Peak count
4- Tissue scaffolding
5- Isolation

همچنین جدول ۲ نمونه‌هایی از روش‌هایی که می‌تواند برای تهیه داده‌های کمّی و/یا کیفی برای هر یک از این پارامترها استفاده شوند را برمبنای اطلاعات موجود در استاندارد ISO/TR 13014 ارائه می‌دهد. ازآنجایی‌که توسعهٔ بهترین روش‌ها برای مشخصه‌یابی نانوماده، یک حوزهٔ تحقیق و بحث درحال رشد است، باید این فهرست را به‌عنوان یک مجموعهٔ پویا درنظر گرفت. روش‌های فهرست‌شده شامل برخی روش‌های توسعه‌یافته برای آنالیز ذرهٔ معمولی و همچنین شامل سایر روش‌هایی است که به‌طور اختصاصی برای مواد نانومقیاس توسعه یافته‌اند.

اغلب برای مشخصه‌یابی یک پارامتر فیزیکوشیمیایی خاص چندین روش موجود است. یک روش مشخصه‌یابی واحد ممکن است ارزیابی درستی از پارامتر (برای مثال، توزیع اندازهٔ ذره، ترکیب‌بندی سطح) ارائه ندهد. در چنین مواردی یک روش تکمیلی، درصورت وجود، ممکن است برای ارزیابی درست خاصیتی که باید مشخصه‌یابی شود، ضروری باشد. برای مشخصه‌یابی ممکن است به دو روش مستقل از هم نیاز باشد. توجه به این نکته مهم است که ممکن است نتایج به‌دست آمده برای یک خاصیت ویژه با استفاده از روش‌های مختلف به‌طور مستقیم قابل‌مقایسه نباشند و درحال‌حاضر روش‌های هماهنگ شدهٔ معدودی برای ارزیابی فیزیکوشیمیایی نانومواد برای کمک به توسعهٔ طراحی یک آزمون قدرتمند[1] وجود دارد. روش(های) انتخاب شده برای مشخصه‌یابی باید براساس نوع و شکل نانوماده و کاربرد پیشنهادشدهٔ افزاره توجیه شود. برای مثال، برای تعیین اندازهٔ نانوشیء همانطور که در چندین استاندارد راهنما نشان داده شده‌است، حداقل یک روش میکروسکوپی (مثلاً میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)[2] میکروسکوپ لیزری روبشی هم‌کانون (CLSM)[3]) باید استفاده شود [57] [58] [59]. گزارشی توسط کمیتهٔ اروپایی- مرکز تحقیقات مشترک (EU-JRC)[4] منتشر شد که در آن امکانات و اشکالات اندازه‌گیری‌های نانوشیء شرح داده شده‌اند [62].

ازآنجاکه مشخصه‌یابی نانومواد اغلب از لحاظ علمی و فنّی چالش‌برانگیز است، یک برنامهٔ تضمین کیفیت و بهین روش‌های آزمایشگاهی[5] باید درنظر گرفته شود. انتخاب روش‌ها، آنالیز نانومواد و تفسیر خواص نانوماده باید توسط متخصصان حرفه‌ای، آموزش‌دیده و باتجربه انجام شود. برای اطمینان از اینکه داده‌های به‌دست آمده نمایانگر مادهٔ استفاده‌شده در افزاره است، باید هنگام انجام آنالیزها، روش‌های اجرایی آماده‌سازی نمونه با دقّت کامل انجام شوند. تمام جنبه‌های فرایند مشخصه‌یابی باید با دقّت ثبت شوند تا از شفافیت و واقعی بودن نتایج اطمینان حاصل شود. باید نشان داده‌شود که مجموعه روش‌های مورداستفاده برای نانومواد موردبررسی مناسب هستند.

1- Robust
2- Transmission electron microscopy
3- Confocal laser scanning microscopy
4- European commission- joint reaserch centre
5- Laboratory best practices

جدول ۲- مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی و نمونه‌هایی از روش‌های اندازه گیری

مشخصه‌ها	عامل اندازه‌ده	نمونه روش‌های اندازه‌گیری	استانداردهای ISO مرتبط با روش‌شناسی
ترکیب‌بندی شیمیایی و خلوص	تعداد و ماهیت عناصر به‌تنهایی یا در مولکول‌ها (می‌تواند به‌عنوان فرمول شیمیایی بیان شود) میزان یا غلظت اجزای غیرعمدی (ناخالصی‌ها)	فلورسانس پرتو ایکس طیف‌سنجی فوتوالکترون پرتو ایکس طیف‌سنجی الکترون اوژه پراش پرتو ایکس (XRD) یا طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)، طیف‌سنجی‌های رامان و طیف‌سنجی‌های مولکولی دیگر آنالیز گرماوزن‌سنجی طیف‌سنج فرابنفش/ مرئی میکروسکوپی الکترونی روبشی XRD یا طیف‌سنجی پرتو ایکس براساس تفکیک انرژی (EDS) تشدید مغناطیسی هسته (ذره منفرد) طیف‌سنجی جرمی- پلاسمای جفت‌شدهٔ القایی (spICP-MS)	ISO 22309 ISO 22489 ISO 24173 ISO 13084 ISO 18144
اندازهٔ ذره و توزیع اندازهٔ ذره	**اندازهٔ ذره:** قطر کروی معادل برای ذراتی که هندسهٔ منظمی نشان می‌دهند. طول یک یا چند جنبهٔ خاص از هندسهٔ ذرات **توزیع اندازهٔ ذره:** نمایش گرافیکی، مثلا، هیستوگرام و/یا مقادیر پارامترهای آماری مانند میانگین، میانه و/یا حالت	پراکندگی نورپویا پراکندگی پرتو ایکس زاویه‌کوچک کروماتوگرافی اندازه‌گزین آنالیز تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی (SEM)، میکروسکوپی الکترونی عبوری (TEM)، یا میکروسکوپی پروبی (کاوند) روبشی (SPM) آنالیز تحرک تفاضلی ته‌نشینی مایع مرکزگریز تحلیل ردیابی نانوذرات طیف‌سنجی رامان برافروختگی ناشی از لیزر میکروسکوپی لیزری روبشی هم‌کانون (CLSM) پلاسمای جفت‌شدهٔ القایی- طیف‌سنجی جرمی تک‌ذره (spICP-MS) فیلتراسیون جریان مماسی برای جداسازی نانوماده و به دنبال آن آشکارسازی مناسب (برای مثال، ICP-MS (ISO 10993-14)	مجموعه ISO 9276 ISO 9277 مجموعه ISO 13318 ISO 13320 ISO 22412 مجموعه ISO13322 ISO 14488 ISO 14887 ISO 15900 ISO 16700 ISO/TS 19590 ISO 20998-1 مجموعه ISO 21501 ISO 22412

جدول ۲- (ادامه)

مشخّصه‌ها	عامل اندازه‌ده	نمونه روش‌های اندازه‌گیری	استانداردهای ISO مرتبط با روش‌شناسی
حالت انبوهگی/ کلوخگی	اندازهٔ ذره تعداد انبوهه/کلوخه ذرات در مقایسه با تعداد کل ذرات اولیه تعداد ذرات اولیه در انبوهه/ کلوخه توزیع تعداد ذرات اولیه در انبوهه/ کلوخه	آنالیز تصویر (زم‌زایشی) SEM یا (زم‌زایشی) TEM پراکندگی وابسته به زاویه در طول موج‌های مختلف پراکندگی نور ایستا پراکندگی پرتو ایکس زاویه‌کوچک پراش پرتو ایکس(XRD) طیف‌سنجی جذب پرتو ایکس (XAS) پراکندگی نوترونی زاویه‌کوچک روش‌های رئولوژی ته‌نشینی مایع مرکزگریز پراش لیزری آنالیز ردگیری نانوذره	به راهنمای مربوط به اندازهٔ ذره مراجعه شود. ISO/TR 13097 ISO/TR 12025 ISO/TR 13322-1
شکل	توصیف‌کننده‌های شکل مستقل از اندازه توزیع مقادیر توصیف‌کننده‌های شکل مستقل از اندازه	آنالیز SEM، TEM، میکروسکوپی نیروی اتمی (AFM)، یا تصویرهای SPM روش‌های پراکندگی پلاسمای جفت‌شدهٔ القایی- طیف‌سنجی جرمی تک‌ذره (spICP-MS)	ISO 16700 ISO 13322-1
مساحت سطح	مساحت سطح ویژه جرم-و/یا حجم	روش‌های مبتنی بر ایزوترم‌های جذب گاز یا مایع (روش بت) تخلخل‌سنجی مایع آنالیز تصویر افروختگی (برانگیختگی) ناشی از لیزر	ISO 15901-1 ISO 15901-2 ISO 15901-3 ISO 18757 ISO 13322-1 ISO 9277
نانوساختارهای سطح	اندازه و هندسه	تداخل سنجی بازتاب سنجی میکروسکوپی پروبی (کاوند) روبشی (SPM) و میکروسکوپی نیروی اتمی (AFM) میکروسکوپی تونل‌زنی روبشی(STM) پروفیلومتری تماسی پروفیلومتری غیرتماسی	ISO 25178

جدول ۲- (ادامه)

مشخصه‌ها	عامل اندازه‌ده	نمونه روش‌های اندازه گیری	استانداردهای ISO مرتبط به روش
شیمی سطح	فراوانی مولکولی و عنصری واکنش‌پذیری (سرعت واکنش شیمیایی)	طیف‌سنجی الکترون اوژه طیف‌سنجی فوتوالکترون پرتو ایکس (XPS) طیف‌شناسی جرمی یون‌ثانویه (SIMS) پروب اتمی سه‌بعدی برش‌نگاری طیف‌شناسی تفکیک انرژی طیف‌شناسی اتلاف انرژی الکترون (EELS) طیف‌سنجی یونی کم‌انرژی طیف‌سنجی‌های رامان و مولکولی دیگر	ISO/TR 14187 ISO 18115 ISO 24236 ISO 15471 ISO 18118 ISO/TR 19319 ISO 17973
بار الکتریکی سطح	تعداد خالص بارهای مثبت و منفی در واحد مساحت سطح ذره پتانسیل زتا	نقطه ایزوالکتریک پراکندگی نور الکتروفورتیک الکتروکوچی الکترو- اسمزی دامنهٔ صوتی- الکتریکی جریان ارتعاش کلوئیدی	ISO 20998 ISO 13099
انحلال پذیری/ قابلیت پراکنش	**انحلال پذیری:** حداکثر جرم یا غلظت املاحی که می‌تواند در یک واحد جرم یا حجمی از حلال در دما یا فشار مشخص (یا استاندارد) حل شود. **قابلیت پراکنش:** حداکثر جرم یا غلظت فاز پراکنده موجود در یک واحد جرمی از محیط پراکنده‌کننده (حلّال) یا واحد حجم پراکنش (حلّال به‌علاوه فاز پراکنده‌شده) در دما و فشار مشخص (یا استاندارد)	تاکنون روش‌های اختصاصی برای ارزیابی انحلال‌پذیری نانواشیاء تدوین نشده است. فیلتراسیون جریان مماسی برای جداسازی نانوماده و به دنبال آن آشکارسازی مناسب، برای مثال، ICP-MS (استاندارد ISO 10993-14) روش‌های ارزیابی قابلیت پراکنش نانواشیاء براساس اندازهٔ ذره/ توزیع اندازه و حالت انبوهگی/ کلوخگی (اندازهٔ ذره در قسمت بالا را ببینید)	ISO 20998 ISO 13099

اطلاعات ارائه‌شده در جدول ۲ براساس استاندارد ISO/TR 13014 است. همچنین مدارک دیگری (برای مثال، ISO/TS 17200) وجود دارد که توصیه‌هایی در مورد مشخصه‌یابی نانوماده/ نانوشیء ارائه می‌دهند.

بیشتر این پارامترها و روش‌های فهرست‌شده مربوط به مشخصه‌یابی نانوذرات هستند. لازم به‌ذکر است که سایر فرم‌ها/ شکل‌های نانومواد می‌توانند استفاده شوند، برای مثال، نانوالیاف و نانوصفحه‌ها، برای تولید افزاره‌های پزشکی. برخی از پارامترها یا روش‌های فهرست‌شده ممکن است برای سایر فرم‌ها/ شکل‌های نانومواد قابل‌استفاده نباشند.

هر یک از روش‌های فهرست‌شده می‌توانند محدودیت‌های خاص خودشان را داشته باشند؛ بنابراین، باید نشان داده‌شود که روش‌شناسی‌های مورداستفاده برای نانومادهٔ موردبررسی، مناسب هستند.

برای برخی نانومواد (برای مثال، نانونقره، اکسیدروی نانومقیاس)، انحلال یا آزادسازی یونی[1] می‌تواند اتفاق بیفتد. انحلال نانومواد در محیط‌های مختلف فیزیولوژیکی را می‌توان با استفاده از فیلتراسیون جریان مماسی[2] ارزیابی کرد که روشی برای جداسازی نانومواد از همتایان حل‌شدهٔ آنها است. سپس می‌توان قسمت‌های جداشده را با استفاده از طیف‌سنجی ICP-MS کمّی‌سازی کرد [63].

۳-۵ استفاده از مواد مرجع

موجود بودن نمونه‌های کنترل مثبت و منفی نانومواد، اهمیت خیلی مهمی برای سنجش قابلیت تجدیدپذیری[3] و قابلیت اطمینان[4] آزمون ایمنی نانوماده دارد. بااین‌حال، برای نانومواد نمونه‌های کنترل مثبت و منفی وجود ندارند. بنابراین، استفاده از «مواد آزمون نماینده»[5] توصیه شده‌است [65]. کمیتهٔ فنی ISO/TC 229 یک مادهٔ آزمون نماینده را این‌گونه تعریف می‌کند: ماده‌ای که با توجه به یک یا چند خواص ویژه، به اندازهٔ کافی همگن و پایدار است و به‌طور ضمنی در توسعهٔ روش‌های آزمون و اندازه‌گیری که هدف آنها خواص دیگری به جز موارد همگنی و پایداری است، مناسب فرض می‌شود (ISO/TS 16195). درحال‌حاضر، این رویکرد در پروژهٔ مشترک کارگروه نانومواد ساخته‌شده در OECD[6] برای آزمون ایمنی نانوماده با استفاده از مواد نماینده از مخزن مرکز تحقیقات کمیتهٔ مشترک اروپایی EU -JRC[7] به‌کار گرفته می‌شود. راهنمایی در مورد الزامات عمومی مواد آزمون نماینده برای توسعهٔ روش‌هایی برای آزمون‌های مشخصه‌ها، عملکرد و ایمنی نانوذره و پودرهای نانولیف در استاندارد ISO/TS 16195 ارائه شده‌است.

رهنمودهای کلی برای استفاده و آماده‌سازی مواد مرجع در ارزشیابی زیست‌شناختی افزاره‌های پزشکی در استاندارد ISO10993-12 ارائه شده‌است. هرچند، درحال‌حاضر به‌جز اندازه، تعداد کمی مواد مرجع برای خواص نانوماده موجود است. مواد مرجع برای ارزشیابی‌های اندازهٔ ذرهٔ نانوماده به‌طور فزاینده‌ای از سازمان‌های ملی و محلی از جمله موسسهٔ ملی استاندارد و فناوری ایالات متحدهٔ آمریکا (NIST)[8]، مرکز تحقیقات مشترک کمیتهٔ اروپایی اتحادیه اروپا و موسسهٔ دولتی تحقیق و آزمون مواد آلمان (BAM)[9] در دسترس است. کمیتهٔ فنی ISO/TC 299 با همکاری BAM از همهٔ مواد مرجع نانومقیاس موجود در سراسر جهان پایگاه داده ایجاد کرده‌است که در آدرس زیر[10] موجود است. درحال‌حاضر مواد مرجع نانومقیاس‌شدهٔ موجود شامل، دی‌اکسید تیتانیم، سیلیکای کلوئیدی و نانولوله‌های کربنی

1- Ion shedding
2- Tangential flow filtration
3- Reproducibility
4- Reliability
5- Representative test materials
6- OECD working party on manufactured nanomaterials
7- European Commission Joint Research Centre
8- National Institute of Standards and Technology
9- Joint Research Centre of the European Commission
10- http://www.nano-refmat.bam.de/en/

تک‌دیواره و طلا است. گزارش شده‌است که تعدادی مواد مرجع جدید توسط این سازمان‌ها، همچون منابع تجاری دردست توسعه است اما به‌جای توسعهٔ مواد مرجع برای محک‌زدن پاسخ‌های زیست‌شناختی، تمرکز اصلی روی مواد مرجع نانومقیاس برای کالیبراسیون دستگاهی است.

لازم به‌ذکر است که استفاده از مواد مرجع استاندارد و مناسب (SRM)[1] تنها در چارچوب پروتکل‌های استاندارد برای اندازه‌شناسی[2] اندازه و شکل اهمیت دارد. پروتکل‌ها باید در میان طیفی از فناوری‌های تصویری کار کنند و نیاز به قطعیت آماری بالا با حداقل سوگیری (اوریبی)[3] انسانی دارند. علاوه‌براین، مواد مرجع می‌توانند همچنین به‌عنوان مرجع داخلی و/یا خارجی مورد استفاده قرار گیرند. برای مثال، استانداردهای خارجی را می‌توان برای کالیبره‌کردن مقیاس طولی ابزارهای تصویربرداری برای تصویربرداری بعدی مورد استفاده قرارداد، درحالی‌که استانداردهای داخلی اجازه وارد کردن یک استاندارد اندازه در موارد ناشناخته را می‌دهند.

توسعهٔ یک مجموعه از مواد مرجع عمومی شامل اجماع‌نظر برای نانوذرات کنترل مثبت و منفی مناسب برای سامانه‌های آزمون مختلف به‌عنوان یک نیاز مهم در ارزیابی ریسک نانومواد تشخیص داده‌شده‌اند [65]. با وجود اینکه نیاز به چنین مواد مرجع به‌خوبی شناخته شده‌است، اما به دلیل مشکلات کاربردی از جمله عدم اجماع‌نظر در مورد مواد و خواص برای مشخصه‌یابی، چالش‌های فنّی قابل‌توجه و عوامل اقتصادی، همچنان توسعه را با کندی روبرو کرده است [64] [65] [66].

۶ آماده‌سازی نمونه

۶-۱ ملاحظات کلی

آماده‌سازی نمونه، مرحلهٔ مهم در مشخصه‌یابی و آزمون زیست‌شناختی افزاره‌های پزشکی و موادی است که در ساخت آنها به‌کار رفته‌است. ملاحظات مهم آزمون افزاره‌های پزشکی در محصول نهایی، شامل نمونه‌برداری از افزارهٔ نماینده، آماده‌سازی عصاره‌های محصول، انبارش و پایداری مادهٔ آزمون آماده‌سازی‌شده است. راهنمایی کلی این مباحث در استاندارد ISO-10993-12 ارائه شده‌است.

ممکن است آماده‌سازی نمونهٔ افزاره‌های پزشکی که حاوی یا متشکل از نانومواد هستند (برای مثال، استفاده از پراکنش‌های نانوشیء به‌جای عصاره‌ها) نیاز به ملاحظات اختصاصی داشته باشد.

یادآوری- راهنمای اختصاصی نانومواد در آماده‌سازی نمونه و روش‌های تهیهٔ دُز در استاندارد ISO/TR 16196 موجود است.

۶-۲ ملاحظات اختصاصی برای مواد نانوساختاریافته

استاندارد ISO 10993-12 برای افزاره‌های پزشکی حاوی نانوساختارهای داخلی و/یا ساختارهای نانومقیاس سطح، قابل‌استفاده است. سطح نانوساختاریافته، مساحت سطح کل افزاره را افزایش می‌دهد. اگر مساحت سطح در ابعاد

1- Standard reference materials
2- Metrology
3- Bias

خارجی اندازه‌گیری شود، استفاده از مساحت سطوح توصیه‌شده در استاندارد ISO 10993-12 موجب می‌شود مساحت سطح واقعی افزاره‌های نانوساختاریافته کمتر از حد واقعی برآورد شود. بااین‌حال، این موضوع باید به‌عنوان یک رویکرد محافظه‌کارانه در فرایند عصاره‌گیری در مرحلهٔ آماده‌سازی نمونه درنظر گرفته شود، اما باید توجه داشت که بیمار با سطح کامل در مواجهه است.

در استاندارد ISO 10993-12 بیان شده‌است که برای تعیین حجم حلّال موردنیاز برای عصاره‌گیری، از مساحت سطح استاندارد استفاده شود و اینکه این مساحت شامل مجموع مساحت هر دو طرف نمونه است و شامل بی‌نظمی‌های نامعین سطح نمی‌شود. برای مواد با سطوح نانوساختاریافته از یک رویکرد مشابه استفاده می‌شود.

مطابق استاندارد ISO 10993-12 اگر افزاره‌ها شرایط حین استفادهٔ بالینی را شبیه‌سازی کنند یا منجر به میزانی از پتانسیل مخاطره شوند، می‌توان از سایر نسبت‌های مساحت –سطح–به–حجم استخراج مواد نانومتخلخل استفاده‌کرد.

فنون عصاره‌گیری که در استاندارد ISO 10993-12 شرح داده‌شده‌اند، ممکن است به‌علت تثبیت در ماتریکس یا روی سطح موجب رهایش نانومواد تعبیه‌شده و/ یا نانومواد روی سطح ماده نشود و تنها زمانی که پیوند نسبتاً ضعیفی در عصارهٔ سطح نانواشیاء وجود داشته باشد، می‌توان این انتظار را داشت.

۶-۳ ملاحظات اختصاصی نانواشیاء

در مورد نانواشیاء، شاید برخی از الزامات آماده‌سازی نمونه در استاندارد ISO 10993-12 قابل‌استفاده نباشد و ممکن است لازم باشد که جنبه‌های دیگری (برای مثال، انبوهگی/کلوخگی ذرات) درنظر گرفته شود. برای مثال، ممکن است که با استفاده از عصاره‌ها، فقط اثرات باقی‌مانده‌ها/ آلاینده‌ها ارزشیابی شوند. علاوه‌براین، در بیشتر روش‌های ارزشیابی زیست‌شناختی و ارزیابی ریسک نانومواد، اندازهٔ نانومقیاس اجازه می‌دهد که نانومواد در مایع پراکنده‌شوند. ممکن است نانواشیاء در مایعی پراکنش‌یابند که اجازه می‌دهد بیشتر ارزشیابی‌های زیست‌شناختی انجام‌شوند، بدین‌ترتیب امکان ارزیابی مستقیم ریسک نانوشیء را فراهم‌می‌کنند. مطابق استاندارد ISO 10993-12 به‌طور معمول برای عصاره‌گیری، محیط‌های قطبی و غیرقطبی درنظر گرفته می‌شوند. هرچند، برای پراکنش یک نانوشیء باید محیطی انتخاب شود که با مصرف بالینی و قابلیت پراکندگی مرتبط باشد. پراکنش بهینه‌سازی[1] می‌شود تا نانوشیء در سامانهٔ آزمون اختصاصی جابه‌جا شود و بیشتر پراکنش‌های نانویی در محلول قطبی آماده و استفاده شوند.

آماده‌سازی نمونه به علت اندازهٔ کوچک و مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی بالقوه تغییریافتهٔ نانواشیاء در مقایسه با آزمون مواد شیمیایی یا مواد توده (غیرنانومقیاس) چالش‌های بسیار زیادی دارد. عوامل دخیل شامل این موارد است: خواص سطح نانواشیاء که واکنش‌پذیری آنها را افزایش می‌دهد، تشکیل اشیاء انبوهه‌شده/کلوخه‌شده، تبدیل نانواشیاء در پراکنش‌ها از طریق هیدراسیون، انحلال جزئی یا سایر فرایندها و تأثیر بالقوه شدید مقدار کم آلاینده‌ها روی خواص فیزیکوشیمیایی و خواص توکسیکولوژی نانواشیاء. همراه با سایر نمونه‌های آزمون، این احتمال وجود دارد که نانواشیاء جذب سطوح ظرف شوند. همچنین، سرعت تحویل به سلول‌های کشت می‌تواند تحت‌تأثیر نفوذ و ته‌شینی گرانشی

1- Optimized

قرارگیرد (به زیربند ۹-۲ مراجعه شود). این مسئله اهمیت دارد که غلظت‌های تعداد[1] نانواشیاء مورداستفاده در نمونه‌های آزمون تأیید شود.

پروتکل‌های آماده‌سازی نمونه باید همزمان با روش‌های اندازه‌شناسی توسعه‌یابند (جدول ۲). انبوهه‌شدن و کلوخه‌شدن، قابلیت تعیین تغییرات کوچک در توزیع اندازهٔ ذره با توان‌عملیاتی بالای اندازه‌شناسی[2] خودکار را محدود می‌کنند. اندازه‌شناسی جمعیت‌های بزرگ ذرات یا الیاف، در همان زمان اجازهٔ تعیین میزان انبوهه‌شدن و کلوخه‌شدن را می‌دهد. آگاهی از این مسائل در توسعه و تدوین پروتکل‌های آماده‌سازی قابل‌اعتماد برای نانواشیاء، افزاره‌هایی که حاوی نانواشیاء هستند یا افزاره‌هایی که نانواشیاء را ایجاد یا رها می‌کنند، ضروری است. حل این مسائل در مقایسه با افزاره‌هایی که حاوی مواد رایج هستند می‌تواند به تلاش بسیار زیادی نیاز داشته باشند تا به سمت توسعهٔ راهبردهای آماده‌سازی و جابه‌جایی[3] نمونه معطوف شوند.

یک نکتهٔ مهم در آماده‌سازی نمونهٔ نانومواد، تمایز بین انحلال‌پذیری و قابلیت‌پراکنش آزمونه یا اجزاء آزمونه است. برخی نانوذرات به‌کندی یا تا حدودی قابل‌حل هستند. تمایز بین انحلال‌پذیری و قابلیت‌پراکنش مهم است، زیرا پراکنش مادهٔ ذره‌ای می‌تواند پاسخی متفاوت از سمیت مولکولی یا عنصری پیش‌بینی‌شده از ترکیب‌بندی شیمیایی ایجاد کند [67]. یک نانوشیء که محلول است یا تا حدی/یا به‌کندی در محیط زیستی قابل‌حل است، ممکن است به‌شکل مولکولی به سامانهٔ آزمون ارائه شود. احتمالاً نانومواد نامحلول یا بسیار کم‌محلول در سامانهٔ آزمون به‌صورت پراکنش نانواشیاء ارائه می‌شوند. برای اینکه تعیین شود آیا یک نانوشیء خاص به‌طور کامل پراکنده شده، تا حدی حل‌شده (برای مثال در مورد برخی از فلزات) یا تحت شرایط ویژهٔ آزمایشگاهی به‌طور کامل حل شده است، در عمل می‌تواند به یک آنالیز دقیق نیاز باشد. این نانواشیاءهای حل‌شده می‌توانند پاسخی شبیه مواد غیرنانومقیاس حل‌شده نشان دهند. هنگام استفاده، علاوه‌بر انحلال‌پذیری به تنهایی، سرعت فرایند حل‌شدن نیز باید درنظر گرفته شود.

نانواشیاء به علت خواص سطح منحصربه‌فردشان می‌توانند نسبت به روش‌های مورداستفاده در آماده‌سازی نمونه بسیار حساس باشند. پراکنش نانواشیاء تحت‌تأثیر برهم‌کنش‌های بین نانواشیاء و برهم‌کنش‌های نانواشیاء با محیط‌شان است. نانواشیاء پراکنده‌شده لزوماً فقط به شکل اولیه نیستند. اشیاء ثانویه به شکل‌های انبوهه (اشیاء متشکل از پیوندهای قوی یا اشیاء جوش‌خورده) و کلوخه (مجموعه‌ای از اشیاء با پیوندهای ضعیف، انبوهه‌ها یا مخلوط‌هایی از هر دوتا) می‌توانند به شکل محلول، پودری و شکل‌های هواسُلی از نانواشیاء تشکیل شوند مگر اینکه از طریق بار سطح یا اثرات استری[4] تثبیت شوند. درنتیجه، حالت پراکنش و توزیع اندازهٔ ذرهٔ نانواشیاء در یک نمونه می‌تواند با گذشت زمان تغییر کنند. این رفتار در آماده‌سازی عصاره‌ها و/ یا پراکنش‌های استوک[5] و دُزی که تغییرات اندکی در pH، قدرت یونی یا وجود اجزاء مولکولی می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی پراکنش نانوشیء را تغییر دهد. به همین دلیل، درطی ارزشیابی زیست‌شناختی، تعیین پایداری مادهٔ مورد آزمون عامل در کسب نتایج مشخص و تجدیدپذیر است.

---

1 - Number concentrations
2 - High throughput automated metrology
3 - Handling
4 - Steric
5 - Stock

آماده‌سازی نمونهٔ نانواشیاء می‌تواند شامل مشخصه‌یابی ماده به محض تولید یا عرضه‌شده توسط فروشنده[1] و آماده‌سازی محلول‌های استوک و دُزی برای مطالعات حیوانی و برون‌تن باشد. جزئیات آماده‌سازی می‌تواند بسته به مسیر دُز و روش تحویل متفاوت باشد. موضوعات متداول در آماده‌سازی نمونه و تجویز شامل موارد زیر است:

- شناسایی، انبارش و پایداری مواد آزمون شامل تغییرپذیری بچ به بچ؛
- ترکیب‌بندی شیمیایی محیط آزمون؛
- انتخاب معیار دُز مناسب؛
- مشخصه‌یابی نمونه‌های آماده‌شدهٔ حاصل از پراکنش‌های محلول استوک قبل از تجویز دُز.

اطلاعات بیشتر درمورد این موضوعات در زیر ارائه می‌شود. پروتکل‌ها و منطق آماده‌سازی نمونه باید با دقت مستند شود تا درصورت لزوم تکرار نمونه‌های آزمون را امکان‌پذیر کند.

۴-۶ شناسایی، انبارش و پایداری نانومواد استوک

تعدادی از عواملی که باید در پراکنش و انبارش آماده‌سازی‌های نانوماده موردتوجه قرار گیرند در زیر ، ارائه می‌شود:

- پراکنش‌های استوک باید مطابق فرایندهای به‌کار رفته در آماده‌سازی نانومواد در محصول نهایی تهیه شوند. در ارزشیابی زیست‌شناختی جهت آماده‌سازی پراکنش‌ها ممکن است روش‌های آماده‌سازی دیگری مناسب باشند. پراکنش‌های استوک به‌طور مطلوب از طریق اندازهٔ یکنواخت شیء و ضریب بس‌پراکندگی قابل‌پیش‌بینی مشخصه‌یابی می‌شوند [68].
- روش‌های مورداستفاده در پراکنش نانواشیاء براساس کاربرد آنها است و شامل سونیک‌کردن[2]، هم‌زدن، استفاده از حلّال‌ها و استفاده از عوامل پایدارکننده مانند مواد سطح‌فعال می‌باشند. برای مثال، گروه‌های شیمیایی[3] مانند پلی‌وینیل‌پیرولیدون، سیترات یا تانیک اسید می‌توانند روی نانواشیاء قرار داده‌شوند تا از تشکیل انبوهگی/ کلوخگی یا افزایش پراکنش در محلول جلوگیری کنند. پلیمرهای با زنجیرهٔ کوچک مانند پلی‌اتیلن گلیکول می‌توانند با نانواشیاء مزدوج شوند[4] تا از شناسایی از طریق سامانهٔ فاگوسیت تک‌هسته‌ای (MPS)[5] جلوگیری شده و بنابراین زمان گردش درون بدن افزایش یابد [69][70]. برای هدف قراردادن برخی سلول‌ها یا بافت‌ها درون بدن، پروتئین‌ها یا کربوهیدرات‌ها می‌توانند به نانواشیاء اضافه شوند. یک فرد باید از موادشیمیایی/ پوشش‌هایی که به نانومواد موردنظر متصل می‌شوند آگاهی داشته باشد، زیرا اینها کلید شناسایی اثرات زیست‌شناختی هستند و همچنین می‌توانند منبع آلودگی باشند.
- روش‌های اجرایی مورداستفاده در پراکنده‌کردن نانواشیاء باید بادقت انتخاب شوند زیرا آنها پتانسیل تغییر مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی و سمیت نانواشیاء را دارند. سازوکارهای احتمالی برای سمیت تغییریافته شامل جزءجزءشدن نانواشیاء از طریق آسیاکاری و تغییر خواص سطح با استفاده از عوامل پراکنده‌ساز، دفع

1 - As-produced or vendor-supplied Material
2 - Sonication
3 - Chemical moieties
4 - Be conjugated
5 - Momonuclear phagocyte system

پوشش‌های سطح و تغییرات در حالت اکسایش و سایر موارد است. روش‌های پراکنش برای چنین اثراتی باید مورد به مورد ارزشیابی شوند. هنگامی که شواهدی وجود دارد مبنی بر اینکه سمیت فراورده نانوماده و/ یا نانوشیء تغییر می‌یابد، اثرات مشاهده‌شده در حین ارزشیابی روش پراکنش باید کمّی‌سازی شوند.

- توصیه می‌شود نانومواد با روش‌اجرایی کنترل‌شده و مناسب تعریف‌شده انبار شوند. ملاحظات کلی شامل اجتناب از افزایش دما، نور و رطوبت می‌باشد.
- توصیه می‌شود که در روش‌های اجرایی انبارش و جابجایی، به واکنش‌پذیری نانوماده توجه شود.
- توصیه می‌شود نانومواد به‌کار رفته در افزاره‌های پزشکی از نظر وجود آلاینده‌ها و ناخالصی‌ها آنالیز شوند. وجود مقدار کم آلاینده‌ها یا ناخالصی‌ها می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی بر روی خواص فیزیکوشیمیایی و توکسیکولوژی آماده‌سازی‌های نانوماده تأثیر بگذارد و می‌توانند اندازه‌گیری‌های آنالیزی و آزمایشی را مغشوش کنند. نمونه‌هایی از آلاینده‌های موجود در نانومواد شامل اندوتوکسین (درون‌زهرابه‌ای)[1] باکتریایی، مواد سطح‌فعال، حلّال‌های باقی‌مانده، فلزات و کاتالیست‌ها هستند. آلودگی می‌تواند در حین ساخت، جابجایی و پراکنش نانومواد رخ دهد؛ بنابراین ممکن است لازم باشد آماده‌سازی‌های نانوماده از جهت آلودگی هنگام فرایند آماده‌سازی نمونه، در بیشتر از یک مرحله آنالیز شوند.
- توصیه می‌شود پایداری آماده‌سازی‌های نانوماده ارزشیابی شود تا مشخص شود آیا:
  - نانوماده در طول زمان حل، تخریب یا استحاله می‌شوند (به بند ۷ مراجعه شود)؛ و
  - توزیع اندازهٔ ذره یا بار سطح با گذشت زمان تغییر می‌کند. درصورت لزوم محلول‌های استوک باید مجدداً ساخته و دوباره مشخصه‌یابی شوند.

۶-۵ توصیف ترکیب‌بندی شیمیایی پراکنش‌های استوک و دُزی

پراکنش‌های نانواشیائی که در مطالعات ارزشیابی زیست‌شناختی استفاده می‌شوند باید با شرایط فیزیولوژیک سازگار باشند. به‌عنوان مثال، محلول‌های دُزی برای سنجش‌های سلولی پستانداران در شرایط برون‌تن باید ایزوتونیک باشند و در pH =۷٫۴ تنظیم شوند و در حضور یون‌های دوظرفیتی و مخلوط‌های پروتئینی قابل‌استفاده باشند [71]. ترکیب‌بندی شیمیایی مورداستفاده برای ایجاد شرایط فیزیولوژیک می‌تواند اثرات ناخواسته‌ای روی مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی نانومواد از قبیل میزان تشکیل انبوهگی و/ یا کلوخگی نانوشیء داشته‌باشد. همچنین نانواشیاء، خود می‌توانند بر محیط کشت مورداستفاده اثر بگذارند. مشخص و مستندکردن ترکیب‌بندی محیط آزمون و محلول‌های دُزی برای اطمینان از تجدیدپذیری شرایط آزمایش اهمیت دارد. پارامترهایی که در زیر ارایه شده‌است، فهرست اولیه برای مشخصه‌یابی محیط‌ها و محلول‌های دُزی مورداستفاده در آزمون‌های برون‌تن و درون‌تن هستند [68]:

– قدرت یونی؛
– غلظت کلسیم و منیزیم و آنیون مورداستفاده به‌عنوان منبع (برای مثال، $MgSO_4$ یا $MgCl_2$)؛
– pH و ترکیب‌بندی سامانه بافری pH؛
– مواد افزودنی آلی (برای مثال سرم، آلبومین سرم گاوی، آنتی بیوتیک‌ها)؛
– شناسایی و غلظت عوامل پراکنده‌ساز.

1- Endotoxin

۶-۶ مشخصه‌یابی پراکنش‌های استوک

روش‌های مورداستفاده برای تهیه پراکنش‌های استوک باید به‌طور دقیق ثبت شوند تا قابلیت تجدیدپذیری داشته باشند. پارامترهایی که در زیر ارایه شده‌است، فهرست اولیه برای مشخصه‌یابی پراکنش‌های استوک را تشکیل می‌دهند [68]:

- اطلاعات دریافت‌شده از سازنده؛
- داده‌های آنالیزی برای خواص فیزیکوشیمیایی همانطورکه در بند ۵ اشاره شده؛
- غلظت جرمی اندازه‌گیری‌شده در پراکنش استوک؛ (همچنین به‌عنوان مساحت سطح و غلظت عددی بیان می‌شود)؛
- در مورد نانومواد فلزی، غلظت یون(ها) فلزی محلول اندازه‌گیری‌شده؛
- شناسایی و (درصورت امکان) غلظت‌های اندازه‌گیری‌شده ناخالصی‌ها و آلاینده‌ها؛
- جزئیات آماده‌سازی از قبیل شکل، حجم و نوع مادهٔ ظرف مورداستفاده برای تهیهٔ پراکنش استوک؛
- پایداری (عمر انبارداری)[1] پراکنش‌های استوک.

مشخصه‌یابی پارامترهای دیگر ممکن است مورد به مورد نیاز باشد.

مراحل انجام‌شده برای جلوگیری از آلودگی (به‌عنوان مثال استفاده از آب فراخالص و واکنشگرها) باید شرح داده‌شوند. هنگامی که آماده‌سازی‌ها با اولتراسونیک کردن تعلیقه‌ها تهیه می‌شوند باید احتمال ایجاد آلودگی ناشی از خراب شدن نوک پروب یا سطح ظرف درنظر گرفته شود. همچنین، آلودگی از منابع دیگر باید درنظر گرفته شود.

راهنمایی در مورد تهیّه و مشخصه‌یابی نانومواد برای آزمون سمیت استنشاقی در استانداردهای ISO 10801 و ISO 10808 ارائه شده‌است.

۶-۷ مشخصه‌یابی محلول های دُزی تهیه‌شده از پراکنش‌های استوک

توصیه می‌شود روش‌های مورداستفاده برای تهیهٔ پراکنش‌های دُزی به‌طور دقیق ثبت شوند تا قابلیت تجدیدپذیری داشته‌باشند و به تفسیر نتایج مطالعه کمک کنند. پارامترهایی که در زیر ارایه شده‌است، فهرست اولیه برای مشخصه‌یابی محلول‌های دُزی قبل از تجویز به حیوانات آزمون یا سامانه‌های برون‌تن را تشکیل می‌دهند [68]:

- پارامترهای پیشنهادی برای مشخصه‌یابی پراکنش‌های استوک که در زیربندهای ۶-۵ و ۶-۶ شرح داده‌شده‌اند؛
- توصیف محیط مورداستفاده برای تهیهٔ محلول دُزی/ نمونه و حجم تهیه‌شده؛
- pH محلول دُزی/ نمونه و توصیف pH سامانه بافری؛
- توصیف روش(های) اجرایی پراکنش به‌کار گرفته‌شده، از قبیل جزئیاتی مانند زمان سونیک کردن/ ورتکس و /یا انرژی ورودی؛
- جزئیات تجویز دُز/ نمونه از قبیل حجم تجویزشده، روش‌اجرایی مخلوط‌کردن (برای آزمون‌های برون‌تن)، مدت زمان سپری‌شده از زمان فراصوت یا مخلوط‌کردن نمونهٔ پراکنش؛

1- Shelf life

- جزئیات هرگونه آنالیز مجدد نمونه‌های فرعی به‌دست‌آمده از پراکنش‌های استوک یا نمونه/دُزی برای تأییدکردن خواص در پایان دُزدهی یا پس از اصلاحات در محلول دُزی.

اقدامات انجام‌شده برای بهبود پراکنش و/ یا قابلیت پراکندگی محلول دُزی باید با جزئیات شرح داده و توجیه شوند.

پیشنهادات دقیق برای تهیه پراکنش‌های دُزی نانوشیء برای مطالعات توکسیکولوژی خوراکی، استنشاقی و پوستی در استاندارد ISO/TR 16196 و مرجع ارائه شده‌اند [68].

۸-۶ دُزسنجی[1]

برای مطالعات توکسیکولوژی مقادیر دُزی معمولاً براساس غلظت جرمی بیان می‌شوند. بااین‌حال، نانومواد ویژگی‌های متعددی دارند که می‌تواند خواص توکسیکولوژی آنها را تحت‌تأثیر قراردهد. به‌طور کلی پذیرفته شده‌است که برای مشخصه‌یابی کامل دُز نانومواد، علاوه‌بر غلظت جرمی از پارامترهای دیگری مانند مساحت سطح و غلظت عددی ذره باید استفاده شود. جزئیات دقیق مشخصه‌یابی باید به‌نحوی ارائه شود تا کاربر نهایی بتواند معیارهای مختلف دُزسنجی از جمله غلظت جرمی، تعداد ذرات و مساحت سطح را به یکدیگر تبدیل کند [72]. بااین‌وجود، همیشه اندازه‌گیری دقیق مساحت سطح و/ یا غلظت‌های عددی، مخصوصاً وقتی که حالت کلوخگی ایجاد می‌شود، امکان‌پذیر نیست. علاوه‌بر این، درحال‌حاضر اندازه‌گیری‌های مساحت سطح محدود به اندازه‌گیری‌های نانومواد پودری شکل است، درحالی‌که چنین اندازه‌گیری‌هایی برای نانوپراکنش‌های مایع هنوز دردست توسعه هستند. مگر اینکه بتوان مستقیماً غلظت عددی ذره یا غلظت مساحت سطح را اندازه‌گیری کرد که دراین‌صورت احتمالاً آنها عدم قطعیت‌های بیشتری نسبت به غلظت جرمی دارند.

شرایطی وجود دارد که غلظت جرمی در توصیف دُز نانوماده مناسب است. برای مثال، وقتی از طریق یون‌های رهاشده از نانواشیاء، سمیت ایجاد می‌شود، مناسب‌ترین دُزسنجی می‌تواند جرم یون‌های محلول باشد. همچنین، ممکن است برای مواجههٔ استنشاقی (ذرات هواسُل‌شده در هوا) از سایر دُزسنجی‌ها استفاده شود.

در مطالعات برون‌تن نانومواد باید هنگام تعیین دُز مرتبط توکسیکولوژی، احتمال وجود کسری از نهشت[2] درنظر گرفته شود [72] [74] [75]. تماس نانواشیاء کوچک (به‌عنوان مثال قطر هیدرودینامیکی کمتر از۴۰ نانومتر) با لایه‌های سلول کشت‌شده، دردرجهٔ اول از طریق نیروهای نفوذی و همرفتی[3] تعیین می‌شود. نانواشیاء بزرگتر و انبوهه‌های نانواشیاء تشکیل‌شده در محیط کشت سلول به‌دلیل تأثیر اضافی نیروهای رسوب با سرعت بیشتری ته‌نشین می‌شوند. این عوامل و نیز برهم‌کنش با پروتئین‌ها و سایر ترکیبات محیط کشت، می‌توانند بر تعداد نانواشیایی که درتماس مستقیم با سلول‌های کشت هستند، تأثیر بگذارند.

پارامترهایی که بر سازوکارهای نهشت تأثیر می‌گذارند (مانند تراکم و توزیع اندازهٔ دومتغیره (طولی و عرضی) توزیع اندازه)، غلظتی که به سطح لایهٔ سلولی (دُز نهشت‌شده) می‌رسد و مقدار نانومواد‌های برداشت‌شده توسط سلول‌ها (دُز

1- Dose metrics
2- Fractional deposition
3- Convection

سلولی) می‌توانند در تفسیر پاسخ‌های زیست‌شناختی مشاهده‌شده اطلاعات بیشتری بدهند [72] [76] [118]. لازم به ذکر است که درعمل ممکن است اندازه‌گیری نهشت و دریافت سلولی مشکل باشد.

۶-۹ ملاحظات بیشتر

۶-۹-۱ اندوتوکسین

اندوتوکسین باکتریایی یا لیپوپلی‌ساکارید (LPS)[1] ترکیب دیوارهٔ سلولی باکتری‌های گرم منفی است که تاحد زیادی از نوع تب‌زا هستند. اندوتوکسین همه‌جا درمحیط حضور دارد و به‌عنوان یک آلایندهٔ شایع نانومواد شناخته شده‌است [77].

حضور اندوتوکسین به‌عنوان یک آلاینده در نانومواد می‌تواند آزمون‌های ارزشیابی زیست‌شناختی را مغشوش کند و منجر به نتیجه‌گیری‌های نادرست در مورد زیست‌سازگاری شود [77] [78] [79]. بنابراین، ارزشیابی آلودگی اندوتوکسین مهم است که معمولاً در مرحلهٔ محلول استوک و/ یا مادهٔ منبع انجام می‌شود.

سنجش‌های کمّی‌سازی قدیمی اندوتوکسین ممکن است برای نانومواد به‌طور قابل‌اعتماد عمل نکنند چون خواص آنها می‌تواند با معرف‌ها و/یا روش‌های تشخیصی مورداستفاده در این سنجش‌ها تداخل کند[80] [81]. به‌عنوان مثال در سنجش (LAL)[2] که معمولاً استفاده می‌شود، نانواشیاء می‌توانند بر واکنش‌پذیری اندوتوکسین، واکنش LAL یا شناسایی محصولات حاصل از واکنش، اثر کنند [81]. چنین تداخلی می‌تواند موجب تخمین بیش از حد یا کمتراز حد اندوتوکسین در نمونه شود. علاوه‌براین، می‌توان برای رد وجود اندوتوکسین، وجود و ترکیب‌بندی فسفولیپیدها را در محلول آزمون تعیین کرد.

انتخاب روش مناسب برای ارزیابی آلودگی اندوتوکسین در افزاره‌های پزشکی باید به‌صورت مورد به مورد انجام شود. پروتکل‌های تطابق‌یافتهٔ سنجش LAL برای استفاده با نانومواد موجود هستند. یک درخت تصمیم‌گیری برای کمک به انتخاب قالب مناسب LAL برای یک نانومادهٔ ویژه پیشنهاد شده‌است و برای درک موضوعات بالقوهٔ مرتبط با آزمون انواع مختلف نانومواد مفید است [83]. در مراجع [82] و [83] روش‌های جایگزین و مزیت‌ها و معایب آنها در مقایسه با سنجش LAL با جزئیات در مقالات بررسی می‌شوند.

استاندارد ISO 29701 با استفاده از واکنشگر LAL، آزمونی را برای ارزشیابی نانومواد درنظر گرفته‌شده در سامانه‌های آزمون زیست‌شناختی سلولی برون‌تن، شرح می‌دهد. این آزمون برای استفاده با نمونه‌های نانوشیء پراکنده‌شده در محیط‌های آبی مانند آب، سرم یا محیط واکنش مناسب است و در چنین محیط‌هایی برای مدت مناسب با نانواشیاء در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرم‌خانه‌گزاری[3] می‌شوند. استاندارد ISO 29701 محدود به آزمون نمونه‌ها در سامانه‌های برون‌تن است، اما می‌توان این روش‌ها را با نانواشیاء تطبیق داده تا از طریق مسیرهای تزریقی به حیوانات تجویز کرد.

1- Lipopolysaccharide
2- Limulus amebocyte lysate
3- Incubation

روش دیگر، آزمون فعال‌سازی مونوسیت (MAT)[1] است که روش کمّی صحه‌گذاری شده‌ای است و از سازوکار طبیعی تب در انسان تبعیت می‌کند و می‌تواند برای آزمون اندوتوکسین‌های مرتبط با نانومواد، همچنین سایر تب‌زاهای زیست‌شناختی (به‌عنوان مثال تب‌زاهای مخمری، ویروسی و انگلی) استفاده شوند [84] [85] [86].

با اینکه برای حذف اندوتوکسین از نانواشیاء روش‌هایی وجود دارد، روش‌های اجرایی می‌توانند منجربه تشکیل کلوخگی یا سایر تغییرات نامطلوب شوند. یک رویکرد پیشنهادی برای کنترل آلودگی اندوتوکسین توسعهٔ روش‌هایی است که از آلودگی در هنگام ساخت نانومواد جلوگیری می‌کند [77].

توجه به این نکته مهم است که در بیشتر روش‌های سترون‌کردن، اندوتوکسین غیرفعال نمی‌شود [82]. بااین حال می‌توان اندوتوکسین را حداقل مدت ۳۰ دقیقه با حرارت خشک در دمای بیشتر یا برابر ۲۵۰ درجهٔ سلسیوس غیرفعال کرد (فارماکوپهٔ اروپا شمارهٔ ۸، بخش۲-۶-۱۴). همچنین فارماکوپه اروپا شمارهٔ ۸ زیربند ۵-۱-۲ نشان می‌دهد که حرارت خشک در دماهای بالاتر از ۲۲۰ درجهٔ سلسیوس اغلب برای سترون‌کردن و تب‌زدایی[2] ظروف شیشه‌ای استفاده می‌شود. در این حالت، می‌توان از نشان دادن کاهش $\log - 3 \geq$ در اندوتوکسین باکتریایی مقاوم به حرارت به‌عنوان یک جایگزین برای شاخص‌های زیست‌شناختی استفاده کرد. این احتمال وجود دارد که روش‌های غیرفعال‌سازی اندوتوکسین که در بالا ذکر شدند موجب تغییر یا تخریب نانومواد شوند.

۶-۹-۲ سترون‌کردن

سترون‌کردن موضوع مهمی در ارزشیابی زیست‌شناختی پیش-بالینی[3] افزاره‌های پزشکی و استفاده از محصول نهایی‌شده است.

- در هنگام آزمون، افزودن پراکنش‌های نانوشیء غیرسترونی به محیط‌های حاوی پروتئین و مواد مغذی می‌تواند موجب رشد ریزاندام‌گان[4] آلوده‌کننده مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها شوند. سترون‌کردن آماده‌سازی‌های نانوشیئی که برای جلوگیری از آلودگی میکروبی لازم است می‌تواند با سامانه‌های آزمون تداخل کرده و موجب نتایج اشتباه آزمون شوند.

- سترون‌کردن محصول نهایی اغلب برای حذف آلودگی میکروبی احتمالی ضروری است.

روش‌های موجود برای سترون‌کردن نانومواد در مرجع [87] و [88] عنوان شده‌اند که شامل موارد زیر هستند:

- اتوکلاو کردن؛
- فیلتراسیون سترونی؛
- پرتوافکنی گاما؛
- اکسید اتیلن.

---

1 - Monocyte activation test
2 - Depyrogenation
3 - Pre-clinical
4 - Microorganisms

فشار هیدرواستاتیک بالا به‌عنوان روش دیگری برای سترون‌کردن پیشنهاد شده‌است [87]، اما برای افزایش قابلیت این روش در حذف اسپورهای باکتریایی، لازم است برای بهبود روش اقداماتی انجام شود.

روش‌های معمول مورداستفاده برای سترون‌کردن که در بالا فهرست شده‌اند، توانایی تغییر یا تخریب نانومواد را دارند. تغییرات بالقوهٔ ناشی از سترون‌کردن ماده محور[1] هستند و می‌توانند شامل موارد زیر باشند:

- تجزیه؛
- تغییرات در اندازه و شکل؛
- حالت کلوخگی؛
- نوع و غلظت ناخالصی‌ها؛
- پروفایل تخریب؛
- پایداری؛
- پروفایل زیست‌سازگاری ماده؛
- و/یا رفتار عملکردی.

به‌عنوان مثال، سترون‌کردن با حرارت از طریق اتوکلاو می‌تواند خواص مکانیکی پلیمرهایی که دمای انتقال شیشه‌ایی‌شدن و یا / نقطه ذوب کمتر از ۱۲۰ درجهٔ سلسیوس را دارند، تغییر دهد [87]. سترون‌کردن با پرتو گاما یا اکسید اتیلن از جمله روش‌هایی هستند که برای مواد حساس به حرارت به‌کار می‌روند و می‌توانند رادیکال‌های آزاد ایجاد کنند که موجب تولید مواد سمی تخریب‌کننده می‌شوند [88]. مشخصه‌یابی نانومواد یا محصولات حاوی نانوماده باید پس از سترون‌کردن انجام شود تا هرگونه تغییراتی که ناشی از فرایند سترون‌کردن است درنظر گرفته شود.

فیلتراسیون سترونی، یک روش جایگزین برای نانومواد حساس به حرارت و موادشیمیایی است [87] که مستلزم فیلتراسیون از طریق فیلترهای غشایی دارای منافذ با قطر ۰٫۲۲ میکرومتر (۲۲۰ نانومتر) است. به این ترتیب، برای نانومواد حاوی کسرهایی با ذرّهٔ دارای قطر تقریباً ۲۲۰ نانومتر یا بیشتر، قابل استفاده نیست. به‌طور کلی نمی‌توان از فیلتراسیون سترونی برای سترون‌کردن تعلیقه‌هایی با گران‌روی بالا[2] استفاده کرد. همچنین نانواشیاء می‌توانند به الیاف فیلتر جذب یا بچسبند، بنابراین موجب کاهش غلظت نانواشیاء می‌شوند.

از آنجایی که احتمالاً اثرات سترون‌کردن نانوماده محور می‌باشد، لازم است که تأثیرات سترون‌کردن روی خواص نانوماده مورد به مورد ارزشیابی شوند. ممکن است آزمودن چند روش لازم باشد تا یک حالت مطلوب برای سترون‌کردن یک نانومادهٔ خاص انتخاب شود.

تغییرات ناشی از سترون‌کردن یک نانوماده می‌تواند اثرات طولانی‌مدت داشته باشد. برای مثال، رادیکال‌های آزاد تشکیل‌شده در طی سترون‌کردن با استفاده از پرتوافکنی گاما یا اکسید اتیلن می‌تواند موقتی باشد، اما همچنین می‌تواند واکنش‌های آبشاری را ایجاد کند که منجر به تشکیل مواد تخریب کننده و/یا تغییر در کارکرد محصول شود.

---

1 - Material-specific

2 - Highly viscous suspensions

با این‌حال، همانطور که برای موادزیستی مبتنی‌بر آلژینات[1] نشان داده‌شده است، افزودن پاک‌کننده‌های رادیکال آزاد (به‌عنوان مثال هیستیدین یا فنیل‌آلانین) می‌تواند از تخریب مادۀزیستی محافظت کند [89]. توصیه می‌شود برنامۀ پایداری مناسبی برای تشخیص تغییرات ایجادشده در طول عمر انبارداری نانوماده سترون‌شده و/ یا محصول نهایی ایجاد شود تا بتوان تعیین کرد که آیا چنین تغییراتی رخ می‌دهد.

در برخی موارد، ممکن است شناسایی یک روش سترون‌کردن سازگار با نانومواد مشکل باشد. در چنین مواردی ساخت در شرایط سترونی می‌تواند یک راه‌حل باشد.

۷ رهایش نانواشیاء از افزاره‌های پزشکی

۷-۱ ملاحظات کلی

شناسایی و مشخصه‌یابی جامع نانواشیایی که پتانسیل رهاشدن دارند، می‌تواند تحت شرایط فیزیولوژیک مشابه شرایط مصرف درنظر گرفته شود. کینتیک‌های رهایش، مقدار، مهاجرت و تجمع‌زیستی نانواشیاء باید در محیط‌های زیست‌شناختی ارزشیابی شوند.

۷-۲ محصولات حاصل از تخریب

استاندارد ISO 10993-9 یک چارچوب و نقطۀ شروعی برای شناسایی و کمّی‌سازی محصولات بالقوۀ حاصل از تخریب افزاره‌های پزشکی را ارائه می‌کند. طبق پیوست A استاندارد ISO 10993-9:2009، مطالعات تخریب باید درنظر گرفته شوند، اگر:

الف- افزاره طوری طراحی شود که قابل‌جذب باشد؛

ب- افزاره برای کاشت بیش‌تر از ۳۰ روز درنظر گرفته می‌شود، یا

پ- بررسی دقیق سامانۀ ماده (ها) نشان می‌دهد که مواد سمی می‌توانند در طی تماس با بدن رها شوند.

استانداردهای ISO 10993-13، ISO 10993-14 وISO 10993-15 به ترتیب، جنبه‌های کلی تخریب پلیمرها، سرامیک‌ها و فلزات و آلیاژها را پوشش می‌دهند.

همراه با رهایش یون‌ها، وقوع خوردگی می‌تواند همچنین منجر به رهایش ذرات در مقیاس نانو شود. در مورد برخی نانومواد، معلوم شده‌است که نانواشیاء جدید می‌توانند از یون‌های رهاشده تشکیل شوند (به‌عنوان مثال نانونقره [90]).

۷-۳ رهایش نانواشیاء دراثر سایش

با وجود تعداد زیاد افزاره‌های پزشکی، این احتمال وجود دارد که افزاره در طول زمان مصرف موردنظر ساییده شده و نانواشیاء (برای مثال، ذرات، الیاف، پولک‌ها، تکه‌ها) به داخل محیط رها شوند. این موضوع با توجه به ماندگاری‌زیستی شناخته‌شدۀ برخی از نانواشیاء که به علت اندازۀ نانومقیاس‌شان، مساحت سطح ویژۀ بزرگ و واکنش‌پذیری بالای آنها

1 - Alginate based biomaterials

که می‌تواند با کارایی زیادی به‌عناصر زیست‌شناختی متصل شوند، بسیار نگران‌کننده به‌نظر می‌رسد [91]. بنابراین، درصورت وجود شرایط زیر رهایش نانواشیاء در اثر سایش باید به‌روش درستی بررسی شود:

الف- افزاره یک نانوماده باشد؛

ب- افزاره دارای پوشش نانوماده باشد؛

پ- افزاره در شرایط طبیعی مصرف با بافت زیست‌شناختی اصطکاک پیداکند یا بین ترکیبات آن با سیمان یا چندسازه‌ها، در معرض اصطکاک قرارگیرد؛ یا

ت- درصورتی‌که باقی‌مانده‌های ناشی از ساخت شامل نانومواد تصادفی باشد.

روش‌های نمونه‌برداری از ذرات تولیدشده در اثر سایش ایمپلنت‌های مفصلی در انسان و در شبیه‌سازهای مفصلی در استاندارد ISO 17853 شرح داده‌شده‌اند. این استاندارد دستگاه‌ها، واکنشگرها و روش‌های آزمون ایزوله‌کردن و مشخص‌کردن ذرات پلیمری و فلزی سایش‌شده از نمونه‌های بافت‌های جداشده از اطراف ایمپلنت جایگزین مفصل به‌دست‌آمده در جراحی مجدد اصلاحی یا پس از مرگ و از نمونه‌های مایعات آزمون شبیه‌ساز مفصلی را مشخص می‌کند. برخی از این روش‌های اجرایی قطعاً می‌توانند برای ایزوله‌کردن و مشخصه‌یابی ذرات حاصل از مایعات زیست‌شناختی انسان (مانند مایع سینوویال[1]) پذیرفته شوند.

لازم به‌ذکر است که بر طبق مفاد این استاندارد، افزاره‌های پزشکی (به‌عنوان مثال ایمپلنت‌ها، پرکننده‌های دندانی) می‌توانند از طریق سایش، نانواشیاء تولید کنند، حتی در مواردی که در ساخت این افزاره‌های پزشکی از نانومواد استفاده نمی‌شود.

۷-۴ فرایندهای درجا

عملیات مکانیکی (به‌عنوان مثال پرداخت، آسیاکاری) درجا برخی افزاره‌های پزشکی مانند آنچه که در دندانپزشکی انجام می‌شود، صرف‌نظر از اینکه افزارهٔ پزشکی اصلی حاوی نانومواد باشد، پتانسیل ایجاد مواد در مقیاس نانو را دارند [92]. این موضوع باید در ارزیابی ریسک موردتوجه قرار گیرد.

۸ توکسیکوکینتیک

۸-۱ ملاحظات کلی

ریسک عمدهٔ نانومواد، مربوط به وجود یا رهایش نانواشیاء آزاد، یون‌ها یا اجزایی است که نانومواد مجزا را تشکیل می‌دهند. در افزاره‌های پزشکی، نانومواد می‌توانند به‌صورت مواد آزاد، تثبیت‌شده یا گنجانده‌شده[2] وجود داشته‌باشند که هرکدام پتانسیل رهایش نانواشیاء در بدن را دارند.

خواص کینتیک نانواشیاء می‌توانند با جذب، توزیع، سوخت‌وساز و دفع/حذف (ADME)[3] به‌عنوان فرآیندهای متوالی بالقوه توصیف شوند. لازم است که مطالعات توکسیکوکینتیک به‌عنوان بخشی از ارزیابی ریسک توکسیکولوژی افزاره‌های پزشکی حاوی نانومواد درنظر گرفته شوند. فقط درصورتی لازم است مطالعهٔ توکسیکوکینتیک انجام شود

1- Synovial fluid
2- Embedded
3- Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion/Elimination

که احتمال رهایش نانوماده از افزارهٔ پزشکی وجود داشته‌باشد و جذب، توزیع، سوخت‌وساز و یا دفع شوند. استاندارد ISO 10993-16 چارچوبی مبتنی بر چگونگی انجام مطالعات توکسیکوکینتیک را ارائه می‌دهد. به‌طور کلی این استاندارد برای نانومواد قابل‌استفاده است اما باید برای مواردی مانند روش‌های برچسب‌گذاری، مدل حیوانی، طول دورهٔ مطالعه، راهبردهای دُزدهی و روش‌های آنالیز توجیهاتی ارائه شود.

عواملی مانند مسیر تجویز، اندازهٔ نانوشیء یا توده‌ها/ کلوخه‌های آنها، خواص سطح (شیمی و بار)، گونه‌های جانوری، دُز و روش‌های دُزدهی گزارش شده‌اند که همه در توکسیکوکینتیک مدل‌های حیوانی تأثیر دارند [69]، [70]، [93]، [94]، [95]. هنگامی که از نانومواد در سامانه‌های آزمون استفاده می‌شود، فرد باید بداند که برخی از خواصی که باید تعیین شوند، می‌توانند تحت‌تأثیر قرارگیرند و تا حد زیادی به محیط پیرامون (به‌عنوان مثال محیط کشت بافت، خون/ سرم، وجود پروتئین) وابسته هستند. چنین برهم‌کنش‌هایی با محیط می‌تواند موجب تغییر موقتی در نانومواد به تنهایی برای مثال از طریق به‌دست آوردن/ آزادسازی پوشش پروتئینی، تشکیل توده‌ها/کلوخه‌های نانوشیء و سایر تغییرات در خود نانومواد شوند. چنین تغییراتی می‌توانند بر مشخصه‌های نانوماده و در نتیجه بر پروفایل توکسیکولوژی نانوماده تأثیر بگذارند.

بنابراین، اگر در ارزیابی ریسک نتیجه‌گیری شود که مطالعهٔ توکسیکوکینتیک لازم است؛ عواملی‌که می‌توانند طراحی مطالعه، اجرای مطالعه و تفسیر نتایج را تحت‌تأثیر قرار دهند، باید ذکر شوند.

۸-۲ عوامل تأثیرگذار بر توکسیکوکینتیک

۸-۲-۱ خواص فیزیکوشیمیایی

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که خواصی مانند اندازه و توزیع اندازه، شکل، بار، کلوخگی و تودگی، آب‌دوستی و ساختار سطح برروی رفتار ADME تأثیر می‌گذارند. برای‌مثال، گزارش شده‌است درحالی‌که نانوذرات کوچکتر (۱۰ نانومتر تا ۱۵ نانومتر) توزیع گسترده‌ای دارند، نانوذرات بزرگتر در اندام‌های سامانهٔ فاگوسیت تک‌هسته‌ای (MPS) به‌ویژه کبد و طحال [69]، [95] تمایل به تجمع دارند، در ارگان‌های شناخته‌شده‌ای که نقش مهمی در تصفیهٔ گویچه‌های قرمز پیرشده یا آسیب‌دیده (RBC)[1] و سایر ذرات از خون ایفاء می‌کنند [97]. نشان داده شده‌است که ذرات بزرگتر از ۲۰۰ نانومتر به دلیل اندازهٔ شکاف بین سلول اندوتلیال (عرض تقریبی ۲۰۰ نانومتر) بیشتر احتمال دارد که در طحال و نه در کبد انباشته شوند. در مطالعهٔ انجام‌شده برروی نانوذرات طلا با اندازهٔ حدود ۱٫۴ نانومتر تا ۲۰۰ نانومتر، یافتهٔ مشابهی در کبد گزارش شده‌است که تجمع با افزایش اندازهٔ ذرات زیاد می‌شود [95]. در سطح سلولی، گزارش شده‌است که نانوذرات بزرگتر از ۱۰۰ نانومتر می‌توانند توسط سلول‌ها از طریق مسیرهای مختلف اندوسیتیک (درون‌بر) مانند اندوسیتوز[2] با واسطهٔ کلاترین یا با کاوولا[3] برداشت شوند [98]. نانوذرات بزرگتر کمتر احتمال دارد به پوست نفوذ کنند، درحالی‌که همتایان کوچکتر آنها ممکن است قادر باشند به لایه‌های عمقی‌تر اپیدرم، درم و لایه‌های سلولی پایین‌تر دسترسی یابند [96].

1- Red blood cells
2- Endocytosis
3- Caveolae

خواص فیزیکوشیمیایی سطوح نانوماده در تعیین برهم‌کنش با مولکول‌های زیستی [99] و سامانه‌های زیست‌شناختی نقش بسیار مهمی دارند. مشخص شده‌است که خواص سطح مانند آب‌دوستی و آب‌گریزی و بار بر جذب سطحی پروتئین، پایداری و قدرت برجذب آنها، همچنین بر ماهیت برجذب مولکول‌های‌زیستی تأثیر می‌گذارد (به زیربند ۸-۲-۲ مراجعه شود). از عوامل به‌اصطلاح درپوش‌گذاری[1] می‌توان برای پایدارکردن نانواشیاء از طریق اتصال به سطح نانوشیء با پیوندهای اشتراکی یا برهم‌کنش‌های شیمیایی غیراشتراکی استفاده کرد. چنین عوامل درپوش‌گذاری، ابزاری برای جلوگیری از تشکیل تودهٔ نانوشیء هستند. نمونه‌هایی از عوامل درپوش‌گذاری شامل مولکول‌های آلی کوچک، پلیمرهای محلول در آب، پلی‌ساکاریدها، لیپیدها، پروتئین‌ها و مواد سطح‌فعال می‌باشند. عوامل درپوش می‌توانند بر پایداری اتصال و/ یا سمیت تأثیر بگذارند.

معلوم شده‌است که برخی خواص فیزیکوشیمیایی بر توکسیکوکینتیک تأثیر می‌گذارند. نانوذرات در اندازه‌های ۱۰ نانومتر یا کمتر از آن سریع‌تر از طریق ادرار دفع می‌شوند [100] و توزیع گسترده‌تری دارند [93]. پوشش آب‌دوست (برای مثال، پلی‌اتیلن گلیکول (PEG))[2] زمان گردش خون را افزایش می‌دهد [69]، [70]. همچنین، مقدار نانوذرات ۲۰ نانومتری سیلیس یافت‌شده در کبد و طحال در مقایسه با نانوذرات ۸۰ نانومتری سیلیس بیشتر است [101]. هر دو نانوذرات ۲۰ نانومتری و ۸۰ نانومتری سیلیس از طریق ادرار دفع می‌شوند که سرعت دفع نانوذرات ۸۰ نانومتری بالاتر از نانوذرات سیلیس ۲۰ نانومتری است [102]. گزارش شده‌است که اشیاء با قطر کمتر از ۱۲ نانومتر می‌توانند از سد خونی- مغزی عبور کنند [103]. علاوه‌براین، بار سطح تشکیل تاج پروتئین[3] (به زیربند ۸-۲-۲ مراجعه شود) و نیز برهم‌کنش با غشاهای سلولی که ممکن است بر توکسیکوکینتیک تأثیر بگذارد را کنترل می‌کند. بااین‌حال، این سوال همچنان وجود دارد که کدام پارامتر مهمترین تأثیر را در ADME دارد؟

۸-۲-۲ جذب سطحی زیست‌مولکولی

نانومواد در محیط‌های زیست‌شناختی در سطوح خود درمعرض جذب سطحی سریع پروتئین هستند، تشکیل آنچه که به‌عنوان «تاج پروتئین» شناخته می‌شود. گزارش شده‌است که تاج پروتئین‌ها سامانه‌های دولایه‌ای هستند که از یک هستهٔ داخلی پروتئین‌های با اتصال محکم و یک لایهٔ خارجی مولکول‌های تبادل‌کنندهٔ سریع تشکیل شده‌اند [104]. باید به‌این نکته توجه داشت که تاج پروتئین ایستا نیست و بسته به‌محیطی که نانوشیء به‌طور مستقیم با آن در ارتباط است، می‌تواند تغییر کند. علاوه‌براین، مولکول‌های زیستی دیگری مانند لیپیدها نیز می‌توانند به سطح نانوماده بچسبند. تشکیل یک پروتئین سرم «تاج پروتئین» باعث افزایش تشخیص و دریافت توسط سلول‌های سامانهٔ فاگوسیت تک‌هسته‌ای می‌شود [99] [104] [105]. به‌طور کلی این مسئله منجر به پاکسازی سریع نانواشیاء معمولاً از خون به کبد و طحال می‌شود که اعضای کلیدی سامانهٔ فاگوسیت تک‌هسته‌ای هستند [70] [93] [94] [105] [106] [107] [108] [109] [110].

1- Capping
2- Polyethylene glycol
3- Corona

ساختار و ترکیب‌بندی تاج پروتئین بستگی به ماهیت سنتزی نانوماده (یعنی، خواص ذاتی ماده مانند اندازه، شکل، ترکیب‌بندی، بار و آب‌گریزی [111])، طبیعت محیط فیزیولوژیک (به‌عنوان مثال خون، مایع میان بافتی، سیتوپلاسم سلول) و طول دورهٔ مواجهه دارد [112].

تاج پروتئین اندازه و ترکیب‌بندی بینابینی[1] نانوماده را تغییر می‌دهد، به آن ماهیت زیست‌شناختی می‌دهد که از ماهیت سنتزی آن متمایز است. درنتیجه، پاسخ های فیزیولوژیکی از جمله سیگنالینگ، کینتیک‌ها، انتقال، تجمع و سمیت تحت‌تأثیر ماهیت زیست‌شناختی به‌دست‌آمده قرار می‌گیرند [104] [105] [113]. توجه به‌این نکته مهم است که بسته به بافت‌ها و بخش‌های سلولی، تفاوت‌های قابل‌توجهی در ترکیب‌بندی بیوشیمیایی، قدرت یونی و اسیدیتهٔ مایعات زیست‌شناختی وجود دارد. ماهیت و مقدار کمّی برجذب پروتئین‌های روی نانواشیاء و بخش‌های زیست‌شناختی احاطه‌کنندهٔ آن می‌تواند در ماهیت و وسعت پاسخ‌های سلولی از قبیل تشخیص سلول نانوشی، فرایند درونی‌سازی[2] (به‌عنوان مثال توسط ماکروفاژها) و نتایج بعدی دخیل باشد.

پلاسما و محیط سرم برای شناسایی پروتئین‌های جذب‌شده روی نانومواد خاص مفید هستند. در شرایط فیزیولوژیک، استفاده از مایعات شبیه‌ساز، مرتبط با بخش زیست‌شناختی می‌تواند به ارزیابی سرنوشت نانواشیاء کمک کند. می‌توان از مایعات شبیه‌ساز برای تعیین مولکول‌های زیستی که می‌توانند روی سطح نانوماده برجذب شوند، استفاده کرد و دگرگونی‌های چرخهٔ عمر نانومواد را ارزشیابی کرد [114] [115] [116] [117]. همچنین اطلاعات مربوط به طرز استفاده از مایعات شبیه‌ساز در پرونده‌های برنامهٔ حمایت OECD[3] گنجانده شده‌اند. برای مثال، اسموند-مکلود و همکارانش[4] [117]، از مایع زیست‌شناختی شبیه‌سازی‌شده (محلول گامبل[5]) برای ارزیابی دوام انواع مختلف نانولوله‌های کربنی استفاده کرد.

همانطور که نانوشیء با محیط خود برهم‌کنش دارد، یک حامل (به‌عنوان مثال محلول تعلیقه) می‌تواند بر توکسیکوکینتیک نانواشیاء تأثیر بگذارد. برخی حامل‌ها بر کلوخگی نانوشیء اثر می‌گذارند و توزیع اندازه را تغییر می‌دهند درحالی که حامل‌های دیگری بر اتصال مواد به سطح اثر می‌کنند. ترجیحاً، حامل باید همانی باشد که برای سایر آزمون‌های سمیت استفاده می‌شود. به‌طور خلاصه، انجام مشخصه‌یابی مناسب ماده با نانومادهٔ خالص همچنین نانوماده مورداستفاده در سامانهٔ آزمون بسیار مهم است.

سطح نانوساختارها می‌تواند بر روی برهم‌کنش/ جذب سطحی نانوماده-پروتئین، گردش/ توزیع آنها و سرانجام بر پروفایل توکسیکوکینتیک آنها تأثیر داشته باشد. شیمی سطح و ساختار نانومواد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند زیرا آنها ماهیت و وسعت برهم‌کنش اولیه با سامانه‌های زیست‌شناختی و آبشاری از وقایع بعد از آن را تعیین می‌کنند. مولکول‌های سطح می‌توانند به‌طور ذاتی در ساختار اصلی نانومواد وجود داشته‌باشند یا به‌منظور تغییر خواص سطح نانومواد، گروه‌های عاملی[6] به‌طور عمد به آن افزوده شده تا کارکردهای ویژه‌ای را برای آنها ایجاد کند.

1- Interfacial composition
2- Internalization
3- OECD dossiers from the sponsorship programme
4- Osmond- McLeod
5- Gamble
6- Moieties

به‌عنوان مثال، می‌توان از پوشش‌های سطح برای تغییر خواص سطح نانوذرات برای جلوگیری از تودگی یا کلوخگی، افزایش ترجیحی جذب سطحی پروتئین یا بهبود هدف‌گیری بافت یا سلول خاص استفاده کرد [118].

۸-۲-۳ مسیر مواجهه

مسیر ورود مهم است، زیرا می‌تواند سطح نانومواد/نانوذرات و توزیع زیستی نانواشیاء در بدن را تغییر دهد [94] [104] [105] [119] [120] [121]. بسته به محل کاربرد، کینتیک‌های بیشتری از یک نانوشیء رهاشده می‌تواند تحت‌تأثیر چسبندگی مولکول‌ها به‌سطح یک نانوماده قرار گیرد. براین اساس، تصور می‌شود که تشکیل پروتئین سرمی تاج پروتئین، تشخیص و دریافت توسط سلول‌های سامانهٔ فاگوسیت تک‌هسته‌ای (MPS) را افزایش می‌دهد [99] [104] [105]. این موضوع به‌طور کلی موجب پاکسازی سریع نانوذرات از خون مخصوصاً به کبد و طحال می‌شود که اندام‌های کلیدی MPS هستند [70] [93] [94] [106] [107] [108] [109] [110]. مشخص شده‌است که عمل‌آوری سطح[1]، به‌عنوان مثال پگیلاسیون[2] نانومواد، پاکسازی خون از نانومواد تزریق‌شده به‌صورت IV را به تأخیر می‌اندازد [۶۹] [۷۰]. دربیشتر مسیرهای مواجهه، به‌جز مسیر وریدی، بیشتر نانواشیاء در نقطهٔ ورود در بافت‌های مجاور یا گرهٔ لنفاوی موضعی در حال تخلیه باقی می‌مانند. نانواشیاء پس از رهایش در محل می‌توانند از طریق تخلیهٔ لنفاوی به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم وارد سامانهٔ گردش خون شوند.

پس از تجویز داخل تراشه، نانوذرات طلای جابه‌جا شده (۱٫۴ نانومتر) یک الگوی توزیع در اندام با دریافت بیشتر در کلیه نسبت به کبد نشان داد، درحالی‌که کبد ارگان هدف غالب پس از تجویز وریدی است [122]. براین اساس، بسته به مسیر مواجهه، نانواشیاء رهاشده از افزاره پزشکی می‌تواند توسط مولکول‌های زیستی مختلف پوشانده شوند (به‌عنوان مثال کاترهای وریدی خون در مقابل لوله‌گذاری داخل تراشه). داده‌های رایج در مقالات نشان می‌دهد که دریافت نظام‌مند نانواشیاء از طریق پوست محدود است [123] [124] [125]. دریافت پوستی بستگی به خواص نانوذرات، محل کالبدشناختی[3] (ضخامت پوست) و یکپارچگی سدپوستی دارد [۱۲۵]. همچنین، حرکات مکانیکی و شیمیایی می‌توانند جذب را افزایش دهند. اگر ریه در معرض نانواشیاء باشد، توزیع در ریه به خواص نانواشیاء بستگی خواهد داشت، جایی‌که اندازهٔ نانوشیء یک عامل مهم است. هنگامی که حفره بینی در جوندگان در معرض نانواشیاء قرار گرفت، انتقال نانواشیاء به مغز از طریق اعصاب حسی مشاهده شد [126] [127] [128].

نانومواد تقریباً در همهٔ انواع اندام‌ها و بافت‌ها یافت شده‌اند که موجب می‌شود پیش‌بینی اندام‌های هدف دشوار شود. سطح نانومواد یافت‌شده در اندام‌های مختلف اغلب کم است و شناسایی و کمّی‌سازی نانومواد را با مشکل روبرو می‌سازد.

۸-۲-۴ دُز

درصورتی‌که دُزهای تجویزشده بیش از ظرفیت پاکسازی باشند، در بدن تجمع اتفاق می‌افتد. نانواشیاء نهشت‌یافته در آلوئول‌ها در ابتدا توسط ماکروفاژهای آلوئولی فاگوسیته می‌شوند که سرانجام از طریق حرکات بالابرندهٔ (پله برقی) مژک‌های مخاطی[4] جابه‌جا می‌شوند و از طریق مجاری هوایی به‌صورت مکانیکی پاک می‌شوند. اگر دُز از پاکسازی

1- Surface treatment
2- PEGylation
3- Anatomical site
4- Mucociliary escalator

افزون‌تر شود، اضافه بار/ اشباع پاکسازی رخ می‌دهد و کینتیک‌ها تغییر می‌کنند [129]. درخون، نانواشیاء به‌طور عمده از طریق دریافت توسط سلول‌های فاگوسیتیک در اندام‌های MPS پاکسازی می‌شوند. بااین حال، دُزهای بالا یا مکرّر نانوشیء تزریق‌شده به جریان‌خون می‌تواند به‌عنوان مثال سلول‌های فاگوسیتیک کبد و طحال را تحت‌فشار قرار دهد، دراین صورت ذرات به سایر اندام‌ها مجدداً توزیع می‌شوند [130] [131]. همچنین، گزارش شده‌است توکسیکوکینتیک‌های نانواشیاء در جریان‌خون تحت‌تأثیر فاصلهٔ زمانی بین دُزها قرار می‌گیرند [132].

۸-۲-۵ گونه‌ها و جنس

گونه‌ها و جنسیت‌ها، فیزیولوژی و آناتومی متفاوتی دارند و بنابراین، نمی‌توان این را درنظر نگرفت که این موضوع موجب تغییر توکسیکوکینتیک‌های نانواشیاء می‌شوند. نتایج حاصل از مطالعات توکسیکوکینتیک برروی تفاوت‌های جنسیتی نشان داده‌اند که موش‌های صحرایی ماده نسبت به تجمع نانواشیاء نقره و مشتقات آنها در کلیه‌ها از موش‌های صحرایی نر مستعدتر هستند [133] [134]. همچنین، تفاوت‌های توکسیکوکینتیکی بین گونه‌ها مشاهده شده‌است. هنگامی‌که موش‌های سوری، موش‌های صحرایی و هامسترها از طریق استنشاقی در معرض نانواشیاء دی‌اکسید تیتانیم قرار گرفتند، اختلال در پاکسازی نانواشیاء از ریه در موش‌های سوری و موش‌های صحرایی مشاهده شد. درنتیجه، بار نانواشیاء در ریه موش‌های سوری و موش‌های صحرایی بیشتر از هامسترها بود [135]. وقتی براون و همکارانش[1] [136] پاکسازی ذرات معلق در ریه‌ها را بین موش‌های صحرایی و انسان‌ها مقایسه کردند، آنها متوجه شدند که سرعت پاکسازی در موش‌های صحرایی نسبت به انسان سریعتر بود. حتی اگر اندام هدف یک نانوشیء مشابه باشد، محل‌قرارگیری درون اندام می‌تواند متفاوت باشد [137]. گونه‌ها و جنسیتی که توکسیکوکینتیک از طریق آنها مطالعه می‌شود مطالعات سمیت سیستمیک را پشتیبانی می‌کنند، بنابراین هنگام انتخاب گونه‌ها و جنسیت باید ترازبندی توکسیکوکینتیک و سمیت سیستمیک موردنظر قرار بگیرد. با توجه به اطلاعات محدود در مورد جنبه‌های جنسیتی، این موضوع باید بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد.

۸-۲-۶ روش‌های اندازه‌گیری

برای اندازه‌گیری نانومواد در بافت و اندام‌ها، نانوماده یا ترکیبات عنصری آن باید از پس‌زمینه زیست‌شناختی قابل‌تشخیص باشند. برای کمک به‌این امر، نانوشیء می‌تواند با برچسب‌های رادیواکتیو یا فلورسنت برچسب‌گذاری شود یا با روش جایگزین دیگری با استفاده از روش‌های آنالیزی مانند پلاسمای جفت‌شدهٔ القایی- طیف‌سنجی جرمی(ICP-MS) ترکیب‌بندی اصلی آن تعیین شود. آنالیزی که به ترکیب‌بندی عنصری متکی باشد، این عیب را دارد که کاربر را از ماهیت نانوماده مطلع نمی‌کند (یعنی اینکه آیا به‌عنوان یک نانوشیء وجود دارد یا به فرم عنصری تخریب می‌شود). بر این محدودیت می‌توان با استفاده از ICP-MS تک‌ذره (spICP-MS)[2] غلبه کرد [138]. روش spICP-MS نسبتاً جدید است و برای مشخص کردن و شناسایی نانوذرات بسیار مفید است، زیرا قادر است دیدگاه و اطلاعاتی در مورد ترکیب‌بندی شیمیایی عنصری، اندازه، توزیع اندازه و غلظت عددی آنها ارائه دهد. علاوه‌بر این، در ارزیابی سطح ریسک افزاره‌هایی که حاوی نانواشیاء هستند یا نانواشیاء از آنها فروشویی[3] می‌شود، روش spICP-MS

1- Brown et al
2- Single particle ICP-MS
3- Leach

این قابلیت را دارد که می‌تواند از طریق تمایز بین یون‌های عنصری و نانوذراتی که می‌توانند سمیت‌های مختلفی ایجادکنند، اطلاعات مهمی ارائه کند.

همچنین روش‌های برچسب‌گذاری معایبی نیز دارند. برای مثال، برچسب می‌تواند از نانوشیء رها شود و/ یا می‌تواند برهم‌کنش نانوشیء با محیط را تغییر دهد که به نوبهٔ خود بر توکسیکوکینتیک‌ها تأثیر خواهد داشت. هنگام انتخاب روش برچسب‌گذاری، پایداری پیوند بین برچسب و نانوشیء باید همراه با حد تشخیص آن درنظر گرفته شود. روش‌هایی که حد تشخیص‌های پایین دارند ممکن است نتوانند مقادیر خیلی کم نانوشیء را در بافت‌ها و اندام‌ها بدون پردازش مجدد تشخیص دهند. برای برخی روش‌های آنالیزی (برای مثال ICP-MS)، ممکن است به‌منظور افزایش حساسیت، پردازش بیشتری برروی نمونه‌های آزمون لازم باشد. درصورتی که برای اطمینان از قابلیت تشخیص نانوشیء در بافت/ اندام دُز افزایش یابد یا از دُز مکرر استفاده شود، سامانهٔ MPS می‌تواند اشباع شود و از این‌رو، رفتار توکسیکوکینتیک اصلاح شود (همانطور که در زیربند ۸-۲-۴ مطرح شد).

۹ ارزشیابی توکسیکولوژی

۹-۱ ملاحظات کلی

چون مشخص شده‌است که نانومواد خواص فیزیکوشیمیایی (برای مثال مکانیکی، شیمیایی، مغناطیسی، نوری یا الکتریکی) متفاوتی از شکل‌های توده‌شان نشان می‌دهند، منطقی است انتظار داشته باشیم که مواد نانومقیاس‌شده بر رفتار زیست‌شناختی مسئول اثرات مختلف رخ داده در سطوح سلولی، درون‌سلولی و زیست‌مولکولی (مانند ژن‌ها و پروتئین‌ها) از جمله دریافت[1] سلولی تأثیرگذار باشند. در نتیجه، پس از مواجهه با نانومواد می‌توان پروفایل توکسیکولوژی متفاوتی از آنچه که با مواد معمولی ایجاد می‌شود، انتظار داشت.

نانواشیاء پتانسیل جابه‌جایی در سراسر بدن را دارند و توسط بافت‌هایی که در بخش پایین‌دست از محل تجویز قرار دارند، برداشت می‌شوند (به بند ۸ در مورد توکسیکوکینتیک مراجعه شود). آنها نه تنها احتمال عبور از غشای سلولی را دارند بلکه برای برهم‌کنش یا ایجاد وقفه در سنتز DNA و سایر کارکردهای سلولی از غشای ساختارهای درون سلولی هسته‌ها و میتوکندری‌ها نیز عبور می کنند [139].

نانواشیاء هنگام تماس با محیط زیست‌شناختی، در سطوح کمی و کیفی که توسط ماهیت محیط فیزیولوژیک (برای مثال، خون، پلاسما، سیتوپلاسم، غیره) و مشخصه‌های نانوماده القاء می‌شود، با پروتئین‌ها واکنش نشان می‌دهند. به‌همین ترتیب، هنگامی که در مواجهه با محیط آزمون قرار می‌گیرند، از نانواشیاء انتظار می‌رود که بسته به ماهیت ذاتی آنها و شرایط مواجهه، با محیط برهم‌کنش داشته و یا با آن مداخله کنند، سپس آنها می‌توانند رفتار متفاوتی از مواد تودهٔ متناظر نشان دهند. بنابراین لازم است هر روش آزمون طراحی‌شده برای ارزشیابی زیست‌شناختی افزاره به‌طور اختصاصی صحه‌گذاری شود. مانند افزاره‌های پزشکی، انتخاب نقاط نهایی[2] بستگی به زمان و محل تماس دارد. با این‌وجود، انتخاب روش آزمونِ واقعی نیز می‌تواند به مشخصه‌های نانوماده بستگی داشته‌باشد، زیرا این مشخصه‌ها می‌توانند با انواع روش‌های آزمون تداخل کنند.

1- Uptake
2- End points

در آزمون سمیت نانومواد چالش‌های شناخته‌شدهٔ متعددی وجود دارد که باید از آن اجتناب کرد (به زیربند ۹-۲ تا ۹-۸ در مورد آزمون‌های اختصاصی مراجعه شود). همچنین، در آینده، با پیشرفت دانش سمیت و سرنوشت نانومواد، ممکن است چالش‌های بیشتری دررابطه با آزمون آشکار شود. بنابراین با توجه به کیفیت روش آزمون نانومواد، به‌روز بودن اهمیت دارد.

برهم‌کنش بالقوهٔ زیست‌شناختی به‌طور مستقیم به غلظت یا تعداد مولکول‌ها وابسته نیست بلکه به‌خود نانوماده/ نانوشیء بستگی دارد. ممکن است در نانوتوکسیکولوژی ارتباط دُز- پاسخ از واحد قدیمی جرم یا غلظت تبعیت نکند بلکه تعداد نانوشیء یا مساحت سطح کل نانوماده/ نانوشیء مطرح باشد.

علاوه‌بر مشخصه‌یابی، شرح دقیقی از شرایط آزمایش باید ثبت شود، از جمله موارد زیر:

- برای توصیف دُز نانوشیء مورداستفاده در آزمون، حداقل ۳ پارامتر باید ثبت شود: جرم، تعداد ذرات و مساحت سطح که امکان تبدیل یا محاسبه انواع دزسنجی‌ها را به یکدیگر می‌دهد (ISO/TR 13121).
- تعلیقه/ محیط دوباره تهیه‌شده؛
- محیط آزمون (برای مثال درصد سرم)؛
- مشخصه‌های محیط (pH، نمک، عوامل سطح فعال، غیره.)؛
- هرگونه افزودنی به محیط و اثرات آنها روی نانواشیاء مانند پراکندگی، تودگی و غیره باید ذکر شود ؛
- رهایش یون درمحیط اختصاصی باید مشخص شود؛
- وضعیت تعلیقه باید در محیط تعلیقه یا دوباره تهیه شده و محیط آزمون ثبت شود؛
- نوع ماده ظرف.

باید توجه داشت که در چندین حوزه، روش‌های آزمون جایگزین دیگری برای سنجش‌های حیوانی درون‌تن، کاهش و اصلاح آنها، درحال توسعه هستند. توصیه می‌شود چنین سنجش‌هایی، درصورت امکان، وقتی صحه‌گذاری شدند، از نظر ارزشیابی نانومواد مورداستفاده یا رهاشده از افزاره‌های پزشکی نیز بررسی شوند. استاندارد ISO/TR 16197 روش‌های غربالگری توکسیکولوژی نانومواد ساخته‌شده را شرح می‌دهد.

۹-۲ آزمون سمیت سلولی در شرایط برون‌تن

۹-۲-۱ ملاحظات کلی

به‌طور کلی، سمیت سلولی به‌عنوان اختلال در کارکردهای سلولی ازجمله اختلال در یکپارچگی غشای پلاسمایی، تداخل با کارکرد اندامک[1] و اختلال در اسکلت سلولی درنظر گرفته می‌شود، البته سمیت سلولی به‌موارد ذکر شده محدود نمی‌شود. آسیب ایجادشده بستگی به غلظت عوامل دارد. ارزشیابی سمیت سلولی نانومواد مورداستفاده در افزاره‌های پزشکی شامل گرم‌خانه‌گذاریِ سلول‌های کشت‌شده با افزاره/یا عصاره‌های استخراج‌شده از افزاره است که به‌طور مستقیم (تماس مستقیم) یا از طریق نفوذ (تماس غیرمستقیم) به‌دست آمده‌اند. آزمون‌های برون‌تن برای تعیین پاسخ زیست‌شناختی سلول‌های پستانداران و اثرات سمیت سلولی بالقوهٔ افزاره‌های پزشکی و مواد موجود در

1- Organelle

ترکیب‌بندی آنها طراحی می‌شوند. سمیت سلولی نانواشیاء بسته به حساسیت سلول به عامل سمی، وجود گیرنده‌های اختصاصی یا سازوکارهای دریافت، می‌تواند انتخابی باشد. بنابراین، هنگام ارزشیابی سمیت سلولی نانوماده، توجه ویژه‌ای باید به آزمون‌های برون‌تنِ انتخاب‌شده داشت. علاوه‌بر انتخاب مدل کشت سلول مربوطه، پارامترهای ویژهٔ نانواشیاء باید درنظر گرفته شوند.

استاندارد ISO 10993-5 روش‌های آزمون پذیرفته‌شده و استانداردشده برای ارزیابی سمیت سلولی برون تن افزاره‌های پزشکی را شرح می‌دهد. این سنجش‌ها شامل آزمون دریافت نوترال رد[۱]، تشکیل کلونی[۲]، آزمونMTT [۳] وXTT [۴] است که شاخص‌های سمیت سلولی زیر را ارزیابی می‌کنند:

- دریافت سلولی؛
- کافت سلولی[۵]
- مهار رشد سلولی؛
- تشکیل کلونی سلول؛
- فعالیت متابولیک؛ و
- سایر اثرات سلول‌ها (مثل ریخت شناسی، آسیب‌های غشایی، غیره.).

اگرچه این روش‌ها فقط برای افزاره‌هایی با مواد معمولی پذیرفته شده‌اند، اما این روش‌ها را می‌توان برای نانومواد با توجه به درنظر گرفتن خواص فیزیکوشیمیایی آنها به‌کار برد. برای هر دو آزمون برون‌تن [140] شامل ارزشیابی داده‌های موجود برای ارتباط آنها با سناریوی مواجههٔ موردانتظار، راهبردهای آزمون پیشنهاد شده‌است [141].

معمولاً در مطالعات برون‌تن، نانواشیاء توسط سلول‌ها برداشت می‌شوند. به‌محض ورود به سلول‌ها، نانواشیاء می‌توانند با ترکیبات زیست‌شناختی برهم‌کنش داشته و کارکردهای سلولی را مختل کنند. جاگیری داخل سلولی نانواشیاء درون سلول‌ها، بستگی به خواص فیزیکوشیمیایی، اندازه و دُز آنها دارد. مانند شرایط درون‌تن، نانواشیاء به‌طور عمده تمایل دارند در معرض سلول‌های MPS قرار گیرند، آزمون سمیت سلولی در شرایط برون‌تن در هر دو سلول فاگوسیتیک (برای مثال ماکروفاژهای موشی RAW264,7، سلول‌های انسانی THP-1 مانند ماکروفاژهای تمایزیافته) و رده‌های سلولی غیرفاگوسیتیک (برای مثال، فیبروبلاست موشی 3T3، فیبروبلاست‌های موشی L929، کراتینوسیت‌های انسانی HaCaT) را می‌توان درنظر گرفت (استاندارد ISO 10993-5، پیوست A، استاندارد ISO 19007).

یک سازوکار گزارش‌شده که در سمیت سلولی نقش دارد، تنش اکسایشی[۶] [142] [143] است که باعث فعال‌شدن مسیرهای سیگنالینگ حساس به پتانسیل اکسایشی و کاهشی می‌شود که سرانجام در اثر تولید سیتوکین‌ها و کموکین‌های درگیر در پاسخ‌های پیش‌التهابی به اوج خود می‌رسند. مخصوصاً هنگامی‌که نانومواد از طریق گونه‌های

1- Neutral red uptake
2- Colony formation
3- MTT:[3-(4,5-dimrthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid]
4- XTT:{2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5sulfophrnyl]5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide}
5- Cell lysis
6- Oxidative stress

اکسیژن واکنشگر (ROS)[1] موجب سمیت سلولی می‌شوند، لزوماً نانواشیاء مجبور نیستند وارد سلول‌ها شوند. برای نانومواد‌ی که از طریق رهایش یون مانند نانواشیاء اکسیدروی و نقره موجب سمیت سلولی می‌شوند وضعیت مشابهی می‌تواند وجود داشته‌باشد.

هنگام انجام سنجش‌های سمیت سلولی در شرایط برون‌تن برخی پارامترها بسیار مهم درنظر گرفته می‌شوند. مثال‌ها در ادامه نشان داده شده‌اند.

۹-۲-۲ ملاحظات تداخل نانوماده با سنجش‌ها

هنگام ارزشیابی سمیت نانومواد، چالش‌های متعدد شناخته شده‌ای وجود دارند که باید موردبررسی قرارگیرند. هنگام ارزشیابی سمیت سلولی نانومواد درشرایط برون‌تن، انواع مختلف تداخل‌ها امکان‌پذیر است [150]. نانومواد به دلیل بارهای الکتریکی و خواص نوری می‌توانند به‌طور بالقوه با پروتکل‌های آزمون متکی بر سنجش‌های رنگ سنجی و/یا عوامل فلورسنت تداخل کنند. علت دیگری از نتایج مثبت کاذب سنجش سمیت‌سلولی، برهم‌کنش با مواد مغذی مثل جذب سطحی می‌باشد.

به‌ویژه نشان داده شده‌است که نانواشیاء با رنگ‌های مورداستفاده در سنجش‌هایی مانند MTT، XTT، لاکتات دهیدروژناز (LDH)[2] و دی کلروفلورسین (DCF)[3] به‌طور اختصاصی واکنش می‌دهند [151] [152] [153] [154]. علاوه‌براین برخی نانواشیاء به‌تنهایی می‌توانند نور را پراکنده/ جذب کنند و بنابراین در سنجش‌های رنگ‌سنجی با اندازه‌گیری‌ها تداخل کنند. هنگام استفاده از روش‌های رنگ‌سنجی لازم است که این جنبه‌ها موردتوجه قرار گیرند. علاوه بر تداخل مستقیم باید توجه داشت که نانواشیاء می‌توانند مستقیماً از طریق واسطه‌های زیست‌شناختی پیوند/یا جذب سطحی شوند که منجربه تغییر اندازه‌گیری‌ها شوند [150] [152] [153] [157] [158] [159]. ترکیب کنترل‌های مناسب و حذف نانواشیاء از طریق سانتریفیوژ قبل از خوانش سنجش می‌تواند تغییرات در داده‌های به‌دست آمده برای همان نانواشیاء را کاهش دهد [155] [156]. برای تفسیر علمی معتبر ممکن است تأیید نتایج چندین آزمون با استفاده از روش‌شناسی‌های مختلف لازم باشد.

۹-۲-۳ ملاحظات ارتباط دُز و دُزسنجی‌ها

هنگام استفاده از روش‌های برون‌تن این نکته اهمیت دارد که برای ارزشیابی سمیت سلولی دُزهای نانواشیاء موردآزمون، محدودهٔ گسترده‌ای را دربرگیرند (ISO 19007). علاوه‌براین، درک وجود دُزسنجی‌های مختلف و استفاده از دُزسنجی مناسب برای بیان هرگونه رابطه دُز-پاسخ اهمیت دارد. در مدل‌های کشت سلولی برای ارزشیابی سمیت سلولی، تعریف مناسبی از دُزسنجی نانواشیاء بیانگر یک مسئلهٔ چالش‌برانگیز است. جرم، مساحت سطح و تعداد نانوذرات، همگی به‌عنوان دُزسنجی‌های مهم پیشنهاد شده‌اند و در سطح OECD درنظر گرفته می‌شوند [72] [144] [145] [146].

۹-۲-۴ ملاحظات کینتیک‌های نانوشیء

1- Reactive oxygen species
2- Lactate dehydrogenase
3- Dichloroflurescin

ترکیبات حل‌شده در مدل‌های کشت سلولی برون‌تن از طریق نفوذ به سلول‌ها می‌رسند، درحالی‌که نانواشیاء می‌توانند از طریق ته‌نشینی [در مورد نانوذرات توده‌ای‌شده (NPs)] و از طریق نفوذ (تک‌ذرات) با سلول‌ها در تماس باشند. گزارش شده‌است که غالباً این فرایندها وابسته به‌اندازه هستند [147]. انبوهگی تحت‌تأثیر محیط کشت و شرایط و نیز خواص فیزیکوشیمیایی نانواشیاء است که برهم‌کنش آنها را با محیطشان نشان می‌دهد [148].

در سامانه‌های کشت سلولی، اندازه و تراکم موثر ذرات، تابعی از حالت کلوخگی/ انبوهگی، چگالی فشردگی و شکل آنها است. این خواص می‌توانند بر سرعت رسیدن به سلول‌ها در کشت از طریق نفوذ و ته‌نشینی گرانشی تأثیر خیلی‌زیادی داشته باشند [148]. از سوی دیگر گزارش شده‌است که حالت کلوخگی بر پروفایل‌های دُز-پاسخ با واسطهٔ تنش اکسایشی در شرایط برون‌تن اثر می‌گذارد.

نانواشیایی که با جرم کوچکشان مشخص می‌شوند، به‌دلیل نیروهای ته‌نشینی نسبتاً کم می‌توانند در حالت تعلیقه باقی بمانند [72]. این مسئله باعث می‌شود که تماس آنها را با سلول‌ها و دُز نانواشیاء واردشده در مدل‌های کشت، جایی که سلول‌ها به‌کف سطح ظروف کشت می‌چسبند، محدود کند. بنابراین، باید به کینتیک‌های منحصربه‌فرد نانواشیاء در محلولی‌که تحت چگالی و گران‌روی محیط، اندازهٔ ذره، شکل، بار و تراکم هستند، توجه شود.

بسته به این عوامل، نانواشیاء می‌توانند نفوذکرده، ته‌نشین یا کلوخه شوند که سطح تماس و انتقال آنها در سلول‌ها را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد [72]. بنابراین با توجه به سامانه/مدل مورد استفاده، دُزیمتری موثر و اسمیِ نانواشیاء (یعنی دُز جرمی یا عددی یا مساحت سطح ذراتی که بر سلول‌ها اثر می‌گذارند) می‌توانند تفاوت‌های زیادی داشته‌باشند که منجر به تفاوت‌های بین اثر ارزیابی‌شده و اثر واقعی نانواشیاء شود [149]. چنین مسائلی را می‌توان با استفاده از مدل‌سازی درون‌رایانه‌ای[1] مانند ته‌نشینی، نفوذ و دُزیمتری برون‌تن (ISDD)[2] و مدل‌های دُزیمتری ذرهٔ چندمسیره (MPPD)[3] برای تولید پروفایل‌های دُز برای نانوذرات ته‌نشست شده، بررسی کرد.

۹-۳ سمیت ژنی، سرطان‌زایی و سمیت تولید مثلی

۹-۳-۱ ملاحظات کلی

استاندارد ISO 10993-3 برای شناسایی مخاطره و آزمون‌های افزاره‌های پزشکی از جنبه‌های زیست‌شناختی زیر راهبردهایی را مشخص می‌کند: سمیت‌ژنی، سرطان‌زایی، سمیت تولیدمثلی و رشدونمو. به‌طور کلی، استاندارد ISO 10993-3 برای ارزشیابی افزاره پزشکی یا اجزای آنها که احتمال ایجاد سمیت‌ژنی، سرطان‌زایی یا سمیت تولیدمثلی آنها شناخته‌شده یا نامشخص است، قابل‌استفاده است. این احتمال وجود دارد که نانوماده می‌تواند پروفایل‌های سمیت ژنی، سرطان‌زایی یا سمیت تولیدمثلی متفاوتی از مادهٔ تودهٔ مربوطه داشته باشند. ملاحظات ویژه‌ای برای نانومواد در پاراگراف‌های زیر بحث می‌شوند. دو نوع آسیب ژنی عمده وجود دارد؛ آسیب موتاژنی و کلاستوژنی که هر دو باید ارزیابی شوند.

1- *In Silico*
2- Sedimentation, diffusion and dosimetry
3- Multiple-path particle dosimetry

راهبردهای خاصی برای آزمون سمیت ژنی نانومواد شرح داده شده‌اند [160]. در مورد سمیت‌ژنی نانومواد نتایج متناقضی گزارش شده‌است. بنابراین، اثرات سمیت‌ژنی بالقوه نانوذره باید مورد به مورد ارزیابی شوند. با این وجود، برخی مطالعات نتیجهٔ سمیت‌ژنی مثبتی را نشان می‌دهند درحالی‌که سایر مطالعات این‌گونه نیستند، در ارزیابی ریسک، نانوذره باید به‌عنوان ژنوتوکسیک بالقوه درنظر گرفته شود. برخی از مطالعات منفی به‌دلیل اینکه مواجهه DNA نشان داده نشده‌است (برای مثال آزمون ایمز[1] منفی) مناسب نیستند.

برخی نانواشیاء می‌توانند از غشاء سلولی عبور کرده، وارد هسته شده و با DNA هسته و پروتئین‌ها برهم‌کنش داشته باشند. علاوه‌براین، تماس مستقیم بین نانواشیاء و DNA می‌تواند هنگام ناپدیدشدن پوشش هسته درطی تقسیم سلولی نیز رخ دهد. به‌نظر می‌رسد که نانواشیاء فلزی به‌دلیل رفتار واکنش‌پذیر آنها از نظر سمیت ژنی و سرطان‌زایی بسیار نگران‌کننده باشند. سمیت‌ژنی برای چندین نانوذرهٔ فلزی مانند نانوذرات نقره[2] [157] [161] [162] [163] و نانوذرات طلا[3] [164] [165] و نانوذرات نیکل[4] [139] [166] [167] [168] نشان داده شده‌است. با این وجود نتایج منفی سمیت‌ژنی نیز گزارش شده‌است [167] [168] [169] [182]. در مطالعات آزمایشی در موش‌های صحرایی که توسط هانسن و همکارانش[5] [170] انجام شد، به دنبال کاشت داخل عضلانی ذرات فلزی نیکل که در اندازهٔ نانو و همچنین ریزاندازه بودند (مقیاس میکرومتر) رشد رابدومیوسارکوما[6] نشان داده‌شد.

نانواشیاء به دنبال برهم‌کنش با ترکیبات سلولی با مقیاس مشابه می‌توانند رادیکال‌های آزاد ایجاد کنند و می‌توانند در DNA ضایعاتی القاء کنند یا درطی تقسیم سلولی میتوز بر جداشدن کروموزوم تأثیر بگذارند درنتیجه باعث اختلال در تقسیم سلولی و از بین رفتن سازمان‌دهی سلولی[7] شوند. در مقابل همچنین گزارش شده‌است که SWCNT می‌تواند آسیب DNA القاءشده با فراصوت را کاهش دهد [172].

همچنین اثر ژنوتوکسیک نانومواد می‌تواند ناشی از سازوکارهای غیرمستقیم شامل اثرات اکسایار[8] یا مهار ترمیم DNA باشد.

این‌طور استدلال می‌شود که تنش اکسایشی ایجادشده که با پاسخ التهابی و مرگ سلولی غیرطبیعی دنبال می‌شود برخی از وقایع غیرژنوتوکسیک هستند که می‌توانند از طریق نانواشیاء ایجاد شوند [139]. درنهایت، این وقایع می‌توانند زمینهٔ ایجاد سرطان‌زایی سلول‌ها را مهیا کنند. این پاسخ‌های سلولی را در مدل‌های برون‌تن و درون‌تن می‌توان به‌عنوان شاخص‌های بالقوهٔ القاء آسیب غیرمستقیم DNA ارزشیابی کرد [139]. پاسخ‌های تمایزیافتهٔ دو نوع دی‌اکسید تیتانیم (آناتاز و روتایل[9]) مشاهده شده‌است که به‌تولید گونه‌های اکسیژن واکنشگر (ROS) مرتبط است [173]. بیشترین نتیجهٔ تطبیقی تولید ROS در سلول‌های اپیتلیال و فیبروبلاست ریهٔ انسان بود. نتایجی‌که در مرجع

1- Ames
2- Ag-Np
3- Au-Np
4- Nickel nanoparticles
5- Hansen et al
6- Rhabdomysarcoma
7- Cell trafficking
8- Pro-oxidative
9- Anatase or Rutile

[174] ارائه شده‌اند، پیشنهاد می‌کند که در واکنش‌پذیری ذرات دی‌اکسید تیتانیم مختلف براساس ترکیب‌بندی ساختار بلوری (آناتاز یا روتایل) در مقابل TiO_2 غیربلوری و اندازه‌های بزرگتر از ۱۰ میکرون تفاوت وجود دارد [174].

در مطالعه‌ای که توسط پارک و همکارانش[1] [171] انجام شد، محققان نشان دادند که نانوذرات متشکل از روی، نقره و آلومینیوم سمیت مشابهی را در سلول‌های آلوئولی انسان نشان دادند. علاوه‌براین، مطالعات همه‌گیری انسانی[2] ارتباط بین مواجههٔ نانوذرهٔ فلزی از طریق استنشاق و شروع لنفوم هوچکین[3] را پیشنهاد کردند [139]. به‌استثنای القاء تومور در اثر التهاب مزمن و وضعیت اضافه بار ریه (به زیربند ۹-۳-۴ مراجعه شود)، در مورد سرطان‌زایی ناشی از نانوذرات اطلاعات کمی وجود دارد.

به‌طورکلی، یک نتیجهٔ منفی در سنجش سمیت‌ژنی باید با دقت بررسی شود. برای رد اثر مستقیم ژنوتوکسیک، موضوع مهم، مواجههٔ بالقوهٔ بخش سلولی هدف (هسته) در شرایط برون‌تن و/یا بافتی در مطالعات درون‌تن است. بااین‌حال، باید توجه داشت که اثرات غیرمستقیم (برای مثال ناشی از القاء توسط ROS) همچنین می‌توانند مسئول سمیت‌ژنی باشند.

۹-۳-۲ آزمون‌های سمیت‌ژنی برون‌تن

آزمون جهش معکوس باکتریایی (ISO 10993-3) که در آزمون سمیت‌ژنی مورداستفاده قرار می‌گیرد، ممکن است به دلیل عدم‌اطمینان از دریافت به‌وسیلهٔ نانواشیاء و بنابراین مواجههٔ DNA، برای آزمون جهش‌زایی نانواشیاء مناسب نباشد [57] [58] [175]. بااین‌حال، تعدادی نانواشیاء برای ورود به سالمونلا تیفی‌موریوم[4] استفاده‌شده در سنجش، جهش معکوس باکتریایی Ames نشان داده‌شده‌اند [176]. جهش‌های ژنی ضعیفی در سویه‌های سالمونلا TA102، TA104، YG3003 به‌وسیله C60 در پلی‌وینیل‌پیرولیدون[5] پرتودیده در نور مرئی ایجاد شده‌است [177]. مشکل در سنجش‌های جهش باکتریایی، تفسیر (و نتیجه‌گیری) هنگام دستیابی به نتیجه منفی است.

برای انجام آزمون سمیت‌ژنی نانواشیاء، سامانه‌های سلولی پستانداران به‌دلیل توانایی‌شان در برداشت نانواشیاء توصیه می‌شوند. آزمون‌های زیر در ارزیابی سمیت‌ژنی نانومواد در شرایط برون‌تن به‌طورمعمول استفاده می‌شوند:

- آزمون جهش ژنی در سلول‌های پستانداران در شرایط برون‌تن (سنجش *tk* لنفوم موشی، MLA)[6] یا سنجش جهش هایپوزانتین-گوانین فسفوریبوزیل‌ترانسفراز (HPRT)[7]. سنجش MLA توانایی تشخیص هردو نوع جهش ژنی و آسیب کروموزومی (تشکیل کلونی‌های بزرگ و کوچک) را دارد.
- سنجش میکرونوکلئوس برون‌تن برای تشخیص آسیب ژنتیک سلولی همراه با سنجش جهش ژنی (به‌عنوان مثال HPRT) یا سنجش لنفوم موشی با تشخیص تغییرات توالی در مقیاس کوچک (جهش‌های نقطه‌ای).

1- Park et al
2- Human epidemiology studies
3- Hodgkins lymphoma
4- *Salmonella typhimurium*
5- Polyvinylpyrrolidone
6- (The mouse lymphoma *tk* assay, MLA)
7- Phosphoribosyltransferase (HPRT) mutation assay

- سنجش کامت (سنجش ژل الکتروفورز تک‌سلولی) برای تشخیص انواع گوناگون آسیب DNA (برای مثال، شکستگی‌های رشتهٔ تک و دوتایی DNA، بازهای اکسیدشده و پیوندهای عرضی DNA) بسته به شرایط سنجش، برای مثال شکستگی‌های رشته دوتایی کامت خنثی هستند؛ شکستگی‌های تک‌رشته، کامت قلیایی هستند؛ آسیب اکسیداتیو به افزودن آنزیم‌ها بستگی دارد.

در آزمون سمیت‌ژنی برون‌تن، ممکن است چالش‌های مشابه آنچه در زیربند ۹-۲ شرح داده‌شد، وجود داشته باشد. علاوبراین، برخی موضوعات خاص برای درنظر گرفتن وجود دارد.

اضافه‌کردن مقدار کسرهای متابولیک S9 کبدی[1] بستگی به مادهٔ پایه، پوشش و افزودنی‌های دیگر موجود در نانوماده دارد. درحالی‌که ممکن است ذرات معدنی تحت فعال‌سازی متابولیک نباشند، سایر مواد ممکن است، باشند. برای آزمون برخی نانواشیاء معدنی (برای مثال نانواشیاء اکسید فلزی)، به‌دلیل اینکه ترکیبات شیمیایی نانوشیء ممکن است متابولیزه نشوند، افزودن کسرهای متابولیک S9 کبدی در سنجش‌های برون‌تن شاید ارزشی نداشته باشد. بااین‌حال، برای نانومواد که حاوی ترکیبات آلی یا عوامل شیمیایی (برای مثال، نانومواد با پایهٔ پلیمرکربنی) هستند، دگرگونی‌های متابولیکی می‌تواند رخ دهد. علاوه‌براین، وجود S9 یا پروتئین‌های دیگری مثلاً در سرم، می‌تواند سطح نانواشیاء را پوشانده و درنتیجه بر دریافت و واکنش‌پذیری آنها تأثیر بگذارند. بنابراین، باید در افزودن کسر متابولیک S9 کبدی توجه شود.

آزمون میکرونوکلئوس می‌تواند برای آزمون نانوماده استفاده شود. وقتی برای شناسایی سلول‌هایی که تقسیم شده‌اند پروتکل نیاز به استفاده از سیتوکالازین B (cyt-B)[2] دارد، شخص باید تعیین کند که اندوسیتوز و/یا اگزوسیتوز نانومواد تحت‌تأثیر سیتوکالازین B (cyt-B) نیست یا از یک نسخهٔ متوالی از سنجشی که cyt-B پس از دورهٔ مواجهه و دریافت بالقوه اضافه می‌شود، استفاده کند. مشخص است که cyt-B می‌تواند بر برداشت سلولی نانواشیاء اثر بگذارد [178] [179].

۹-۳-۳ آزمون‌های سمیت‌ژنی درون‌تن

هنگامی‌که انجام آزمون درون‌تن لازم باشد، برای راه اندازی آزمون باید از روش‌های مناسبی استفاده شود تا نانوشیء مورد آزمون به ارگان هدف برسد. اگر نتوان این موضوع را نشان داد، برای تأیید عدم سمیت‌ژنی درون‌تن ممکن است به آزمون دومی در شرایط درون‌تن در ارگان هدف دیگری که بتوان دریافت را نشان داد، نیاز باشد. از مطالعات سمیت تحت حاد و/یا تحت مزمن در شرایط درون‌تن می‌توان برای تعیین توزیع نانواشیاء استفاده کرد. این اطلاعات توزیع بافتی می‌تواند راهنمای انتخاب آزمون سمیت‌ژنی درون‌تن باشد تا از ارتباط اندام موردآزمون با توزیع و تجمع نانواشیاء اطمینان حاصل شود. یک چالش در سنجش سمیت‌ژنی درون‌تن می‌تواند این باشد که اندام هدف در معرض نانواشیاء موردمطالعه قرار نگرفته باشد.

پیشنهاداتی برای ترکیب آزمون سمیت‌ژنی با سایر آزمون‌های درون‌تن شرح داده شده‌اند [180] [181].

1- Liver S9 metabolic fractions
2- Cytochalasin B

توصیه می‌شود در هر پروتکل مطالعه، به مسیر مواجهه در جمعیت انسانی موردنظر توجه شود و مواجههٔ اندام‌های هدف نشان داده‌شوند. می‌توان از نتایج مطالعات توکسیکوکینتیک‌ها برای نشان‌دادن مواجههٔ اندام استفاده کرد.

از آزمون‌های زیر معمولاً برای ارزیابی سمیت‌ژنی درون‌تن استفاده می‌شود:

- آزمون میکرونوکلئوس در اریتروسیت‌ها یا مغز استخوان جونده؛
- آنالیز کروموزومی در مغز استخوان جونده؛
- آنالیز شکست رشته DNA (سنجش کامت درون‌تن).

انتخاب سامانهٔ آزمون مناسب باید توجیه و مستند شود.

هنگامی‌که از سایر سامانه‌های آزمون درون‌تن برای به‌دست آوردن اطلاعات بیشتر در مورد سمیت‌ژنی استفاده می‌شود، تصمیم‌گیری باید توجیه و با استفاده از منطق مبتنی بر شواهد مستند شود.

در هر سنجش سمیت‌ژنی درون‌تن مانند روش ژل تک‌سلول (سنجش کامت) توصیه می‌شود اندام‌های هدف براساس مطالعات توکسیکوکینتیک و/یا مطالعات تحت مزمن درون‌تن شناسایی شوند.

چندین مدل حیوانی تراریخته برای تعیین آسیب DNA پس از مواجهه درشرایط درون‌تن موجود است (OECD TG 488,2013). یکی از این مدل‌ها، مدل موش تراریخته مدلLac Z[1] است که برای ارزشیابی سمیت‌ژنی نانواشیاء TiO_2 درشرایط درون‌تن استفاده شده‌است [182]. مدل متشکل از موش سوری C57BI/6 حاوی پلاسمید pUR288 (حاوی ژن گزارشگر LacZ) است که در توالی‌های سر-به-دم به‌صورت هوموزیگوت[2] بر هر دو کروموزوم‌های ۳ و ۴ قرار داده‌شده‌اند [182] [183]. این مدل موشی، اجازهٔ ارزیابی جهش‌زایی در چندین اندام را می‌دهد و آن را به یک مدل درون‌تن ارزشمندی برای بررسی اثرات ژنوتوکسیک و سازوکارهای ترمیم پس از مواجهه با عوامل شیمیایی تبدیل می‌کند.

سایر مدل‌های تراریخته ذکرشده در OECD TG 488 که داده‌های کافی برای پشتیبانی از استفادهٔ آنها در این استاندارد موجود است، عبارتند از: باکتریوفاژ LacZ موشی (Muta™ Mouse)[3] ؛ پلاسمید LacZ موشی؛ موش سوری صحرایی gp delta (gpt و-spi)؛ موش سوری و صحرایی Lacl (Big Blue®)[4]. سنجش انتخاب cII مثبت می‌تواند برای ارزشیابی جهش‌ها در مدل‌های موشی Big Blue® و (Muta™) استفاده شود. جهش‌زایی در مدل‌های جونده تراریخته معمولاً به‌عنوان فراوانی جهش، ارزیابی می‌شود؛ درصورت امکان، آنالیز مولکولی جهش‌ها می‌تواند اطلاعات بیشتری را فراهم کند (OECD 488).

۹-۳-۴ سرطان‌زایی

1- Lac-Z model transgenic mouse model

2- Head-to-tail sequences homozygously

۳ - Muta ™ Mouse علامت تجاری HRP Inc است. این اطلاعات برای سهولت کاربران این استاندارد ارائه شده‌است و به‌عنوان تأیید نام تجاری محصول نیست. محصولات معادل درصورتی‌که ثابت شود نتایج مشابه ایجاد می‌کنند، می‌توان از آنها استفاده کرد.

۴- Big Blue® نام تجاری Stratagene است. این اطلاعات برای سهولت کاربران این استاندارد ارائه شده است و به‌عنوان تأیید نام تجاری محصول نیست. محصولات معادل درصورتی‌که ثابت شود نتایج مشابه ایجاد می‌کنند، می‌توان از آنها استفاده کرد.

ژنوم انسان به‌طور دائم در معرض مواجهه با عوامل آسیب‌رسان DNA مانند گونه‌های اکسیژن واکنشگر، نور فرابنفش و مواد شیمیایی ژنوتوکسیک قرار دارد [184]. مطالعات متعددی درشرایط برون‌تن و درون‌تن معلوم کرده‌اند که نانومواد آسیب و جهش‌های DNA را القاء می‌کنند. پیوند بین سمیت‌ژنی و سرطان به‌خوبی شناخته شده‌است، بنابراین نتایج این مطالعات برای پیش‌بینی سرطان‌زایی نانومواد مفید هستند [185]. همانطورکه برای نانواشیاء شبه‌میله پیشنهاد داده‌شد [192] [193]، ممکن است التهاب مزمن نقش کلیدی داشته باشد زیرا می‌تواند منجر به افزایش سطوح عوامل اکسیدکننده شود. اگرچه درمورد سمیت‌ژنی اطلاعات قابل‌توجهی، ازجمله نتایج متناقض برای بسیاری از نانومواد، در دسترس است (به زیربند ۹-۳ مراجعه شود)، اما سطح فهم سرطان‌زایی نانوماده محدود است.

به‌خوبی شناخته شده‌است که سمیت‌ژنی و التهاب مزمن می‌توانند منجربه سرطان‌زایی شوند. همچنین گزارش شده‌است که ماندگاری‌زیستی و التهاب مزمن در القاء تومورهای ریه شناخته شده‌اند [186] [187]. این اثرات ممکن است به‌علت آنچه به‌عنوان «اضافه بار» دُزدهی تلقی می‌شود، باشند [188] [189] [190] [191]. ماندگاری‌زیستی عمدتاً از طریق ترکیب‌بندی شیمیایی اندازه و شکل نانواشیاء (برای مثال فیبرها) تعیین می‌شوند. نشان داده شده‌است که برخی نانومواد مانند TiO_2 و نانولوله‌های کربنی (CNTs)[1] در پیشرفت تومور در مدل‌های حیوانی نقش دارند [193]. سازوکارهای احتمالی شامل آسیب‌های DNA و تولید ROS در طی التهاب هستند.

اگر مواجهه انسان زیاد یا مزمن باشد باید ارزشیابی ریسک سرطان‌زا درنظر گرفته شود. رایج‌ترین آزمون‌های درون‌تن در ارزیابی سرطان‌زایی بالقوهٔ مواد شیمیایی، آزمون سرطان‌زایی شرح داده‌شده در EC B.32 و OECD 451 و آزمون سمیت مزمن/سرطان‌زایی ترکیب‌شده در EC B.33 و OECD 453 است. درمورد افزاره‌های پزشکی، آزمون سرطان‌زایی در استاندارد ISO 10993-3 شرح داده شده‌است. علاوه‌براین، حیوانات تراریخته‌ای مانند مدل موشی $rasH_2$ می‌تواند به‌عنوان یک آزمون جایگزین کوتاه مدت در مقایسه با مطالعهٔ سرطان‌زایی دو ساله استفاده شود [194] [195].

بااین‌حال باید توجه داشت که چون مناسب بودن چنین آزمون‌هایی برای نانواشیاء نشان داده نشده‌است، استفاده از این آزمون‌ها باید مورد به مورد ارزشیابی شوند.

۹-۳-۵ سمیت تولیدمثلی

با آنکه داده‌های سمیت تولیدمثلی نانومواد نادر هستند، تمایل زیادی به‌بررسی اثرات بالقوهٔ آنها در دستگاه تولیدمثلی، سلول‌های لایهٔ ژرمینال، رشد ونمو جنینی و فرزندان آنها وجود دارد. چون نانوذرات قادر به نفوذ از طریق سدهای زیست‌شناختی هستند، احتمال عبور از سامانهٔ سدهای تولیدمثلی (برای مثال سد خونی- بیضه و سد جفتی) با تأثیر بالقوه بر انرژی حیاتی اسپرم و نیز کارکرد رشد و نمو جنینی وجود دارد. این موضوع تشخیص داده شده‌است که برخی نانواشیاء با توجه به نوع نانوشیء و شرایط/ مدل‌های آزمایشی، از سد زیست‌شناختی بافت‌های تولیدمثلی مانند سد خونی- بیضه و سد جفتی عبور می‌کنند [196]. در یک بررسی مروری که اخیراً انجام شد، نتیجه‌گیری شد که این فرضیه محتمل است که ممکن است نانوذرات از مجرای تنفسی به جفت و جنین منتقل شوند اما اثرات سوء به پاسخ‌های التهابی استوک می‌توانند به‌طور ثانویه بروز کنند [197]. همچنین آسیب مادهٔ ژنی از طریق برهم‌کنش

1- Carbon nanotubes

با مولکول‌های DNA می‌تواند منجر به جهش‌هایی شده و تولید مثل و رشدونمو نسل‌های بعدی را تحت‌تأثیر قرار دهد.

تعیین اینکه آیا آزمون سمیت تولیدمثلی موردنیاز است، همانطوری‌که در ارزیابی ریسک ذکر شد می‌تواند براساس مواجهه و کاربرد افزارهٔ پزشکی باشد. اگر انجام این آزمون‌ها بر اساس ارزیابی ریسک افزارهٔ پزشکی لازم باشد، ارزیابی سمیت تولیدمثلی نانومواد مورداستفاده باید مطابق با الزامات استاندارد ISO 10993-3 درنظر گرفته شود.

وقتی‌که شواهد کافی و مناسب نشان می‌دهند که نانوماده یا متابولیت‌هایش به اندام‌های سامانهٔ تولیدمثلی نمی‌رسند، هیچ‌گونه آزمون سمیت تولیدمثلی لازم نیست. این شواهد می‌توانند بر مبنای مطالعات جذب، توزیع، متابولیسم و دفع (ADME) آنها باشد.

هنگامی‌که هیچ‌گونه شواهدی برای ردکردن تماس با اندام‌های سامانهٔ تولیدمثلی وجود نداشته باشد، انجام آزمون به‌ویژه درموارد زیر باید درنظر گرفته شود:

الف- افزاره‌های پزشکی که در تماس دائمی یا طولانی‌مدت باشند که احتمال دارد در تماس مستقیم با بافت‌های تولیدمثلی، رویان یا جنینی وجود داشته باشد؛

ب- افزاره‌های پزشکی پوشش داده‌شده با روش‌های فیزیکی اعمال انرژی[1]؛

پ- افزاره‌های حاوی نانومواد/ نانوذرات قابل‌فروشویی یا قابل‌جذب که حذف کامل آنها نشان داده نشده‌است.

لازم به ذکر است که استفاده از برخی روش‌های مواجهه توصیه نمی‌شود زیرا آنها می‌توانند با رشدونمو قبل از تولد تداخل کنند. برای مثال، تجویز داخل صفاقی می‌تواند باعث شود که نانواشیاء موردآزمون به‌طور مستقیم در خود رحم تزریق شوند یا از دیوارهٔ رحم عبور کرده و مستقیم روی رویان/ جنین درحال رشد تأثیر بگذارند. همچنین، مواجههٔ استنشاقی «فقط بینی»[2] ممکن است برای حیوانات مونث باردار مناسب نباشد به‌دلیل این واقعیت که حیوانات در شرایط استرس‌زا نگهداری می‌شوند و دسترسی به آب و غذا ندارند [59].

برای جمع‌آوری اطلاعات اولیه درمورد اثرات سمیت بالقوهٔ تولیدمثلی نانوماده می‌توان علاوه بر استاندارد ISO 10993-3 از OECD 421 نیز استفاده کرد. همچنین نتایج آزمون می‌توانند برای ارزیابی مخاطرهٔ اولیه استفاده شوند و می‌توانند در فرایند تصمیم‌گیری در مورد لزوم انجام آزمون‌های بیشتر یا عدم آن مفید باشند. اگر آزمون‌های بیشتری موردنیاز باشد، با توجه به نتایج آزمون غربالگری آنها، باید مطابق OECD 414، OECD 415، OECD 416 یا OECD 422 انجام شوند.

۹-۴ سمیت سیستم ایمنی[3]، تحریک‌زایی[4] و حساسیت‌زایی[5]

۹-۴-۱ ملاحظات کلی

1- Energy-depositing
2- Nose only
3- Immunotoxicity
4- Irritation
5- Sensitization

استاندارد ISO/TS 10993-20 مروری کلی بر ایمونوتوکسیکولوژی را با ارجاع خاص به سمیت سیستم ایمنی بالقوهٔ افزاره‌های پزشکی ارائه می‌کند.

استاندارد ISO 10993-10 روش‌اجرایی ارزیابی افزاره‌های پزشکی و اجزای تشکیل‌دهندهٔ آنها را با توجه به توانایی بالقوهٔ آنها در ایجاد تحریک‌زایی و حساسیت‌زایی پوستی شرح می‌دهد. این استاندارد حاوی:

- ملاحظات پیش‌از آزمون تحریک‌زایی شامل روش‌های درون‌رایانه‌ایی و روش‌های برون‌تن برای مواجههٔ پوستی؛
- جزئیات روش‌های اجرایی آزمون درون‌تن (تحریک‌زایی و حساسیت‌زایی)؛
- عوامل کلیدی در تفسیر نتایج.

واکنش‌های التهابی و آلرژیک/ خودایمنی می‌توانند ناشی از مواجههٔ سیستم ایمنی با نانواشیاء باشند. وسعت و نوع واکنش‌ها به مشخصه‌های آنتی‌ژنیک نانواشیاء، قدرت همیار[1] آنها، اثر التهابی و توانایی آنها در فعال‌کردن سیستم کمپلمان بستگی دارد. پاسخ ایمنی می‌تواند بعد از آن سرکوب یا تحریک شود.

۹-۴-۲ سمیت سیستم ایمنی

بیشتر نانومواد‌ی که تا امروز مطالعه شده‌اند، نانواشیایی هستند که به‌دنبال ورود به سامانهٔ گردش‌خون سرانجام به سلول‌های MPS (برای مثال ماکروفاژها، سلول‌های درخت‌سانی[2] یا سلول‌های لانگرهانس) می‌رسند که نقش اساسی در سیستم ایمنی بدن ایفاء می‌کنند. بنابراین، سمیت بالقوهٔ سیستم ایمنی نانومواد نیاز به ملاحظات خاص دارد. به‌طور کلی، سمیت ایمنی با آزمون سمیت دُز مکرر (برای مثال ۲۸ روزه یا ۹۰ روزه) ارزشیابی می‌شوند که در طول آن دوره اولین علائم سرکوب سیستم ایمنی و/ یا تحریک سیستم ایمنی می‌تواند تشخیص داده‌شوند. ملاحظات کلی برای آزمون سسیستم ایمنی افزاره‌های پزشکی در استاندارد ISO/TS 10993-20 شرح داده شده‌اند. برای افزاره‌های پزشکی، تحقیقات مربوط به سمیت سیستم ایمنی معمولاً شامل مطالعات کاشت طولانی‌مدت (ISO 10993-6 و ISO 10993-11) است. لازم است برای نانواشیاء همانطورکه برای نانونقره در مرجع [198] گزارش شده‌است، مسیرهای جایگزین مواجهه مانند تزریق وریدی در مواجههٔ سیستمیک درنظر گرفته شود.

به‌علت پیچیدگی سیستم ایمنی، مدل‌های برون‌تن روشی مطمئن و برتر را برای مطالعهٔ کارکرد سلول ایمنی ارائه می‌دهند. تأثیر نانومواد بر کارکرد سلول ایمنی را می‌توان با ارزشیابی مسیرهای سیگنالینگ، مانند «فاکتور هسته‌ای مسیر B کاپا»[3]، در رده‌های اختصاصی سلول ایمنی بررسی کرد [199] [200]. تعدادی از سنجش‌های برون‌تن توسط آزمایشگاه مشخصه‌یابی نانوفناوری موسسهٔ ملی سرطان[4] با اختصاص به مطالعات نانوذرات و تأثیر آنها بر سلول‌های ایمنی منتشر شده‌اند[5]. این سنجش‌ها برای ارزیابی پارامترهایی مانند فاگوسیتوز، کموتاکسی و تولید اکسید نیتریک توسط ماکروفاژها به‌علاوه بسیاری از نقاط نهایی دیگر درنظر گرفته شده‌اند.

1- Adjuvant potency
2- Dendritic cells
3- Nuclear factor kappa b pathway
4- National Cancer Institutes Nanotechnology Characterization Laboratory
5- http://ncl.cancer.gov/working_assay-cascade.asp

چندین مطالعهٔ مروری در مورد اثرات نانومواد بر سیستم ایمنی بدن موجود است [82] [207] [208] [209]. از نانواشیاء به‌عنوان هاپتن یا حامل‌های هاپتن استفاده شده‌است که نشان می‌دهد آنها قادر به انجام فعالیت همیاری موثر بر سیستم ایمنی بدن هستند [201] [202] [203] [204]. اثرات نانوذرات نقره بر سیستم ایمنی حساس‌ترین پارامتر سمیت سیستمیک بود که پس از تزریق وریدی به مدت ۲۸ روز معلوم شد [198] [205].

برای ارزشیابی سمیت سیستم ایمنی مواد شیمیایی، در سال ۲۰۰۷ نسخه‌ای از روش‌ها به‌طور ویژه به‌مدل‌های حیوانی اختصاص داده‌شد [206]. سازمان بهداشت جهانی (WHO)[1] سه سند معیارهای بهداشت محیط[2] را در برنامه بین‌المللی ایمنی شیمیایی مرتبط با سمیت ایمنی [EHC 180][3]، حساسیت‌زایی [EHC 212][4] و خودایمنی [EHC 236][5] منتشر کرده است. سند [EHC 244][6] در مورد سمیت ایمنی نانومواد نیز تدوین شده‌است.

۹-۴-۳ حساسیت‌زایی

نانواشیاء و نانومواد ممکن است منجربه حساسیت‌زایی شوند؛ بااین‌حال، حساسیت‌زایی بالقوهٔ آنها نسبتاً ناشناخته است. علاوه‌بر این، برهم‌کنش نانوشیء با پروتئین‌ها منجر به تشکیل کمپلکس‌های نانوشیء/ پروتئین می‌شود که به‌صورت اثر ثانوی می‌تواند موجب حساسیت‌زایی شود [210]. به‌علاوه ممکن است لازم باشد واکنش‌های بالقوهٔ ایمنی برضد پروتئین به‌عنوان بخشی از کمپلکس نانوشیء/ پروتئین درنظر گرفته شوند. درمورد تشکیل تاج پروتئین، به زیربند ۸-۲-۲ نیز مراجعه شود. اکنون تنها نوعی از پاسخ (افزایش) حساسیتی که برای نانواشیاء ثبت شده‌است، آلرژی‌کاذب[7] براساس فعال‌شدن کمپلمان است (CARPA، به زیربند ۹-۵-۲ مراجعه شود).

درحال‌حاضر، مقاله‌های موجود به‌طورعمده عدم توانایی نانوذرات در حساسیت‌زایی را شرح می‌دهند [211] [212] [213] [214] [215] [216] [217]. از سنجش‌های مختلف شرح داده‌شده در استاندارد ISO 10993-10 که شامل آزمون بوهلر (BT)[8]، آزمون بیشینه‌سازی خوکچهٔ هندی (GPMT)[9]، سنجش گرهٔ لنفاوی موضعی (LINA)[10]، آزمون پچ انسانی (HPT)[11] و آزمون بیشینه‌سازی خوکچهٔ هندی اصلاح‌شده (GPMT همراه با کاربرد سطح)[12] است، استفاده می‌شود. در این سنجش‌ها از نانوپوسته‌های طلا (۱۵۰ nm)، نانوذرات نقره (۱۰ nm)، نانوذرات اکسید روی (۲۰ nm)، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم (۲۰ nm تا ۱۰۰ nm)، دانه‌های لاتکس پلی‌استیرن (۵۰ nm)، فولرن‌های C60 (۱ nm)، نانوذرات دی‌اکسید سیلیکون (۷ nm تا ۱۰ nm) و نانولوله‌های کربنی (۱٫ ۸ nm تا۶۰ nm) استفاده شده است.

1- World Health Organization
2- Environmental Health Criteria
3- Immunotoxicity associated with exposure to chemicals, principles methods for assessment (EHC 180,1996)
4- Principles and methods/assessing allergic hypersensitization associated with exposure to chemicals (EH 212,1999)
5- Principles and methods for assessing autoimmunity associated with chemicals (EHC 236,2006)
6- Principles and methods to assess the risk of immunotoxicity associated with exposure to nanomaterials (EHC 244,2015)
7- Pseudoallergy
8- Buehler test
9- Guinea pig maximization test
10- Local lymph node assay
11- Human patch test
12- Modified GPMT

با توجه به‌کارکرد ممانعتی پوست، شاید آزمون‌های حساسیت‌زایی GPMT اصلاح‌شده، HPT، LLNA و BT برای بسیاری از نانومواد مفید نباشند [218]. ممکن است نانواشیاء در آزمون حساسیت‌زایی، به سلول‌ها و اندام‌های هدف، سلول‌های درخت‌سانی به پوست و گرهٔ لنفاوی تخلیه‌کننده وارد نشوند. بنابراین، یک نتیجه منفی به‌عنوان اینکه نانومواد خواص حساسیت‌زایی ندارند، نمی‌تواند تفسیر شود؛ این نتیجهٔ منفی می‌تواند به‌علت ناتوانی نانواشیاء در نفوذ به سطح پوست باشد. در روش GPMT اصلاح‌شده، مواد آزمون هم‌زمان با «ادجوانت (همیار) کامل فروند»[1] تزریق نمی‌شوند اما در محل (التهاب) که FCA تزریق می‌شود، به‌صورت موضعی قرار داده می‌شوند [58] [219]. تحقیقات بیشتری برای کشف این موضوع لازم است. بنابراین درصورت تایید، ممکن است لازم باشد سنجش‌های جدید حساسیت‌زایی ویژهٔ نانوماده توسعه پیدا کنند.

تعدادی سنجش‌های حساسیت‌زایی در شرایط برون‌تن وجود دارد که در پاسخ به ممنوعیت انجام آزمون اجزاء مواد آرایشی بر روی حیوان و قانون REACH[2] که به‌طور اختصاصی به روش‌های آزمون غیرحیوانی می‌پردازد، در اروپا توسعه پیدا کرده‌اند. از جمله مواردی‌که به‌طور گسترده آزمون شده‌اند، سنجش واکنش‌پذیری مستقیم پپتید (DPRA)[3]، آزمون فعال‌سازی ردهٔ سلولی انسانی (h-CLAT)[4]، KeratinoSens و SenCeeTox هستند. تا این زمان واضح نیست که آیا این سنجش‌های برون‌تن توانایی ارزیابی حساسیت‌زایی بالقوهٔ نانومواد مهندسی‌شده را دارند یا خیر؟

۹-۴-۴ تحریک‌زایی

مطابق استاندارد ISO 10993-1، برای برآورد تحریک‌زایی بالقوهٔ افزاره‌های پزشکی، مواد و/ یا عصاره‌های آنها، باید آزمون‌های تحریک‌زایی (از قبیل واکنش‌پذیری داخل‌جلدی) با استفاده از محل مناسبی برای استعمال مانند پوست، چشم و غشای مخاطی در یک مدل مناسب درنظر گرفته شود. این الزام همچنین برای نانومواد قابل‌اجرا است. مطابق استاندارد ISO 10993-10 آزمون(ها) انجام‌شده باید از نظر مسیر (پوست، چشم، مخاط) و دورهٔ مواجهه یا تماس مناسب باشد.

خواص مختلف نانواشیاء می‌تواند بر دریافت آنها پس از مواجههٔ پوستی، چشمی یا مخاطی اثر کند؛ این خواص شامل (اما محدود به اینها نیست) اندازه، شکل، مساحت سطح، بار سطح، انرژی/ فعالیت سطح، انحلال‌پذیری، وضعیت انبوهگی، بس‌پراکندگی و کینتیک‌های انحلال‌یونی است [218]. نانواشیاء بزرگ‌تر کمتر احتمال دارد که به پوست نفوذ کنند، درحالی‌که همتایان کوچک‌تر آنها می‌توانند به لایه‌های عمقی‌تر اپیدرم، درم و لایه‌های پایین‌تر سلولی دسترسی پیدا کنند [96] [220] [221]. علاوه‌براین، اندازهٔ موثر (یعنی شعاع هیدرودینامیکی) نانواشیاء عامل‌دارشده نیز باید موردملاحظه قرار گیرد، چون این پارامتر برهم‌کنش‌های آنها با کراتینوسیت‌ها را که ممکن است پس از

1- Freunds complete adjuvant
2- Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction
3- Direct peptide reactivity assay
4- Human cell line activation test

مواجهه بر نفوذ تأثیر بگذارد، تعیین خواهد کرد. همچنین شکل می‌تواند در نفوذ پوستی اثر داشته باشد، نانواشیاء کروی نفوذ بیشتری از نانواشیاء کشیده‌شده[1] را نشان می‌دهند [222].

ترکیب‌بندی شیمیایی نانوماده اصلی همچنین می‌تواند روی تحریک‌زایی بالقوهٔ ناشی از نانومواد تاثیر بگذارد. برخی تحقیقات نشان داده‌اند که نانواشیاء طلا (Au) به داخل لایه‌های عمقی‌تر پوست نفوذ کردند در حالی‌که نانوذرات نقره (Ag) [223] و دی‌اکسید تیتانیم (TiO_2) در همان لایه شاخی باقی ماندند [224]. شواهدی وجود دارند مبنی بر اینکه نانواشیاء خاصی (به‌عنوان مثال درخت‌سان‌های کربنی) تاحدی قادر به نفوذ به پوست هستند [225]. بااین‌حال، هنگام آزمون در شرایط درون‌تن با استانداردهای OECD TG 404 و OECD TG 405 به‌ترتیب مشخص شد که نانولوله‌های کربنی تک‌دیواره حداقل تحریک‌زایی پوستی و چشمی دارند [216]. همچنین ترکیب‌بندی سطح نانوشیء برای نفوذ بالقوهٔ پوستی مهم است. به‌عنوان مثال گزارش شده‌است که بار سطح بر نفوذ نقطهٔ کوانتومی و رهاشدن سیتوکین تأثیر می‌گذارد [226]. در واقع، عامل‌دار کردن یا مشتق‌سازی پوشش نانوشیء می‌تواند علت ایجاد سمیت باشد، نه نانوشیء به‌تنهایی [173] [227]، بنابراین هنگام طراحی روش‌های آزمون و تفسیر نتایج آزمون باید مراقب بود.

بیشتر داده‌های منتشر شده پیشنهاد می‌کنند که پوست سالم و حتی آفتاب‌سوخته مانع خوبی در برابر نفوذ نانواشیاء است و نفوذ پوستی فراتر از لایه‌های اپیدرمی رخ نمی‌دهد [228] [229] [230] [231] [232] [233]. بااین‌حال ممکن است فولیکول‌های مو، غدد عرق و سطوح آسیب‌دیده ناشی از آسیب مکانیکی (مثل بریدگی، سایش)، شرایط پوستی (مثل درماتیت، پسوریازیس، اگزما)، شرایط پاتولوژیک (مثل عفونت، التهاب) و آسیب نوری (مثل آفتاب‌سوختگی) شاید به دریافت نانوماده از طریق پوست مستعدتر باشند. علاوه‌براین استفاده از برخی اجزای آرایشی می‌توانند نفوذ پوستی را افزایش دهند [234].

برای مواد یا افزاره‌هایی که به‌جز پوست سالم با بیمار تماس دارند، برای ارزیابی واکنش موضعی بافت به نانومواد، باید آزمون واکنش‌پذیری داخل‌پوستی درنظر گرفته شود. در مواردی‌که ارزیابی تحریک‌زایی با آزمون‌های پوستی یا مخاطی نامناسب است (به‌عنوان مثال، مواردی که افزاره‌های پزشکی کاشته می‌شوند یا تماس خونی دارند) این آزمون کاربردی است. نانواشیاء پس از ورود به داخل پوست، از لایهٔ شاخی عبور می‌کنند و بنابراین ممکن است نانواشیاء در فیبروبلاست‌ها پتانسیل تحریک‌زایی بیشتری نسبت به مواجههٔ پوستی داشته باشند [235] [236] [237] [238]. شاید این آزمون در مواردی‌که نانومواد آبگریز هستند نیز مفید باشد (به استاندارد ISO 10993-10 مراجعه شود). تحریک‌زایی برای سایر مسیرهای مواجهه بالینی می‌تواند از طریق استعمال نانومواد به‌طور مستقیم در بخش مربوطه از سطح بدن ارزیابی شود.

طبق طرح‌کلی متداول ارائه‌شده در استاندارد ISO 10993-10، آزمون‌های تحریک‌زایی مخاطی در پیوست B به عنوان آزمون‌های اختصاصی تحریک‌زایی فهرست شده‌اند. انتخاب این روش‌های آزمون باید برمبنای استدلال منطقی شرایط خاص مصرف و مسیرهای مواجههٔ مواد و افزاره‌ها استوار باشد. مطالعات انجام‌شده بر روی تعدادی نانواشیاء نشان داده‌اند که آزمون‌های تحریک‌زایی چشمی در مقایسه با آزمون‌های تحریک‌زایی پوستی در تشخیص اثرات

1- Elongated nano-objects

مخرب بالقوهٔ ناشی از این مواد قابل‌مقایسه یا دارای حساسیت بیشتری هستند [216] [239]. در مقالات منتشرشده اطلاعات کمی درمورد استفاده از سایر روش‌های تحریک‌زایی مخاطی برای آزمون نانواشیاء وجود دارد.

تلاش‌های بسیاری برای ارزشیابی و صحه‌گذاری مدل‌های تحریک‌زایی پوستی در شرایط برون‌تن به‌عنوان روش‌های جایگزین آزمون نانومواد انجام شده‌است. بااین‌حال، در انتخاب مدل‌ها و طراحی مطالعه باید ملاحظات زیادی را درنظر گرفت. درحالی‌که برخی از مطالعات نتایج معادل را از مدل‌های تحریک‌زایی پوستی و شرایط برون‌تن نشان دادند، مطالعات دیگر زوائد بالقوهٔ ایجادشده از تداخل برهم‌کنش نانوشیء با معرف‌های آزمون یا اینترلوکین‌ها را گزارش کردند. همچنین در ارزیابی نانومواد برای مقایسهٔ اثربخشی انواع مختلف مدل‌های پوستی کمبود مطالعات وجود دارد [239] [240] [241].

از سنجش نفوذپذیری و تاری قرنیهٔ گاو [BCOP][1] و آزمون EpiOcular ™ [2] تحریک‌زایی چشمی (EIT) برای ارزشیابی چندین نانومواد برای تحریک ظرفیت چشمی‌شان استفاده شد [242]. برخی از فعالیت‌های تحریکی فقط با نانونقره در آزمون EpiOcular™ تحریک‌زایی چشمی (EIT) مشاهده شد، درحالی‌که در BCOP، نتایج متغیری ذکر شد. چندین نانومواد پودری شکل خشک [اکسیدهای فلزی (ZnO، TiO_2 و CeO_2)، SiO_2 بی‌شکل و MWCNTs]، سه رنگدانهٔ آلی، کوارتز و تالک در هر دو روش منفی بودند.

۹-۵ خون سازگاری[3]

۹-۵-۱ ملاحظات کلی

توصیه می‌شود ارزشیابی خون‌سازگاری بر روی افزاره‌های پزشکی حاوی نانومواد که در تماس مستقیم یا غیرمستقیم با خون هستند، انجام شود. علاوه‌براین، حتی برای افزاره‌هایی که برای تماس با خون در نظر گرفته نشده‌اند، اگر مطالعهٔ توکسیکوکینتیک انتقال بالقوهٔ ذرات نانومقیاس‌شدهٔ آزاد ایجادشده از افزارهٔ پزشکی به گردش خون سیستمیک را نشان دهد، خون‌سازگاری باید درنظر گرفته شود.

استاندارد ISO 10993-4 الزامات کلی برای ارزشیابی برهم‌کنش‌های افزاره‌های پزشکی با خون را ارائه می‌کند. این استاندارد شرح می‌دهد که:

الف- رده‌بندی افزاره‌های پزشکی برای استفاده در تماس با خون، بر اساس نوع کاربرد و دورهٔ تماس مطابق آنچه که در استاندارد ISO 10993-1 تعریف شده؛

ب- اصول بنیادی حاکم بر ارزشیابی برهم‌کنش‌های افزاره‌های پزشکی با خون؛

پ- منطقِ انتخاب ساختار آزمون‌ها با توجه به رده‌بندی‌های اختصاصی، همراه با اصول و مبانی علمی این آزمون‌ها.

1- Bovine corneal opacity and permeability

۲- EpiOcular TM علامت تجاری MatTek Corporation است، این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده‌است و به‌عنوان تأیید نام کالا از سوی ISO نیست. درصورتی‌که بتوان ثابت کرد که محصولات معادل همان نتایج را ایجاد می‌کنند، می‌توان از آنها استفاده کرد.

3- Haemocompatibility

برهم‌کنش‌های خونی براساس فرایند اولیه یا سامانه‌ای که در آن اندازه‌گیری می‌شوند، به چندین رده‌بندی تقسیم می‌شوند: خون‌شناسی، همولیز، ترومبوز، انعقاد، فعال‌سازی پلاکتی و فعال‌سازی سیستم کمپلمان.

از این پارامترها همچنین برای ارزیابی خون‌سازگاری نانومواد، همراه با ملاحظات خاصی که در زیر بحث شده‌اند، استفاده می‌شوند. نانواشیاء به‌علت اندازه‌شان، ممکن است قادر باشند که مهاجرت کرده و به سامانهٔ گردش خون برسند، جایی‌که می‌توانند اثرات پروترومبوتیک و فعال‌سازی پلاکتی را القاء کنند. بنابراین برای مواد نانوساختاریافته، افزاره‌های حاوی نانومواد و نانواشیاء رهاشده از افزاره‌هایی که در تماس مستقیم یا غیرمستقیم با گردش خون هستند، باید ارزیابی خون‌سازگاری درنظر گرفته شود.

بسیاری از پاسخ‌ها به افزاره‌های پزشکی که می‌توانند در خون ایجاد شوند مربوط به مساحت سطح افزاره است که در تماس با خون است. بنابراین، نسبت مساحت سطح افزاره‌ها به حجم کل خون درمعرض قرار گرفته (cm^2/ml خون کامل WB) عامل مهمی برای ارزیابی خون‌سازگاری است. سایر عوامل تأثیرگذار بر برهم‌کنش‌های با خون، شامل هندسه و شیمی سطح است. با استفاده از مدل‌های مناسب برون‌تن و درون‌تن برای سنجش ایمنی برهم‌کنش مناسب خونی رده‌های ذکرشده در بالا باید آزمون دُزپاسخ با نانومواد درنظر گرفته شوند. همچنین به استاندارد ISO 10993-4 مراجعه شود.

۹-۵-۲ فعال‌شدن سامانهٔ کمپلمان

سامانهٔ کمپلمان در دفاع ایمنی ذاتی برضد عوامل غیرخودی از طریق اوپسونیزه‌شدن مواد عمل می‌کند تا امکان شناسایی و دریافت از طریق ماکروفاژها را فراهم کند. گزارش شده‌است که برهم‌کنش بین نانواشیاء و سامانهٔ کمپلمان از طریق چندین عامل از جمله اندازه، ریخت‌شناسی و سطح تنظیم می‌شود [128]. افزایش غیرطبیعی فعال‌شدن سامانهٔ کمپلمان به‌دلیل وجود مواد نانومقیاس در خون می‌تواند واکنش‌های التهابی قابل‌توجهی ایجاد کند. بنابراین فعال‌شدن کمپلمان باید به‌عنوان بخشی از ارزیابی ریسک زیست‌شناختی نانومواد درنظر گرفته شود، به‌ویژه اگر آنها برای تماس مستقیم با خون در گردش درنظر گرفته شده‌اند یا درصورتی‌که احتمال مهاجرت ذرات نانواندازهٔ آزاد به گردش خون سیستمیک وجود داشته‌باشد.

فعال‌شدن کمپلمان می‌تواند موجب واکنش افزایش‌حساسیت حاد شود [243]. به این نوع خاص از سندرم افزایش‌حساسیت، آلرژی کاذب مرتبط با فعال‌سازی C [CARPA][1] گفته می‌شود. چندین گزارش از این نوع فعال‌شدن آبشاری کمپلمان وجود دارد که توسط لیپوزوم‌های پلی‌مریزه‌شده با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)[2] و سایر مواد نانواندازه القاء می‌شود. این القاءکننده‌های CARPA شامل موارد زیر می‌باشند: داروهای لیپوزومی، حلال‌های میسلی، عوامل حاجب رادیویی، نانولوله‌های کربنی، داروهای نانویی پلیمری و لیپوزومی، وزیکول‌های با پوشش PEG و سایر آماده‌سازی‌های بر پایهٔ لیپید و کونژوگهٔ تثبیت‌شده با متوکسی PEG- فسفولیپید[3] [244] [245].

۹-۵-۳ ملاحظات ویژهٔ آزمون خون‌سازگاری

1- C-activation related pseudoallergy
2- Polyethylene glycol (peg)ylated liposomes
3- Phospholipid-methoxypeg conjugate stabilized

خون‌سازگاری یک ملاحظهٔ کلیدی برای نانومواد‌ی است که در تماس با خون هستند. به‌این دلیل که پروتئین‌های خون بلافاصله روی سطح نانواشیاء جذب سطحی می‌شوند، منجربه آبشاری از وقایعی می‌گردند که سرانجام موجب قبول یا رد افزارهٔ پزشکی می‌شوند. بسته به اندازه/ مساحت سطح و سایر مشخصه‌های ذاتی یا اکتسابی سطح، نانواشیاء می‌توانند نتایج خون‌سازگاری متغیری ایجاد کنند. درواقع گزارش شده‌است که اندازه و زبری سطح نقش مهمی در میزان برجذب پروتئین سرم خون، چسبندگی و فعال‌شدن پلاکت و کینتیک‌های انعقادی خون کامل دارد [246]، به زیربند ۸-۲-۲ نیز مراجعه شود.

هرچند موادی که دارای ساختارهای نانو روی مساحت سطح‌شان می‌توانند تاحدی به‌طور مستقیم با استفاده از روش‌های مرسوم توصیف‌شده در استاندارد ISO 10993-4 ارزشیابی شوند، ارزشیابی خون‌سازگاری نانواشیاء آزاد می‌تواند خیلی بیشتر چالش برانگیز باشد. به‌دلیل نسبت سطح/حجم بالاتر آنها نسبت به مواد توده، ممکن است پروتئین سرمی قابل‌توجهی به‌راحتی جذب سطح نانواشیاء آزاد شود که به محض ورود اجسام خارجی به سامانهٔ گردش خون، آبشاری از واکنش‌های متوالی رخ داده در خون را از حالت طبیعی خارج کند. همچنین ممکن است به‌دلیل انبوهگی/ کلوخگی بالقوهٔ نانواشیاء آزاد پس از تماس با خون، برهم‌کنش‌ها با پلاکت‌ها، فاکتورهای انعقادی و سلول‌های اندوتلیال تغییر کند. با توجه به این تداخل‌های بالقوه در شرایط برون‌تن، قبل از هرگونه نتیجه‌گیری در مورد خون‌سازگاری نانواشیاء آزاد باید توجه خاصی به تجدیدپذیری، قابلیت اطمینان و حساسیت روش‌های مورداستفاده شود. توجه داشته باشید، یک روش آزمون استاندارد برای آنالیز خواص همولیتیک نانوذرات توسط انجمن آمریکایی آزمون و مواد (ASTM E2524) منتشر شده‌است که برگرفته از روش استاندارد ASTM F756[1] است که معمولاً به‌دنبال ارزشیابی خواص همولیتیک مواد توده انجام می‌شود.

لازم به‌ذکر است که NPs می‌توانند موجب القاء فاکتورهای پیش‌التهابی[2] و پیش انعقادی[3] (به‌عنوان مثال TNF-α، IL-6، IL-8، MCP-1، فاکتور بافتی) از سلول‌های اندوتلیال شوند [247]. هر دو پتانسیل پیش‌انعقادی و پیش‌التهابی NPs می‌تواند در مدل کشت همزمان سلول‌های اندوتلیال و مونوسیت‌ها شناسایی شوند [248] [249]. بنابراین، توصیه می‌شود که علاوه بر غربالگری اساسی خون‌سازگاری، همچنین فعال‌سازی سلول‌های اندوتلیال و/یا مونوسیت‌ها به‌علاوه برهم‌کنش سلول‌های اندوتلیال، مونوسیت‌ها با NPs (برای مثال، از طریق ارزشیابی مارکرهای مولکول‌های چسبندگی سلولی مانند CD54/CD106/CD62E، سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند TNF-α، IL-6، IL-8، MCP-1 و فاکتورهای پیش‌انعقادی) باید تعیین شوند.

۹-۶ سمیت سیستمیک

پروفایل سمیت سیستمیک نانومواد را نمی‌توان از طریق پروفایل سمیت سیستمیک مواد تودهٔ متناظر پیش‌بینی کرد. این امر به‌ویژه به‌دلیل توانایی آنها در جابه‌جایی در بدن و رسیدن به اندام‌هایی است که کاملاً غیرقابل دسترس برای مواد معمولی هستند. نانواشیاء به‌این صورت توصیف شده‌اند که به‌طور بالقوه از همهٔ سدهای محافظتی از قبیل غشاء

1- Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials, 2017
2- Pro-inflammatory
3- Pro-coagulant

هسته، سد خونی- مغزی و موانع جفتی- جنینی عبور می‌کنند. بنابراین باید سمیت سیستمیک نانواشیاء درنظر گرفته شود.

یک پارامتر کلیدی که هنگام پرداختن به سمیت سیستمیک بالقوهٔ نانومواد باید درنظر گرفته شود پروفایل انحلال‌پذیری آنها است. نانومواد محلول هنگامی‌که در تماس با بافت‌ها یا مایعات هستند درست مانند مواد تودهٔ محلول که در افزاره‌های پزشکی عمل می‌کنند، حل خواهند شد. هرچند با نانومواد کم محلول، ظرفیت پاک‌سازی بدن و سازوکارهای دفاعی می‌توانند به‌سرعت اشباع شوند که منجربه تجمع سیستمیک طولانی مدتی شود که می‌تواند اثرات سوء ایجاد کند. ماندگاری‌زیستی نانومواد نامحلول می‌تواند منجربه تغییراتی در نفوذپذیری لیزوزومی و فعالیت آنزیمی و آپوپتوز ماکروفاژ شود. بسته به کاربرد بالینی و خواص ذاتی نانومواد، ارزشیابی سمیت سیستمیک بالقوهٔ آنها باید طی چندین دوره مواجهه درنظر گرفته شود (به استاندارد ISO 10993-11 مراجعه شود).

از آنجاکه نانواشیاء می‌توانند به‌طور بالقوه در سراسر بدن توزیع شوند، انتخاب بافت‌ها/ اندام‌های موردنظر برای آنالیزهای بافت‌شناسی (ISO 10993-11) باید مورد به مورد با تأکید ویژه بر MPS (برای مثال، مخصوصاً کبد، طحال)، کلیه ها، مغز، مغز استخوان و بقیه، بسته به مسیر تجویز و کاربرد بالینی موردنظر، بررسی شوند.

باید به دُز تجویز شده توجه ویژه داشت، دُزسنجی جرم یا غلظتی که معمولاً برای مواد توده قابل‌استفاده است، ممکن است برای نانومواد‌ی‌که سمیت سیستمیک آنها به‌طور عمده بستگی به برهم‌کنش خود ذرّه با سامانهٔ زیست‌شناختی خواهد داشت، مناسب نباشد. تعداد ذرهٔ تجویز شده و یا مساحت سطح به‌دست آمده که بیمار درمعرض قرار می‌گیرد شاید پارامترهای بهتری برای توصیف رابطه دُز-پاسخ باشد.

هرچند، از نظر دُزدهی، جرم یک معیار مناسب دُزسنجی است. درصورتی‌که همهٔ پارامترهای سنجش شناخته هستند، دُز در واحد جرم می‌تواند به‌راحتی به دُز در تعداد ذرات و/ یا دُز در مساحت سطح تبدیل شود.

همچنین، اندازه دُز و فراوانی دُزدهی می‌تواند بر نتیجهٔ آزمون سمیت سیستمیک تأثیر بگذارد. مواجههٔ نانواشیاء می‌تواند باعث اشباع یا تحریک دریافت در اندام‌ها مخصوصاً اندام‌های MPS شود. مطالعات انجام‌شده بر روی جوندگانی که نانوذرات کربنی و پلی (لاکتید-کوگلیکولید) به‌صورت وریدی به آنها تزریق شد، نشان داده‌است که سلول‌های فاگوسیت‌کننده در کبد و طحال به‌دلیل توزیع مجدد نانواشیاء به سایر اندام‌ها می‌توانند اشباع شوند [130] [131]. هنگامی‌که بیوزی و همکارانش[1] [132] نانواشیاء کربنی را به خون موش‌های صحرایی تزریق کردند، مشاهده کردند که با دُزدهی مکرّر، دریافت در کبد افزایش می‌یابد. آنها پیشنهاد کردند که تغییر در رفتار به سازگارشدن MPS به شرایط جدید مخصوصاً سطح نانواشیاء در خون مرتبط است [132]. در مطالعات دیگری که نانواشیاء به صورت کلوئیدهای کربنی داخل وریدی تزریق شدند در دُزی که موجب انسداد دریافت کبدی ذره شد، فعالیت فاگوسیت‌کنندهٔ کبدی پس از ۳ تا ۶ روز به حالت عادی برگشت [250] [251].

۹-۷ تب‌زایی

مثل هر سطوحی از ماده، نانومواد می‌توانند با اندوتوکسین‌های باکتریایی یا لیپوپلی‌ساکارید (LPS) پوشانده شوند، مخصوصاً هنگامی‌که نانومواد در شرایط غیراستریل یا در حضور آب تولید می‌شوند. وجود اندوتوکسین‌های روی سطوح نانوماده ممکن است با برهم‌کنش بین نانومواد و سامانه‌های زیست‌شناختی تداخل کنند و بر نتایج ارزیابی

1- Biozzi et al

(برای مثال، التهاب غیر اختصاصی) اثر بگذارند. لازم به ذکر است که سترون کردن پایانی (حرارت خشک، حرارت مرطوب، اکسید اتیلن، تابش پرتو گاما و باریکهٔ الکترونی[1]) اندوتوکسین باکتریایی را غیرفعال نمی‌سازد. فارماکوپه USP[2] توصیه می‌کند تیمار مواد برای زمان و درجهٔ حرارت کافی برای رسیدن به کاهش ≥3-log فعالیت اندوتوکسین (به‌طور معمول حداقل ۲۵۰ درجهٔ سلسیوس برای حداقل ۳۰ دقیقه) (USP 1995) استفاده شود (به زیربند ۶-۹-۱ مراجعه شود).

استاندارد ISO 29701 آزمون لیزات آمبوسیت لیمولوس (LAL)[3] را برای تعیین اندوتوکسین در نمونه‌های نانوماده مورداستفاده در سامانه‌های زیست‌شناختی سلولی برون‌تن شرح می‌دهد. روش دیگر آزمون فعال‌سازی مونوسیت (MAT)[4] است که یک روش کمی معتبری است که از سازوکار طبیعی تب در انسان تبعیت می‌کند و می‌تواند برای آزمون اندوتوکسین‌های مرتبط با نانومواد و همچنین سایر تب‌زاهای زیست‌شناختی (به‌عنوان مثال تب‌زاهای مخمری، ویروسی و انگلی) مورداستفاده قرار گیرد [84] [85] [86]. همچنین اطلاعات مربوط به آزمون اندوتوکسین نانومواد در زیربند ۶-۹-۱ و استاندارد ISO 10993-11 گنجانده شده‌اند. منابع بیشتری که می‌توانند مفید باشند شامل USP 85، USP 151 و ANSI/AAMI ST72[5] هستند. علاوه‌بر تب‌زایی با واسطهٔ اندوتوکسین، تب‌زایی با واسطه نانومواد باید به‌عنوان بخشی از ارزشیابی زیست‌شناختی نانومواد مطابق موارد ذکرشده در استاندارد ISO 10993-11 مورد ملاحظه قرار گیرد.

۹-۸ کاشت

آزمون‌های کاشت برای افزاره‌های پزشکی در استاندارد ISO 10993-6 شرح داده شده‌اند. بسته به نوع افزارهٔ پزشکی، محل‌های مختلف کاشت می‌تواند درنظر گرفته شود (به‌عنوان مثال زیر جلدی، عضلانی، داخل جمجمه‌ای و غیره). برای نانواشیاء آزاد، تزریق مستقیم به بافت مناسب باید درنظر گرفته شود.

با درنظر گرفتن امکان رهایش بالقوهٔ نانواشیاء از افزارهٔ پزشکی باید به مهاجرت نانواشیاء به گره‌های لنفاوی موضعی درحال تخلیه، توجه ویژه‌ایی معطوف داشت.

وقتی‌که برای ارزشیابی سمیت سیستمیک بالقوه از آزمون کاشت استفاده می‌شود، الزامات موجود در هر دو استاندارد ISO 10993-6 و ISO 10993-11 باید درنظر گرفته شوند.

باید به این نکته توجه داشت که به‌طور معمول در آزمون‌های کاشت از یک مادهٔ کنترل استفاده می‌شود. تعدادی نانومواد مرجع معتبر در دسترس هستند که برای اندازه گیری‌های اندازه، استاندارد شده‌اند. علاوه‌براین، درحال‌حاضر نانومواد به اصطلاح «نماینده» در دسترس هستند که به‌طور گسترده‌ای به‌صورت نانومواد تجاری استفاده می‌شوند، به زیربند ۵-۳ مراجعه شود.

۱۰ نحوهٔ ارائه مشخصه‌یابی و نتایج آزمون

1- Electron beam radiation
2- United states pharmacopeia
3- Limulus amebocyte lysate test
4- Monocyte activation test
5- Bacterial endotoxins- test methods, routine monitoring and alterative to batch testing, 2019

در صورت امکان، گزارش آزمون داده‌های مشخصه‌ها و اثرات زیست‌شناختی نانومواد، شامل موارد زیر است، اما به این اطلاعات محدود نمی‌شوند:

الف- توصیف و جزئیات افزاره و نانوماده با استفاده از مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی مناسب ذکر شده در اینجا:

۱- شناسایی نانومواد شامل ترکیب‌بندی شیمیایی و ساختار؛
۲- اندازه؛
۳- ریخت‌شناسی؛
۴- حالت/ سرعت انبوهگی و کلوخگی؛
۵- انحلال‌پذیری؛
۶- بار سطح، شیمی و مساحت سطح؛
۷- توصیف کاربرد موردنظر، ماهیت و دورهٔ تماس/ برهم‌کنش زیست‌شناختی؛
۸- درصورت امکان، شواهدی از خلوص نانوماده در افزارهٔ نهایی، و شناسایی و کمّی‌سازی هرگونه باقی‌مانده‌های فروشویی و/ یا شیمیایی؛
۹- داده‌های آنالیزی برای پشتیبانی از پایداری نانوماده (برای مثال، این داده‌ها برای نانواشیاء شامل سرعت/ حالت انبوهگی با استفاده از نمونه‌های استوک و محلول‌های مختلف دُزی مورداستفاده در سنجش‌های مختلف باشد)؛

ب- آماده‌سازی نمونه (به‌عنوان مثال عصاره‌ها، تماس مستقیم) و شرایط آزمون (غلظت نانوماده و محیط، نوع مادهٔ ظرف) از جمله شناسایی پروتکل‌های استاندارد استفاده شده؛

پ- درصورت امکان، روش‌های استاندارد آنالیزی؛

ت- توصیف روش‌های آزمون آنالیزی، از جمله، محدوده‌های کمّی‌سازی[1]؛

ث- ارزیابی مادهٔ حاصل از تخریب افزارهٔ پزشکی و رهایش بالقوه نانوشیء ازجمله استدلال پشتیبانی‌کننده کیفیت شرایط آزمایشی برای محیط کاربرد موردنظر افزاره؛

ج- توصیف تخریب مادهٔ افزارهٔ پزشکی و روش‌های آزمون رهایش بالقوهٔ نانوشیء، شرایط آزمون، مواد و روش‌های اجرایی آزمون از جمله کنترل‌ها؛

چ- شناسایی و کمّی‌سازی محصولات حاصل از تخریب (برای مثال، شکل و شرایط محصولات تخریب، پایداری آنها و کنترل‌های مورد استفاده)؛

ح- شواهد صحه‌گذاری آزمون، شامل استفاده از کنترل‌های مناسب و توجیهات پشتیبان، درصورت امکان؛

خ- خلاصه‌ای از نتایج؛

د- تفسیر، بحث نتایج و نتیجه‌گیری‌ها؛

1- Quantification limits

ذ- اعلام انطباق انجام بهین روش آزمایشگاهی و/یا سامانه‌های مدیریت کیفیت برای آزمایشگاه‌های آزمون (برای مثال، ISO/IEC 17025).

توصیه می‌شود هنگام توسعه و صحه‌گذاری روش‌های جدید، آزمون انجام‌شده باید مطابق اطلاعات موجود در استاندارد ISO/TR 13014 باشد.

۱۱ ارزیابی ریسک

۱۱-۱ ملاحظات کلی

هرچند به‌نظر می‌رسد که اصول کلی ارزیابی ریسک شیمیایی برای نانومواد کاربردی باشند [55] [59] [252] [253]، نانومواد چالش‌های خاصی دارند، از جمله: خواص منحصربه‌فرد فیزیکوشیمیایی، عدم قطعیت بیشتر ترکیب‌بندی، خواص درحال‌تغییر در سامانه‌های زیست‌شناختی، دشواری‌های اندازه‌گیری مواجهه و تصمیم‌های دُزسنجی مناسب که ممکن است به راهنمایی خاص نیاز داشته باشند. بنابراین شفافیت درطی فرایند ارزیابی ریسک که در آن قبول[1] و رد[2] داده‌ها، فرضیات، متغیّر و عدم‌قطعیت‌هایی که باید بحث شوند، مهم است. در فقدان داده‌های ضروری، ارزیاب ریسک قادر به تکمیل ارزیابی ریسک نخواهد بود. از این‌رو هنگامی‌که ارزیابی ریسک نهایی انجام می‌شود، باید چگونگی درنظر گرفتن اطلاعات به‌دست آمده از ارزیابی شفاف باشد. لازم به‌ذکر است که ارزیابی ریسک زیست‌شناختی نانومواد شامل ارزیابی هر دو کسرهای محلول و نامحلول نانوماده است. مشخص شده‌است که فقدان اطلاعات مهم موردنیاز در ارزیابی نانومواد می‌تواند غالباً منجربه عدم قطعیت قابل‌توجهی شود. وقتی‌که داده‌های جدید مرتبط، از آزمون‌ها و تحقیقات نانوماده در دسترس قرار گیرند، انتظار می‌رود که چنین عدم قطعیت‌هایی کاهش یابند. وقتی اطلاعات جدید در دسترس قرار گیرند، باید ارزیابی دوره‌ای ریسک مرتبط با کاربرد نانوماده موردتوجه قرار گیرد.

در ارزیابی ریسک مرتبط با ارزیابی ریسک شیمیایی، ماندگاری‌زیستی/تجمع‌زیستی بالقوه نانومواد به‌صورت یک چالش خاص وجود دارد. در بسیاری از موارد، بدن قادر به سوخت‌وساز یا تجزیهٔ فعال نانومادهای که موجب ماندگاری نامعین بالقوه درون بافت‌ها یا سلول‌ها می‌شود، نیست. ماندگاری درون بافت‌ها یا سلول‌ها برای انواع مختلف نانومواد از قبیل نانوذرات نقره [94] [254]، اکسیدروی، دی‌اکسید تیتانیم [255]، طلا [237] [238] و نانولوله‌های کربنی [239] نشان داده‌شده‌اند. همچنین برای نانواشیاء TiO_2، ماندگاری طولانی‌مدت گزارش شده‌است [259]. اثرات خاص زیست‌شناختی مرتبط با این ماندگاری به‌خوبی درک نشده‌است. در عین‌حال، برخی شواهد وجود دارند که پیشنهاد می‌کنند این پدیده می‌تواند موجب حالت التهابی ثابتی شود که سرانجام ممکن است منجربه سرطان‌زایی شود [260] [192]. علاوه‌بر شخص باید رهایش نانواشیاء را به‌عنوان نتیجهٔ سایش/ عمر/ مصرف افزاره‌های پزشکی ساخته‌شده بدون استفاده از نانومواد را در نظر گرفت.

فرایند مدیریت ریسک برای ارزشیابی زیست‌شناختی افزاره‌های پزشکی در استاندارد ISO 10993-1: 2009، پیوست B شرح داده شده‌است. استاندارد ISO 10993-1 عباراتی مانند ارزیابی ریسک، آنالیز ریسک و ارزشیابی ریسک را

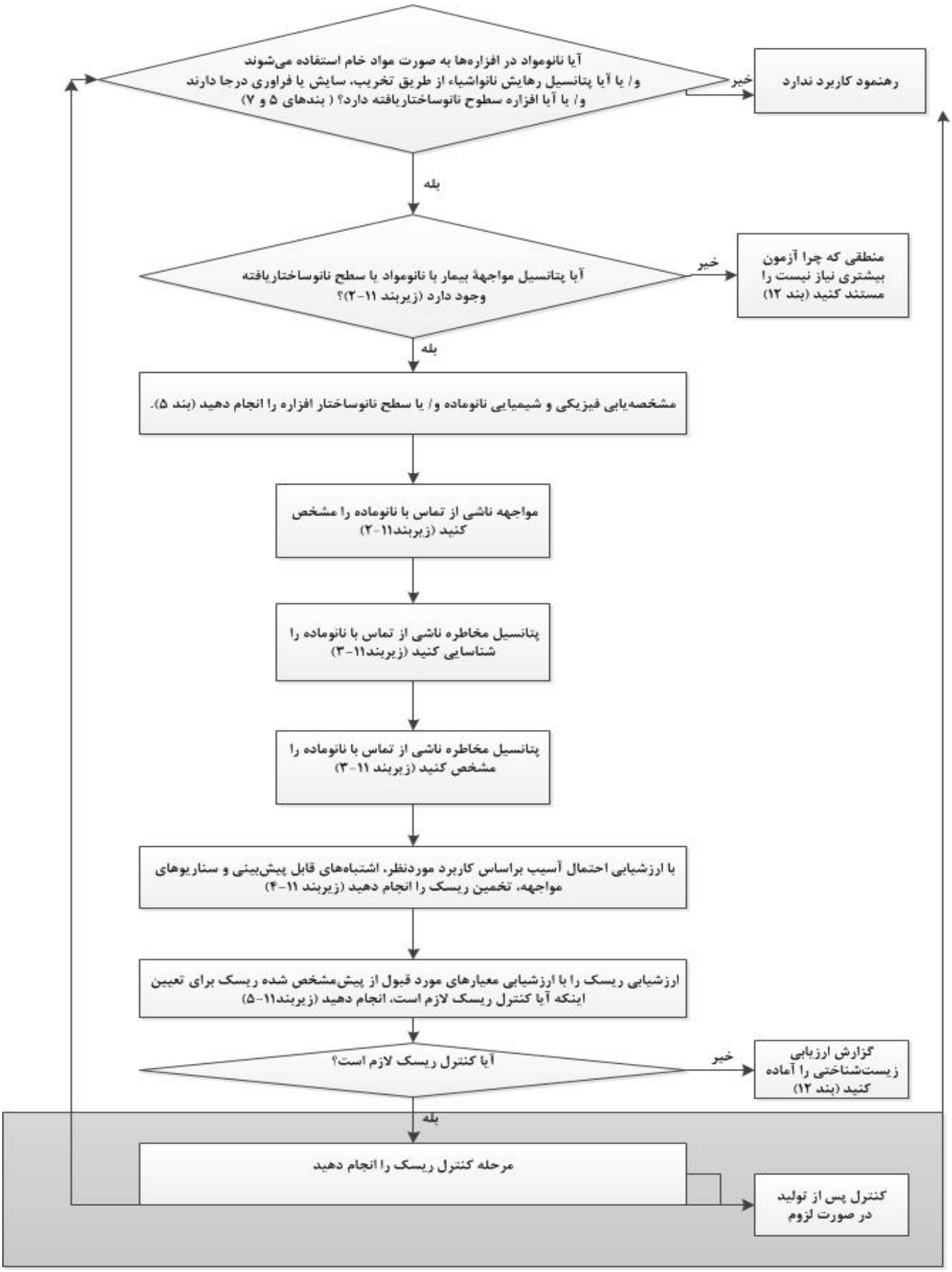
1- Inclusion
2- Exclusion

تعریف نمی‌کند، بلکه از بیان استاندارد ISO 14971 و استاندارد ISO/TR 15499 پیروی می‌کند. هرچند در استاندارد ISO 10993-1:2009، پیوست B، آنالیز ریسک گسترده‌شده و ترکیبی از ارزشیابی ریسک و کنترل ریسک است. استاندارد ISO/TR 15449 توصیه‌های دقیق‌تری نسبت به استاندارد ISO 10993-1 در مورد انجام ارزشیابی ریسک زیست‌شناختی درون فرایند مدیریت ریسک ارائه می‌کند. مرورکلی بر فرایند مدیریت ریسک در نمودار شکل ۱ ارائه شده‌است، اما دامنهٔ این استاندارد به ارزیابی ریسک محدود می‌شود که متشکل از آنالیز ریسک و ارزشیابی ریسک است. در استاندارد ISO 14971 ریسک به‌عنوان محصول دو عامل مستقل شرح داده می‌شود: احتمال ایجاد آسیب و شدت آن آسیب.

فرایند ارزیابی ریسک نانومواد به‌تدریج در حال توسعه است و ابزارهای زیادی مانند روش‌های درون‌رایانه‌ایی نانوانفورماتیک [261]، ارتباط فعالیت کمّی نانوذره (QNAR)[1] [262] [263] [264]، مدل‌های مواجهه [265] [266]، مدل‌سازی فارماکوکینتیک مبتنی‌بر فیزیولوژی (PBPK)[2] [248] [249]، آزمون توکسیکولوژی سیستمیک و غربالگری باتوان عملیاتی بالا [269] درحال توسعه هستند تا به ارزشیابی ریسک‌های نانوماده کمک کنند، به استاندارد ISO/TR 16197 مراجعه شود. درحال‌حاضر از این ابزار برای پشتیبانی مقرّراتی برای ارائه نانومواد به‌ندرت استفاده می‌شود. بااین‌حال ممکن است اهمیت آنها در آینده مشخص شود. وزن مبتنی بر شواهد[3] اصطلاح دیگری است که اغلب در مدارک ارزیابی ریسک نانومواد ذکر می‌شود و ممکن است مفید باشد [271] [272]. مختصری از موضوعات مهم در ارزیابی ریسک نانومواد توسط OECD ارائه می‌شود که برای افزاره‌های پزشکی نیز کاربردی هستند [252].

شکل ۱ بر اساس استاندارد ISO 10993-1، مرورکلی از کل فرایند مدیریت ریسک را ارائه می‌دهد، اما دامنهٔ این استاندارد محدود به ارزیابی ریسک است که در شکل ۱ بالاتر از ناحیهٔ هاشوردار است. ناحیهٔ هاشوردار در شکل ۱ کنترل ریسک را در بخش مدیریت ریسک نشان می‌دهد.

1- Quantitative nanoparticle activity relationship
2- Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling
3- Weight of evidence



شکل ۱- مرورکلی بر فرایند مدیریت ریسک

۲-۱۱ ارزیابی مواجهه

احتمال آسیب اغلب با ارزیابی مواجهه، تجربهٔ بالینی یا مقایسه با کاربردهای مشابه مشخص می‌شود. برای نانومواد به‌کاررفته در افزاره‌های پزشکی، این موضوع با رهایش بالقوه و تشکیل نانواشیاء از افزاره مرتبط است. هدف از ارزیابی مواجهه مشخص‌کردن این است که بیمار با چه مقدار نانوماده مواجهه می‌شود و آیا مواجهه موجب دردسترس قرار گرفتن نانواشیاء برای پاسخ‌های موضعی بافتی و/یا مواجههٔ سیستمیک می‌شود. بنابراین این موضوع برای شرح سناریوی مواجهه با اهمیت قلمداد می‌شود و با انتخاب روش‌های صحیح آزمون، رهایش، مهاجرت و تشکیل نانواشیاء از افزاره‌های پزشکی مشخص می‌شود. برای ارزیابی مواجهه موارد زیر را درنظر بگیرید:

- شدت، فراوانی و دورهٔ تماس؛
- مسیر مواجهه (برای مثال، بافتی/ خونی، جلدی، خوراکی یا تنفسی)؛
- سرعت های ورود یا دریافت؛
- فراهمی زیستی.

در ابتدا تمرکز بر تخمین احتمال و میزان جذب/ توزیع نانواشیاء در بدن یا از طریق شبیه‌سازی مواجهه، اندازه‌گیری مواجههٔ واقعی یا ارائه فرضیات مواجهه است. بااین‌وجود دریافت سیستمیک می‌تواند بین شرایط مختلف مواجهه، مسیرهای مواجهه، شرایط سلامتی بیمار و فراهمی‌زیستی متفاوت باشد. غالباً مواجهه از طریق مسیر استنشاقی، تزریق وریدی یا کاشت بافتی نسبت به مواجههٔ خوراکی یا جلدی نگران کننده‌تر هستند.

یک چالش درطی ارزیابی مواجهه، مشخصه‌یابی نانوماده است. ارزیابی مواجهه در شرایط درون‌تن مخصوصاً در بافت و مایعات بدن می‌تواند به‌دلیل محدود بودن روش‌های آنالیزی موجود و همچنین به علت غلظت‌های کم، دشوار باشد. محدودیت دیگر این است که همیشه آنالیز شیمیایی در مورد ماهیت ذرّه نانوماده اطلاعاتی ارائه نمی‌دهد. بنابراین درصورتی‌که نانوماده به‌صورت جامد، محلول و تخریب‌شده باشد، باید مشخصه‌یابی تأیید شود. نشان داده شده‌است که برخی نانومواد (مثل نانونقره) می‌توانند به‌صورت یون‌های فلزی حل‌شده یا آزاد شوند که ممکن است به‌صورت نانومواد جدید با ترکیب‌بندی شیمیایی متفاوتی رسوب کنند [90] [272]. روش‌های آنالیزی باید شرح داده شده و توجیه شوند. ارزیابی مواجهه انتخاب‌شده باید مطابق موارد زیر درنظر گرفته شوند:

- مناسب بودن؛
- حساسیت؛
- قدرت؛
- درستی؛
- حدود تشخیص؛
- حالت ماده (جامد، محلول بودن یا تخریب شده)؛
- منابع تغییرپذیری و عدم قطعیت.

۱۱-۳ شناسایی مخاطره زیست‌شناختی

مخاطره منبع بالقوه‌ای از آسیب است. تمام مخاطره‌های شناخته‌شده و قابل‌پیش‌بینی منطقی مرتبط با نانوماده در هردو شرایط طبیعی و نادرست منطقی باید شناسایی شوند. با این‌وجود، برای اینکه آسیب ایجاد شود، وضعیت مخاطره‌آمیزی باید رخ دهد که اغلب شامل توالی از وقایع است. هنگامی‌که ریسک‌ها تخمین زده می‌شوند، شناسایی و مشخصه‌یابی این وقایع مهم هستند.

وقتی ارزیاب‌های ریسک، مرحلهٔ شناسایی/ مشخصه‌یابی مخاطره را انجام می‌دهند، باید به موارد زیر توجه کنند:

- نتایج بررسی مقاله‌ها؛
- نتایج مشخصه‌یابی ماده؛
- آماده‌سازی نمونه‌ها؛
- انتخاب دُز و توصیف دُز؛
- روش‌های آزمون؛
- توکسیکوکینتیک‌ها؛
- توصیف مخاطره شامل دُز-پاسخ و نحوهٔ عمل.

از دیدگاه توکسیکولوژی در مورد برخی از انواع اثرات زیست‌شناختی، استنتاج یک ارتباط دُز- پاسخ معین امکان‌پذیر نیست. توصیه می‌شود در این موارد از روش‌های دیگری برای مشخص‌کردن مخاطره و طبقه‌بندی شدت آسیب استفاده شود. در اینجا باید به چگونگی به‌وجود آمدن موقعیت‌های خطرناک و ماهیت نتایج آنها توجه ویژه‌ای داشت. نمونه‌هایی از چنین اثرات زیست‌شناختی شامل واکنش‌های جسم خارجی[1] به نانومواد کاشته‌شده و انعقاد خون به دلیل طراحی و ساختار سطح نانوماده می‌باشد. برای اطمینان از شفافیت و قابلیت ردیابی، مستندکردن مناسب سایر انواع چنین اثرات زیست‌شناختی لازم است.

۱۱-۴ تخمین ریسک

اصول درنظر گرفته‌شده برای تخمین ریسک برای نانومواد قابل‌اجرا است، اما به‌دلیل دانش محدود فعلی از نحوهٔ برهم‌کنش نانومواد با سامانه‌های آزمون و بدن انسان ممکن است پیچیده‌تر باشد. وزن شواهد رویکردها و اصول چگونگی به‌دست آوردن مقادیر دریافت قابل‌تحمل[2] که در استاندارد ISO 10993-17 شرح داده شده‌اند، می‌تواند در این فرایند مفید باشد. استاندارد ISO 10993-17 در مورد چگونگی استفاده از فاکتورهای عدم قطعیت و تعیین مقادیر دریافت قابل‌تحمل مواد فروشویی‌شده رهنمودهایی ارائه می‌دهد و ممکن است همچنین برای نانومواد‌ی که احتمال دارد از طریق رهایش، تخریب، سایش یا از طریق اجزایشان در معرض مواجههٔ سیستمیک قرار بگیرند، مفید باشد.

برای تخمین ریسک بهداشتی ناشی از نانوماده، تمامی اطلاعات مناسب و موجود مقاله‌های مروری، ارزشیابی زیست‌شناختی، کاربرد بالینی و ارزیابی مواجهه باید استفاده شوند. علاوه‌براین، کیفیت، قابلیت اطمینان و مرتبط

1- Foreign body reactions
2- Tolerable intake values

بودن اطلاعات باید درنظر گرفته شوند. داده‌های مورد استفاده برای تخمین ریسک از نظر قابلیت اطمینان براساس موارد زیر باید ارزشیابی شوند:

- تأیید ماهیت و خواص فیزیکوشیمیایی مادهٔ مورد آزمون در رابطه با مادهٔ در حال ارزشیابی؛
- اینکه آیا داده‌ها بر اساس یک آزمون یا رویکرد اندازه‌گیری پذیرفته‌شده، تولید شده‌اند یا خیر؟
- آیا رویکرد به‌کار رفته برای استفاده در آزمون نانومواد مورد قبول است.

ریسک‌های شناسایی‌شده و مشخص‌شده با مواجهه یا احتمال مخاطره در ایجاد آسیب مقایسه می‌شوند. اگر احتمال آسیب وجود داشته باشد، ریسک به‌وجود می‌آید. وقتی تعیین مواجهه (احتمال آسیب) امکان‌پذیر نیست، ارزیابی ریسک با فرض سناریوی مواجهه در بدترین حالت، می‌تواند به تنهایی به شدت مخاطره بستگی داشته باشد. با این وجود، از آن‌جایی که ریسک تابعی از مواجهه است و فراوانی و مدت استفاده، هر دو فاکتورهای مواجهه هستند، وقتی‌که این دو عامل افزایش یابند، احتمال آسیب افزایش خواهد یافت.

۱۱-۵ ارزشیابی ریسک

ارزشیابی ریسک فرایندی است که در آن ریسک‌های برآوردشده بر اساس معیارهای قابل‌قبول از پیش تعیین‌شده ارزشیابی می‌شود تا تعیین شود آیا کنترل ریسک لازم است. این فرایند برای همهٔ افزاره‌های پزشکی یکسان است، خواه دارای نانومواد باشند یا نباشند. مانند همه افزاره‌ها، ممکن است درصورت ناکافی بودن اطلاعات موجود برای انجام ارزشیابی کمّی ریسک، ارزشیابی ریسک کیفی لازم باشد. سطح ریسک نه‌تنها به شدت مخاطرهٔ بالقوه و احتمال مواجههٔ مضّر، بلکه به‌کاربرد موردنظر افزاره نیز بستگی دارد.

۱۲ گزارش ارزشیابی زیست‌شناختی

توصیه می‌شود گزارش ارزشیابی زیست‌شناختی باید شامل مواردی ازجمله اطلاعات اختصاصی‌تر در مورد مصرف نانومواد باشد که در استاندارد ISO 10993-1 ذکر شده‌است. کارشناس های ارزیاب که دانش و تجربهٔ لازم را دارند باید موارد زیر را تعیین و مستند کنند:

الف- راهبرد و محتوای برنامه برای ارزشیابی زیست‌شناختی افزارهٔ پزشکی که حاوی، از نانومواد/ نانواشیاء ایجاد یا تشکیل می‌شوند؛

ب- معیارهای تعیین پذیرش ریسک مربوط به نانوماده(ها) برای هدف موردنظر، مطابق با برنامهٔ مدیریت ریسک؛

پ- کافی‌بودن مشخصه‌یابی ماده و نانومواد افزاره پزشکی؛

ت- منطق انتخاب و / یا چشم پوشی از آزمون‌ها و درجهٔ عدم قطعیت در تفسیر آن آزمون‌ها؛

ث- تفسیر داده‌های موجود مرتبط و نتایج آزمون مربوط به افزاره‌های پزشکی؛

ج- هر دادهٔ افزوده جمع‌آوری‌شده برای تکمیل ارزشیابی زیست‌شناختی؛

چ- نتیجه‌گیری‌های کلّی ایمنی زیست‌شناختی برای افزارهٔ پزشکی و هر درجه عدم قطعیت در رسیدن به این نتایج.

کتاب‌نامه

[1] ISO 9276 (all parts), Representation of results of particle size analysis

یادآوری ۱- مجموعه استانداردهای ملی ایران شماره ۸۲۰۱، ارائه نتایج دانه‌بندی قسمت اول: نمایش ترسیمی با استفاده از برخی قسمت‌های استاندارد ISO 9276-1:1998 تدوین شده‌است.

یادآوری ۲- استاندارد ملی ایران شماره ۵-۱۱۶۱۷: سال ۱۳۸۷، نتایج آنالیز اندازهٔ ذره- قسمت ۵: روش‌های محاسبه مربوط به «آنالیزهای اندازه ذره» که از توزیع احتمال نرمال لگاریتمی استفاده می‌کنند با استفاده از استاندارد ISO 9276-5:2005 تدوین شده‌است.

[2] ISO 9277, Determination of the specific surface area of solids by gas adsorption — BET method

[3] ISO 10801, Nanotechnologies — Generation of metal nanoparticles for inhalation toxicity testing using the evaporation/condensation method

[4] ISO 10808, Nanotechnologies — Characterization of nanoparticles in inhalation exposure chambers for inhalation toxicity testing

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۱۱۱: سال ۱۳۹۳، فناوری نانو-تعیین مشخصات نانوذرات در محفظه‌های مواجهه استنشاقی برای آزمون سمیت استنشاقی با استفاده از استاندارد ISO 10808: 2010 تدوین شده‌است.

[5] ISO 11360, Nanotechnologies — Methodology for the classification and categorization of nanomaterials

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۷۴۴: سال ۱۳۹۱، فناوری نانو- روش‌شناسی طبقه و رده‌بندی نانومواد با استفاده از استاندارد ISO/TR11360: 2010 تدوین شده‌است.

[6] ISO/TS 12025, Nanomaterials — Quantification of nano-object release from powders by generation of aerosols

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۱۴۹: سال ۱۳۹۲، نانومواد-تعیین کمّی رهایش نانوشیء از پودرهای ناشی از تولید هواسل‌ها با استفاده از استاندارد ISO/TS 12025: 2012 تدوین شده‌است.

[7] ISO 13084, Surface chemical analysis — Secondary-ion mass spectrometry — Calibration of the mass scale for a time-of-flight secondary-ion mass spectrometer

[8] ISO/TR 13097, Guidelines for the characterization of dispersion stability

[9] ISO 13099 (all parts), Colloidal systems

[10] ISO 13121, Nanotechnologies — Nanomaterial risk evaluation

[11] ISO 13318 (all parts), Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۳-۱۸۱۴۷: سال ۱۳۹۲، تعیین توزیع اندازه ذره توسط روش‌های سانتریفیوژی ته‌نشستی مایع- قسمت ۳: روش سانتریفیوژ توسط اشعه x با استفاده از استاندارد ISO 13318-3: 2004 تدوین شده‌است.

[12] ISO 13320, Particle size analysis — Laser diffraction

[13] ISO 13322 (all parts), Particle size analysis -- Image analysis methods

یادآوری- مجموعه استانداردهای ملی ایران شماره ۱۰۰۹۹، آنالیز اندازه ذرات- روش‌های آنالیز تصویری با استفاده از برخی قسمت‌های استاندارد ISO 13322-1: 2014 تدوین شده‌است.

[14] ISO/TR 14187, Surface chemical analysis — Characterization of nanostructured materials

[15] ISO 14488, Particulate materials — Sampling and sample splitting for the determination of particulate properties

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۲۹۲۲: سال ۱۳۸۸، مواد ذره‌ای- نمونه‌برداری و تقسیم نمونه برای تعیین خواص با استفاده از استاندارد ISO14488: 2007 تدوین شده‌است.

[16] ISO 14887, Sample preparation — Dispersing procedures for powders in liquids

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۱۰۰: سال ۱۳۸۶، آماده‌سازی نمونه- روش‌های پراکنده کردن پودرها در مایعات با استفاده از استاندارد ISO 14887: 2000 تدوین شده‌است.

[17] ISO 15471, Surface chemical analysis — Auger electron spectroscopy — Description of selected instrumental performance parameters

[18] ISO/TR 15499, Biological evaluation of medical devices -- Guidance on the conduct of biological evaluation within a risk management process

[19] ISO/TR 15900, Biological evaluation of medical devices — Part 33: Guidance on tests to evaluate genotoxicity — Supplement to ISO 10993-3

[20] ISO/TR 15901 (all parts), Nanotechnologies — Methodology for the classification and categorization of nanomaterials

[۲۱] استاندارد ملی ایران به شماره ۱۷۱۵۰: سال ۱۳۹۲، با عنوان فناوری نانو- راهنما برای توسعه مواد معرف آزمون حاوی نانواشیاء در حالت پودر خشک

[22] ISO/TR 16196, Nanotechnologies — Compilation and description of sample preparation and dosing methods for engineered and manufactured nanomaterials

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۵۱۶۸: سال ۱۳۹۶، فناوری نانو گردآوری و توصیف روش‌های آماده‌سازی نمونه و روش‌های تنظیم دز برای نانومواد مهندسی‌شده و ساخته‌شده با استفاده از استاندارد ISO/TR 16196: 2016 تدوین شده‌است.

[23] ISO/TR 16197, Nanotechnologies — Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials

[24] ISO/TS 16550, Nanotechnologies — Determination of silver nanoparticles potency by release of muramic acid from Staphylococcus aureus

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۵۸۳: سال ۱۳۹۴، فناوری نانو- ارزیابی کمی فعالیت نانو ذرات نقره از طریق آزادسازی مورامیک اسید از استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از استاندارد ISO/TS 16550: 2014 تدوین شده است.

[۲۵] ISO 16700, Microbeam analysis — Scanning electron microscopy — Guidelines for calibrating image magnification

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۱۴۱: سال ۱۳۹۵، تجزیه میکروپرتویی- میکروسکوپ الکترونی روبشی- راهنما برای کالیبراسیون بزرگ‌نمایی تصویر با استفاده از استاندارد ISO 16700: 2016 تدوین شده‌است.

[26] ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۰۲۵: سال ۱۳۹۹، با عنوان الزامات عمومی برای احراز صلاحیت آزمایشگاه‌های آزمون و کالیبراسیون با استفاده از استاندارد ISO/IEC 17025: 2017 تدوین شده‌است.

[27] ISO/TS 17200, Nanotechnology — Nanoparticles in powder form — Characteristics and Measurements

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

[28] ISO 17853, Wear of implant materials — Polymer and metal wear particles — Isolation and characterization

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۹۵۱۵: سال ۱۳۹۳، سایش مواد کاشتنی- ذرات سایشی پلیمر و فلز- جداسازی و شناسایی با استفاده از استاندارد ISO 17853: 2011 تدوین شده‌است.

[29] ISO 17973, Surface chemical analysis — Medium-resolution Auger electron spectrometers — Calibration of energy scales for elemental analysis

[30] ISO 18115 (all parts), Surface chemical analysis —- Vocabulary

[31] ISO 18118, Surface chemical analysis — Auger electron spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy — Guide to the use of experimentally determined relative sensitivity factors for the quantitative analysis of homogeneous materials

[32] ISO 18144, Environmental tobacco smoke — Estimation of its contribution to respirable suspended particles — Method based on solanesol

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۸۲۵۱: سال ۱۳۸۴، دود محیطی توتون- براورد سهم ذرات دود محیطی توتون در ذرات معلق قابل تنفس بر اساس سولانسول- روش آزمون با استفاده از استاندارد ISO 18144 : 2003 تدوین شده‌است.

[33] ISO 18757, Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Determination of specific surface area of ceramic powders by gas adsorption using the BET method

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۲۶۵۸: سال ۱۳۸۸، سرامیک‌های ظریف (سرامیک‌های پیشرفته- سرامیک‌های صنعتی پیشرفته) مساحت سطحی ویژه پودرهای سرامیکی به‌وسیله جذب گاز با استفاده از روش BET- روش آزمون با استفاده از استاندارد ISO 18757: 2003 تدوین شده‌است.

[34] ISO 19007, Nanotechnologies — In vitro MTS assay for measuring the cytotoxic effect of nanoparticles

[35] ISO/TR 19319, Surface chemical analysis — Fundamental approaches to determination of lateral resolution and sharpness in beam-based methods

[36] ISO 19590, Nanotechnologies — Size distribution and concentration of inorganic nanoparticles in aqueous media via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۳۲۶: سال ۱۳۹۶، فناوری نانو- توزیع اندازه و غلظت نانوذرات معدنی در محیط آبی با استفاده از طیف‌سنجی جرمی پلاسمای جفت‌شده القایی تک‌ذره‌ای با استفاده از استاندارد ISO19590: 2017 تدوین شده‌است.

[37] ISO 20998 (all parts), Measurement and characterization of particles by acoustic methods

[38] ISO 21501 (all parts), Determination of particle size distribution — Single particle light

interaction methods

یادآوری- مجموعه استانداردهای ملی ایران شماره ۱۰۱۰۵، تعیین توزیع اندازه ذرات- روش‌های برهم‌کنش نوری ذره منفرد با استفاده از برخی قسمت‌های استاندارد ISO 21501 تدوین شده‌است.

[39] ISO 22309, Microbeam analysis — Quantitative analysis using energy-dispersive spectrometry (EDS) for elements with an atomic number of 11 (Na) or above

[40] ISO 22412, Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS)

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۲۴۷: سال ۱۳۹۶، آنالیز اندازه ذره- پراکندگی نور دینامیک (DLS) با استفاده از استاندارد ISO 22412: 2017 تدوین شده‌است.

[41] ISO 22489, Microbeam analysis — Electron probe microanalysis — Quantitative point analysis for bulk specimens using wavelength dispersive X-ray spectroscopy

[42] ISO 24173, Microbeam analysis — Guidelines for orientation measurement using electron backscatter diffraction

[43] ISO 24236, Surface chemical analysis — Auger electron spectroscopy — Repeatability and constancy of intensity scale

[44] ISO 25178, Geometrical product specifications (GPS) — Surface texture: Areal

یادآوری- مجموعه استانداردهای ملی ایران شماره ۱۴۹۵۴، ویژگی‌های هندسی فراورده (GPS)-بافت سطح: مساحت با استفاده از برخی قسمت‌های استاندارد ISO 25178-3: 2012 تدوین شده‌است.

[45] ISO 27628, Workplace atmospheres — Ultrafine, nanoparticle and nano-structured aerosols — Inhalation exposure characterization and assessment

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۴۸۳: سال ۱۳۹۶، اتمسفرهای محیط کار- ذرات معلق بسیار ریزهواویزها، نانوذرات و نانوساختار- خصوصیات و ارزیابی مواجهه استنشاق با استفاده از استاندارد ISO/TR 27628: 2007 تدوین شده‌است.

[46] ISO 29701, Nanotechnologies — Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems — Limulus amebocyte lysate (LAL) test

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۱۵۳: سال ۱۳۹۰، فناوری نانو- آزمون اندوتوکسین نانومواد در سیستم های برون تن- روش آزمون - Limulus amebocyte lysate (LAL) test با استفاده از استاندارد ISO 29701:2010 تدوین شده‌است.

[۴۷] استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو-واژه نامه- قسمت ۱: اصطلاحات اصلی

[۴۸] استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو- واژه نامه- قسمت ۲: نانواشیاء

[۴۹] استاندارد ملی ایران-ایزو شماره ۶-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۶، فناوری نانو- واژه نامه- قسمت ۶: مشخصه‌یابی نانوشیء

[50] AAMI/ST 72, Bacterial endotoxins — Test methods, routine monitoring, and alternatives to batch testing

[51] ASTM E2524, Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles

[52] Curtis A.S.G., Dalby M.J., Gadegaard N. Cell signaling arising from nanotopography: implications for nanomedical devices. Nanomed. 2006, 1 pp. 67–72

[53] Ker E.D., Nain A.S., Weiss L.E., Wang J., Suhan J., Amon C.H. Bioprinting of growth factors onto aligned sub-micron fibrous scaffolds for simultaneous control of cell differentiation and alignment. Biomaterials. 2011, 32 pp. 8097–8107

[54] De Peppo G.M., Agheli H., Karlsson C., Ekström K., Brisby H., Lennerås M. Osteogenic response of human mesenchymal stem cells to well-defined nanoscale topography in vitro. Int. J. Nanomedicine. 2014, 9 pp. 2499–2515

[55] Hristozov D.R., Gottardo S., Critto A., Marcomini A. Risk assessment of engineered nanomaterials: a review of available data and approaches from a regulatory perspective. Nanotoxicology. 2012, 6 pp. 880–898

[56] Hansen S.F., Larsen B.H., Olsen S.I. Baun ACategorization framework to aid hazard identification of nanomaterials. Nanotoxicology. 2007, 1 pp. 243–250

[57] EFSA. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. EFSA J. 2011, 9 p. 2140

[58] SCCS/1484/12, GUIDANCE ON THE SAFETY ASSESSMENT OF NANOMATERIALS IN COSMETICS. European Commission, Brussels, Belgium, 2012.http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_005.pdf

[59] SCENIHR. Guidance on the Determination of Potential Health Effects of Nanomaterials Used in Medical Devices. European Commission, Brussels, Belgium 2014. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_045.pdf

[60] Crawford R.J., & Webb H.K. Surface topographical factors influencing bacterial attachment. Adv. Colloid Interface Sci. 2012, 179-182 pp. 142–149

[61] Webb H.K., & Truong V.K. Roughness parameters for standard description of surface nanoarchitecture. Scanning. 2012, 34 pp. 257–263

[62] Linsinger T.P.J., Roebben G., Solans C., Ramsch R. Reference materials for measuring the size of nanoparticles. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2011, 30 pp. 18–27

[63] Maurer E.I., Sharma M., Schlager J.J., Hussain S.M. Systematic analysis of silver nanoparticle ionic dissolution by tangential flow filtration: toxicological implications. Nanotoxicology. 2014, 8 pp. 718–727

[64] Elder A., Lynch I., Grieger K. Human health risks of engineered nanomaterials: critical knowledge gaps in nanomaterials risk assessment. In: Nanomaterials: Risks and Benefits, (Linkov I., & Steevens J. eds.). Springer, Dordrecht, 2009, pp. 3–29.

[65] Roebben G., Rasmussen K., Kestens V., Linsinger T.P.J., Rauscher H., Emons H. Reference materials and representative test materials: the nanotechnology case. J. Nanopart. Res. 2013, 15 pp. 1–13

[66] Stefaniak A.B., Hackley V.A., Roebben G., Ehara K., Hankin S., Postek M.T. Nanoscale reference materials for environmental, health and safety measurements: needs, gaps and opportunities. Nanotoxicology. 2013, 7 pp. 1325–1337

[67] ECHA European Chemicals Agency. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Appendix R7-1 Recommendations for nanomaterials applicable to Chapter R7a Endpoint specific guidance. ECHA-12-G-03-EN, Helsinki. 2012

[68] OECD. 2012. Guidance on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials. Series on the safety of Manufacture Nanomaterials No. 36. JM/MOMO, Paris, NV, 2012, pp. 40.

[69] Niidome T., Yamagata M., Okamoto Y. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo application. J. Control. Release. 2006, 114 pp. 343–347

[70] Lankveld D.P.K., Rayavarapu R.G., Krystek P., Oomen A.G., Verharen H.W., Van Leeuwen T.G. Blood clearance and tissue distribution of PEGylated and non-PEGylated gold nanorods after intravenous administration in rats. Nanomedicine (Lond.). 2011, 6 pp. 339–349

[71] Schulze C., Kroll A., Lehr C.-M., Schäfer U.F., Becker K., Schnekenburger J. Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. Nanotoxicology. 2008, 2 pp. 51–61

[72] Teeguarden J.G., Hinderliter P.M., Orr G., Thrall B.D., Pounds J.G. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. Toxicol. Sci. 2007, 95 pp. 300–312

[73] Petersen E.J., Diamond S.A., Kennedy A.J., Goss G.G., Ho K., Lead J. Adapting OECD Aquatic Toxicity Tests for Use with Manufactured Nanomaterials: Key Issues and Consensus Recommendations. Environ. Sci. Technol. 2015, 49 pp. 9532–9547

[74] Cho E.C., Zhang Q., Xia Y. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. Nat. Nanotechnol. 2011, 6 pp. 385–391

[75] Lison D., & Huaux F. In vitro studies: Ups and downs of cellular uptake. Nat. Nanotechnol. 2011, 6 pp. 332–333

[76] Clippinger A.J., Ahluwalia A., Allen D., Bonner J.C., Casey W., Castranova V. Expert consensus on an in vitro approach to assess pulmonary fibrogenic potential of aerosolized nanomaterials. Arch. Toxicol. 2016, 90 pp. 1769–1783

[77] Crist R.M., Grossman J.H., Patri A.K., Stern S.T., Dobrovolskaia M.A., Adiseshaiah P.P. Common pitfalls in nanotechnology: lessons learned from NCI's Nanotechnology Characterization Laboratory. Integr. Biol. 2013, 5 pp. 66–73

[78] Esch R.K., Han L., Foarde K.K., Ensor D.S. Endotoxin contamination of engineered nanomaterials. Nanotoxicology. 2010, 4 pp. 73–83

[79] Vallhov H., Qin J., Johansson S.M., Ahlborg N., Muhammed M.A., Scheynius A. The importance of an endotoxin-free environment during the production of nanoparticles used in medical applications. Nano Lett. 2006, 6 pp. 1682–1686

[80] Dobrovolskaia M.A., Neun B.W., Clogston J.D., Ding H., Ljubimova J., McNeil S.E. Ambiguities in applying traditional Limulus amebocyte lysate tests to quantify endotoxin in nanoparticle formulations. Nanomedicine (Lond.). 2010, 5 pp. 555–562

[81] Neun B.W., & Dobrovolskaia M.A. Detection and quantitative evaluation of endotoxin contamination in nanoparticle formulations by LAL-based assays. Methods Mol. Biol. 2011, 697 pp. 121–130

[82] Dobrovolskaia M.A., & McNeil S.E. Endotoxin and Engineered Nanomaterials. Pages 77-110 in Dobrovolskaia MA, McNeil SE.(Eds). Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials. World Scientific Publishing Co, Singapore. 2013

[83] Giannakou C., Geertsma R.E., De Jong W.H., Van Loveren H., Vandebriel R.J., Park M.V.D.Z. Immunotoxicity testing of nanomedicinal products: possible pitfalls in endotoxin determination. Current Bionanotechnology. 2016, 2 pp. 95 -102

[84] Dobrovolskaia M.A., Neun B.W., Clogston J.D., Grossman J.H., McNeil S.E. Choice of method for endotoxin detection depends on nanoformulation. Nanomedicine (Lond.). 2014, 9 pp. 1847–1856

[85] Hartung T., & Sabbioni E. Alternative in vitro assays in nanomaterial toxicology. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2011, 3 pp. 545–573

[86] Schindler S., von Aulock S., Daneshian M., Hartung T. Development, validation and applications of the monocyte activation test for pyrogens based on human whole blood. ALTEX. 2009, 26 pp. 265–277

[87] Vauthier C., & Bouchemal K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. Pharm. Res. 2009, 26 pp. 1025–1058

[88] Subbarao N. Impact of Nanoparticle Sterilization on Analytical Characterization. Pages 53-71 in Dobrovolskaia MA, McNeil SE. (Eds). Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials. World Scientific Publishing Co, Singapore. 2013

[89] Ulset A.S., Mori H., Dalheim M.Ø., Hara M., Christensen B.E. Influence of amino acids, buffers, and ph on the γ-irradiation-induced degradation of alginates. Biomacromolecules. 2014, 15 pp. 4590–4597

[90] Van Der Zande M., Vandebriel R.J., Van Doren E., Kramer E., Herrera Rivera Z., SerranoRojero C.S. Distribution, Elimination, and Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Rats after 28-Day Oral Exposure. ACS Nano. 2012, 6 pp. 7427–7442

[91]Sanchez V.C., Pietruska J.R., Miselis N.R., Hurt R.H., Kane A.B. Biopersistence and potential adverse health impacts of fibrous nanomaterials: what have we learned from asbestos? Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2009, 1 pp. 511–529

[92] Bogdan A., Buckett M.I., Japuntich D.A. Nano-sized aerosol classification, collection and analysis–method development using dental composite materials. J. Occup. Environ. Hyg. 2014, 11 pp. 415–426

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

[94] Lipka J., Semmler-Behnke M., Sperling R.A., Wenk A., Takenaka S., Schleh C. Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. Biomaterials. 2010, 31 pp. 6574–6581

[95] Hirn S., Semmler-Behnke M., Schleh C., Wenk A., Lipka J., Schäffler M. Particle sizedependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2011, 77 pp. 407–416

[96] Sonavane G., Tomoda K., Sano A., Ohshima H., Terada H., Makino K. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. Colloids Surf. B Biointerfaces. 2008, 65 pp. 1–10

[97] Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. Pharmacol. Rev. 2001, 53 pp. 283–318

[98] Hillaireau H., & Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. Cell. Mol. Life Sci. 2009, 66 pp. 2873–2896

[99] Nel A.E., Madler L., Velegol D., Xia T., Hoek E. M/V., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M., Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. Nat. Mater. 2009, 8 pp. 543–557

[100] Tang S., Chen M., Zheng N. Sub-10-nm Pd Nanosheets with Renal Clearance for Efficient NearInfrared Photothermal Cancer Therapy. Small. 2014, 15 pp. 3139–3144

[101] Xie G., Sun J., Zhong G., Shi L., Zhang D. Biodistribution and toxicity of intravenously administered silica nanoparticles in mice. Arch. Toxicol. 2010, 84 pp. 183–190

[102] Xie G.P., Sun J., Zhong G.R. Tissular Localization and Excretion of Intravenously Administered Silica Nanoparticles of Different Sizes. J. Nanopart. Res. 2012, 14 pp. 671–680

[103] Alkilany A.M., & Murphy C.J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? J. Nanopart. Res. 2010, 12 pp. 2313–2333

[104] Lynch I., Cedervall T., Lundqvist M., Cabaleiro-Lago C., Linse S., Dawson K.A. The nanoparticle–protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. Adv. Colloid Interface Sci. 2007, 134–135 pp. 167–174

[105] Lynch I., Salvati A., Dawson K.A. Protein-nanoparticle interactions: What does the cell see? Nat. Nanotechnol. 2008, 4 pp. 546–547

[106] Lankveld D.P., Oomen A.G., Krystek P., Neigh A., Troost-de Jong A., Noorlander C.W. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. Biomaterials. 2010, 31 pp. 8350–8361

[107] Demoy M., Gibaud S., Andreux J.P., Weingarten C., Gouritin B., Couvreur P. Splenic trapping of nanoparticles: complementary approaches for in situ studies. Pharm. Res. 1997, 14 pp. 463–468

[108] Gibaud S., Demoy M., Andreux J.P., Weingarten C., Gouritin B., Couvreur P. Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs. J. Pharm. Sci. 1996, 85 pp. 944–950

[109] Lenaerts V., Nagelkerke J.F., Van Berkel T.J., Couvreur P., Grislain L., Roland M. In vivo uptake of polyisobutyl cyanoacrylate nanoparticles by rat liver Kupffer, endothelial, and parenchymal cells. J. Pharm. Sci. 1984, 73 pp. 980–982

[110] Sadauskas E., Wallin H., Stoltenberg M., Vogel U., Doering P., Larsen A. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. Part. Fibre Toxicol. 2007, 4 p. 10

[111] Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Lynch I., Cedervall T., Dawson K.A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008, 105 pp. 14265–14270

[112] Walkey C.D., & Chan W.C. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. Chem. Soc. Rev. 2012, 41 pp. 2780–2799

[113] Monopoli M.P., Aberg C., Salvati A., Dawson K.A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. Nat. Nanotechnol. 2012, 12 pp. 779–786

[114] Mwilu S.K., El Badawy A.M., Bradham K., Nelson C., Thomas D., Scheckel K.G. Changes in silver nanoparticles exposed to human synthetic stomach fluid: effects of particle size and surface chemistry. Sci. Total Environ. 2013, 447 pp. 90–98

[115] Pal T., Sau T.K., Jana N.R. Reversible Formation and Dissolution of Silver Nanoparticles in Aqueous Surfactant Media. Langmuir. 1997, 13 pp. 1481–1485

[116] Rogers K.R., Bradham K., Tolaymat T., Thomas D.J., Hartmann T., Ma L. Alterations in physical state of silver nanoparticles exposed to synthetic human stomach fluid. Sci. Total Environ. 2012, 420 pp. 334–339

[117] Osmond-McLeod M.J., Poland C.A., Murphy F., Waddington L., Morris H., Hawkins S.C. Durability and inflammogenic impact of carbon nanotubes compared with asbestos fibres. Part. Fibre Toxicol. 2011, 8 p. 15

[118] Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fizpatric J., Ausman K. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanoparticles: elements of a screening strategy. Part. Fibre Toxicol. 2005, 2 p. 8

[119] Fu C., Liu T., Li L., Liu H., Chen D., Tang F. The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes. Biomaterials. 2013, 34 pp. 2565–2575

[120] Li C.H., Shen C.C., Cheng Y.W., Huang S.H., Wu C.C., Kao C.C. Organ biodistribution, clearance, and genotoxicity of orally administered zinc oxide nanoparticles in mice. Nanotoxicology. 2012, 6 pp. 746–756

[121] Huang X., Zhang F., Zhu L., Choi K.Y., Guo N., Guo J. Effect of injection routes on the biodistribution, clearance, and tumor uptake of carbon dots. ACS Nano. 2013, 23 pp. 5684–5693

[122] Semmler-Behnke M1. Kreyling WG, Lipka J, Fertsch S, Wenk A, Takenaka S, Schmid G, Brandau W. Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats. Small. 2008, 4 pp. 2108–2111

[123] Crosera M., Bovenzi M., Maina G., Adami G., Zanette C., Florio C. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 2009, 82 pp. 1043–1055

[124] DEPA. Danish Ministry of the Environment, Environmental Protection Agency. Dermal absorption of nanomaterials. Environmental Project no. 1504. 2013

[125] Campbell C.S., Contreras-Rojas L.R., Delgado-Charro M.B., Guy R.H. Objective assessment of nanoparticle disposition in mammalian skin after topical exposure. J. Control. Release. 2012, 162 pp. 201–207

[126] Elder A., Gelein R., Silva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. Environ. Health Perspect. 2006, 114 pp. 1172–1178

[127] Oberdörster G., Elder A., Rinderknecht A. Nanoparticles and the brain: cause for concern? J. Nanosci. Nanotechnol. 2009, 9 pp. 4996–5007

[128] Zhang L., Bai R., Liu Y., Meng L., Li B., Wang L. The dose-dependent toxicological effects and potential perturbation on the neurotransmitter secretion in brain following intranasal instillation of copper nanoparticles. Nanotoxicology. 2012, 6 pp. 562–575

[129] Oberdörster G. Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles. Inhal. Toxicol. 2002, 14 pp. 29–56

[130] Halpern B.N., Benacerraf B., Biozzi G. Quantitative study of the granulopectic activity of the reticulo-endothelial system. I. The effect of the ingredients present in India ink and of substances affecting blood clotting in vivo on the fate of carbon particles administered intravenously in rats, mice and rabbits. Br. J. Exp. Pathol. 1953, 34 pp. 426–440

[131] Panagi Z., Beletsi A., Evangelatos G., Livaniou E., Ithakissios D.S., Avgoustakis K. Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. Int. J. Pharm. 2001, 221 pp. 143–152

[132] Biozzi G., Benacerraf B., Halpern B.N. Quantitative study of the granulopectic activity of the reticulo-endothelial system. II. A study of the kinetics of the R. E. S. in relation to the dose of carbon

injected; relationship between the weight of the organs and their activity. Br. J. Exp. Pathol. 1953, 34 pp. 441–457

[133] Kim Y.S., Song M.Y., Park J.D., Song K.S., Ryu H.R., Chung Y.H. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. Part. Fibre Toxicol. 2010, 7 p. 20

[134] Sung J.H., Ji J.H., Park J.D., Yoon J.U., Kim D.S., Jeon K.S. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. Toxicol. Sci. 2009, 108 pp. 452–461

[135] Bermudez E., Mangum J.B., Wong B.A., Asgharian B., Hext P.M., Warheit D.B. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. Toxicol. Sci. 2004, 77 pp. 347–357

[136] Brown J.S., Wilson W.E., Grant L.D. Dosimetric comparisons of particle deposition and retention in rats and humans. Inhal. Toxicol. 2005, 17 pp. 355–385

[137] Demoy M., Andreux J.P., Weingarten C., Gouritin B., Guilloux V., Couvreur P. Spleen capture of nanoparticles: influence of animal species and surface characteristics. Pharm. Res. 1999, 16 pp. 37–41

[138] Peters R.J., Rivera Z.H., van Bemmel G., Marvin H.J., Weigel S., Bouwmeester H. Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. Anal. Bioanal. Chem. 2014, 406 pp. 3875–3885

[139] Magaye R., & Zhao J. Recent progress in studies of metallic nickel and nickel-based nanoparticles'genotoxicity and carcinogenicity. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2012, 34 pp. 644–650

[140] Shatkin J.A., & Ong K.J. Alternative Testing Strategies for Nanomaterials: State of the Science and Considerations for Risk Analysis. Risk Anal. 2016, 36 pp. 1564–1580

[141] Sharma M., Shatkin J.A., Cairns C., Canady R., Clippinger A.J. Framework to Evaluate Exposure Relevance and Data Needs for Risk Assessment of Nanomaterials using in Vitro Testing Strategies. Risk Anal. 2016, 36 pp. 1551–1563

[142] Xia T., Kovochich M., Nel A. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in mediating particulate matter injury. Clin. Occup. Environ. Med. 2006, 5 pp. 817–836

[143] Zhang H., Ji Z., Xia T., Meng H., Low-Kam C., Liu R. Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. ACS Nano. 2012, 22 pp. 4349–4368

[144] Monteiller C., Tran L., MacNee W., Faux S., Jones A., Miller B. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: The role of surface area. Occup. Environ. Med. 2007, 64 pp. 609–615

[145] Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ. Health Perspect. 2005, 113 pp. 823–839 [146] Delmaar C.J., Peijnenburg W.J., Oomen A.G., Chen J., de Jong W.H., Sips A.J. A practical approach to determine dose metrics for nanomaterials. Environ. Toxicol. Chem. 2015, 34 pp. 1015–1022

[147] Kong B., Seog J.H., Graham L.M., Lee S.B. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. Nanomedicine (Lond.). 2011, 6 pp. 929–941

[148] Sharma G., Kodali V., Gaffrey M., Wang W., Minard K.R., Karin N.J. Iron oxide nanoparticle agglomeration influences dose rates and modulates oxidative stress-mediated dose-response profiles in vitro. Nanotoxicology. 2014, 8 pp. 663–675

[149] Lison D., Thomassen L.C.J., Rabolli V., Gonzalez L., Napierska D., Seo J.W. Nominal and Effective Dosimetry of Silica Nanoparticles in Cytotoxicity Assays. Toxicol. Sci. 2008, 104 pp. 155–162

[150] Guadagnini R., Halamoda Kenzaoui B., Cartwright L., Pojana G., Magdolenova Z., Bilanicova D. 2013. Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. Nanotoxicology. 2015, 9 () pp. 25–32

[151] Casey A., Herzog E., Davoren M., Lyng F.M., Byrne H.J., Chambers G. Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. Carbon. 2007, 45 pp. 1425–1432

[152] Wörle-Knirsch J.M., Pulskamp K., Krug H.F. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. Nano Lett. 2006, 6 pp. 1261–1268

[153] Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O., Zhang L.W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. Toxicol. Appl. Pharmacol 2009, 234 pp. 222–235

[154] Lupu A.R., & Popescu T. The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO2 nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays. Toxicol. In Vitro. 2013, 27 pp. 1445–1450

[155] Xia T., Hamilton R.F., Bonner J.C., Crandall E.D., Elder A., Fazlollahi F. Interlaboratory evaluation of in vitro cytotoxicity and inflammatory responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium. Environ. Health Perspect. 2013, 121 pp. 683–690

[156] Ong K.J., MacCormack T.J., Clark R.J., Ede J.D., Ortega V.A., Felix L.C. Widespread nanoparticle-assay interference: implications for nanotoxicity testing. PLoS One. 2014, 9 p. e90650

[157] Park M.V.D.Z., Neigh A.M., Vermeulen J.P., de la Fonteyne L.J.J., Verharen H.W., Briede J.J. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. Biomaterials. 2011, 32 pp. 9810–9817

[158] 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

[159] Wilhelmi V., Fischer U., van Berlo D., Schulze-Osthoff K., Schins R.P.F., Albrecht C. Evaluation of apoptosis induced by nanoparticles and fine particles in RAW 264 Macrophages: facts and artefacts. Toxicol. In Vitro. 2012, 26 pp. 323–334

[160] Pfuhler S., Elespuru R., Aardema M.J., Doak S.H., Maria Donner E., Honma M. Genotoxicity of nanomaterials: Refining strategies and tests for hazard identification. Environ. Mol. Mutagen. 2013, 54 pp. 229–239

[161] AshaRani. P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P., and Valiyaveettil, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. ACS Nano. 2009, 3 pp. 279–290

[162] Mei N., Zhang Y.B., Chen Y., Guo X.Q., Ding W., Ali S.F. Silver nanoparticle-induced mutations and oxidative stress in mouse lymphoma cells. Environ. Mol. Mutagen. 2012, 53 pp. 409–419

[163] Butler K.S., Peeler D.J., Casey B.J., Dair B.J., Elespuru R.K. Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. Mutagenesis. 2015, 30 pp. 577–591

[164] Paino I.M.M., Marangoni V.S., de Oliveira R.D.S., Antunes L.M.G., Zucolotto V. Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. Toxicol. Lett. 2012, 215 pp. 119–125

[165] Schulz M., Ma-Hock L., Brill S., Strauss V., Treumann S., Groters S. Investigation on the genotoxicity of different sizes of gold nanoparticles administered to the lungs of rats. Mutat. Res. 2012, 745 pp. 51–57

[166] Ahamed M., & Alhadlaq H.A. Nickel nanoparticle-induced dose-dependent cyto- genotoxicity in human breast carcinoma MCF-7 cells. Onco Targets Ther. 2014, 7 pp. 269–280

[167] Landsiedel R., Kapp M.D., Schulz M., Wiench K., Oesch F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations–many questions, some answers. Mutat. Res. 2009, 681 pp. 241–258

[168] Doak S.H., Manshian B., Jenkins G.J., Singh N. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. Mutat. Res. 2012, 745 pp. 104–111

[169] Barnes C.A., Elsaesser A., Arkusz J., Smok A., Palus J., Leśniak A. Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity. Nano Lett. 2008, 8 pp. 3069–3074

[170] Hansen T., Clermont G., Alves A., Eloy R., Brochhausen C., Boutrand J.P. Biological tolerance of different materials in bulk and nanoparticulate form in a rat model: sarcoma development by nanoparticles. J. R. Soc. Interface. 2006, 3 pp. 767–775

[171] Park S., Lee Y.K., Jung M., Kim K.H., Chung N. Cellular toxicity of various inhalable nanoparticles on human alveolar epithelial cells. Inhal. Toxicol. 2007, 9 pp. 59–65

[172] Petersen E.J., Tu X., Dizdaroglu M., Zheng M., Nelson B.C. Protective roles of single- wall carbon nanotubes in ultrasonication-induced DNA base damage. Small. 2013, 9 pp. 205–208

[173] Sayes C.M., Wahi R., Kurian P.A., Liu Y., West J.L., Ausman K.D. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. Toxicol. Sci. 2006, 92 pp. 174–185

[174] Warheit D.B., Webb T.R., Reed K.L., Frerichs S., Sayes C.M. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO2 particles: differential responses related to surface properties. Toxicology. 2007, 230 pp. 90–104

[175] Doak S.H., Manshian B., Jenkins G.J.S., Singh N. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. Mutat. Res. 2012, 745 pp. 104–111

[176] Clift M.J.D., Raemy D.O., Endes C., Ali Z., Lehmann A.D., Brandenberger C. Can the Ames test provide an insight into nano-object mutagenicity? Investigating the interaction between nano-objects and bacteria. Nanotoxicology. 2013, 7 pp. 1373–1385

[177] Sera N., Tokiwa H., Miyata N. Mutagenicity of the fullerene C60-generated singlet oxygen dependent formation of lipid peroxides. Carcinogenesis. 1996, 17 pp. 2163–2169

[178] Doak S.H., Griffiths S.M., Manshian B., Singh S., Williams P.M., Brown A.P. Confounding experimental considerations in nano(geno)toxicology. Mutagenesis. 2009, 24 pp. 285–293

[179] Serda R.E., Gu J., Bhavane R.C., Liu X., Chiappini C., Decuzzi P. The association of silicon microparticles with endothelial cells in drug delivery to the vasculature. Biomaterials. 2009, 30 pp. 2440–2448

[180] FDA. 2012. “International Conference on Harmonisation; guidance on S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; availability. Notice.” Fed Regist 77(110): 33748-33749

[181] Rothfuss A., , & Honma M et al. “Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing.” Mutat Res. 2011, 723(2): 108-120

[182] Louro H., Tavares A., Vital N., Costa P.M., Alverca E., Zwart E. Integrated approach to the in vivo genotoxic effects of a titanium dioxide nanomaterial using LacZ plasmid-based transgenic mice. Environ. Mol. Mutagen. 2014, 55 pp. 500–509

[183] Gossen J.A., Martus H.-J., Wei J., Vijg J. Spontaneous and x-ray induced deletion mutations in a LacZ plasmid-based transgenic mouse model. Mutat. Res. 1995, 331 pp. 89–97

[184] Jackson S.P., & Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature. 2009, 461 pp. 1071–1078

[185] Kumar A., & Dhawan A. Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: an update. Arch. Toxicol. 2013, 87 pp. 1883–1900

[186] Borm P.J., & Kreyling W. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles–potential implications for drug delivery. J. Nanosci. Nanotechnol. 2004, 4 pp. 521–531

[187] Pott F., & Roller M. Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats. Eur. J. Oncol. 2005, 10 pp. 249–281

[188] Oberdörster G. Lung particle overload: implications for occupational exposures to particles. Regul. Toxicol. Pharmacol. 1995, 21 pp. 123–135

[189] Valberg P.A., Bruch J., McCunney R.J. Are rat results from intratracheal instillation of 19 granular dusts a reliable basis for predicting cancer risk? Regul. Toxicol. Pharmacol. 2009, 54 pp. 72–83

[190] Roller M. Differences between the data bases, statistical analyses, and interpretations of lung tumors of the 19-dust study – Two controversial views. Exp. Toxicol. Pathol. 2007, 58 pp. 393–405

[191] Morfeld P., Albrecht C., Drommer W., Borm P.J.A. Dose response and threshold analysis of tumour prevalence after intratracheal instillation of six types of low and high surface area particles in a chronic rat experiment. Inhal. Toxicol. 2006, 18 pp. 215–225

[192] Poland C.A., Duffin R., Kinloch I., Maynard A., Wallace W.A., Seaton A. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. Nat. Nanotechnol. 2008, 3 pp. 423–428

[193] Donaldson K., Murphy F.A., Duffin R., Poland C.A. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. Part. Fibre Toxicol. 2010, 7 p. 5

[194] Storer R.D., French J.E., Donehower L.A., Gulezian D., Mitsumori K., Recio L.IWGT Working Group. Transgenic tumor models for carcinogen identification: the heterozygous Trp53-deficient and RasH2 mouse lines. Mutat. Res. 2003, 540 pp. 165–176

[195] Boverhof D.R., Chamberlain M.P., Elcombe C.R., Gonzalez F.J., Heflich R.H., Hernández L.G. Benthem Jv, Gollapudi BB. Transgenic animal models in toxicology: historical perspectives and future outlook. Toxicol. Sci. 2011, 121 pp. 207–233

[196] Austin C.A., Umbreit T.H., Brown K.M., Barber D.S., Dair B.J., Francke-Carroll S. Distribution of silver nanoparticles in pregnant mice and developing embryos. Nanotoxicology. 2012, 6 pp. 912–922

[197] Hougaard K.S., Campagnolo L., Chavatte-Palmer P., Tarrade A., Rousseau-Ralliard D., Valentino S. A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. Reprod

Toxicol. 2015, 56 pp. 118–140

[198] De Jong W.H., Van Der Ven L.T.M., Sleijffers A., Park M.V.D.Z., Jansen E.H.J.M., Van Loveren H. Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. Biomaterials. 2013, 34 pp. 8333–8343

[199] Sharma M., Salisbury R.L., Maurer E.I., Hussain S.M., Sulentic C.E. Gold nanoparticles induce transcriptional activity of NF-κB in a B-lymphocyte cell line. Nanoscale. 2013, 5 pp. 3747–3756

[200] Tsai C.Y., Lu S.L., Hu C.W., Yeh C.S., Lee G.B., Lei H.Y. Size-dependent attenuation of TLR9 signaling by gold nanoparticles in macrophages. J. Immunol. 2012, 188 pp. 68–76

[201] Ishii N., Fitrilawati F., Manna A., Akiyama H., Tamada Y., Tamada K. Gold Nanoparticles Used as a Carrier Enhance Production of Anti-Hapten IgG in Rabbit: A Study with AzobenzeneDye as a Hapten Presented on the Entire Surface of Gold Nanoparticles. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008, 72 pp. 124–131

[202] Maquieira Á., Brun E.M., Garcés-García M., Puchades R. Aluminum Oxide Nanoparticles as Carriers and Adjuvants for Eliciting Antibodies from Non-immunogenic Haptens. Anal. Chem. 2012, 84 pp. 9340–9348

[203] Dykman L.A., Staroverov S.A., Bogatyrev V.A., Shchyogolev S.Y. Adjuvant properties of gold nanoparticles. Nanotechnol. Russ. 2010, 5 pp. 748–761

[204] Dwivedi P.D., Tripathi A., Ansari K.M., Shanker R., Das M. Impact of Nanoparticles on the Immune System. J. Biomed. Nanotechnol. 2011, 7 pp. 193–194

[205] Vandebriel R.J., Tonk E.C.M., De La Fonteyne-Blankestijn L.J., Gremmer E.R., Verharen H.W., Van Der Ven L.T. Immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28-day repeated-dose toxicity study in rats. Part. Fibre Toxicol. 2014, 11 p. 21

[206] De Jong W.H., & Van Loveren H. Guest Editor's Introduction. Animal models in immunotoxicology. Methods. 2007, 41 pp. 1–2

[207] Dobrovolskaia M.A., Germolec D.R., Weaver J.L. Evaluation of nanoparticle immunotoxicity. Nat. Nanotechnol. 2009, 4 pp. 411–414

[208] Boraschi D., Costantino L., Italiani P. Interaction of nanoparticles with immunocompetent cells: nanosafety considerations. Nanomedicine (Lond.). 2012, 7 pp. 121–131

[209] Farrera C., & Fadeel B. It takes two to tango: Understanding the interactions between engineered nanomaterials and the immune system. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2015, 95 pp. 3– 12

[210] Zolnik B.S., Gonzalez-Fernandez A., Sadrieh N., Dobrovolskaia M.A. Minireview: Nanoparticles and the Immune System. Endocrinology. 2010, 151 pp. 458–465

[211] Gad S.C., Sharp K.L., Montgomery C., Payne J.D., Goodrich G.P. Evaluation of the Toxicity of Intravenous Delivery of Auroshell Particles (Gold–Silica Nanoshells). Int. J. Toxicol. 2012, 31 pp. 584–594

[212] Kim J.S., Song K.S., Sung J.H., Ryu H.R., Choi B.G., Cho H.S. Genotoxicity, acute oral and dermal toxicity, eye and dermal irritation and corrosion and skin sensitisation of silver nanoparticles. Nanotoxicology. 2013, 7 pp. 953–960

[213] SCCS. 2012 OPINION ON Zinc oxide (nano form), COLIPA S 76. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_103.pdf

[214] SCCS. 2013. Opinion on Titanium Dioxide (Nano form). Colipa No. S75. Scientific Committee on Consumer Safety. European Commission. SCCS/1516/13. Luxembourg. pp. 31-33. Available at: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_136.pdf

[215] Park Y.H., Jeong S.H., Yi S.M., Choi B.H., Kim Y.R., Kim I.K. Analysis for the potential of polystyrene and TiO2 nanoparticles to induce skin irritation, phototoxicity, and sensitization. Toxicol. In Vitro. 2011, 25 pp. 1863–1869

[216] Ema M., Matsuda A., Kobayashi N., Naya M., Nakanishi J. Evaluation of dermal and eye irritation and skin sensitization due to carbon nanotubes. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2011, 61 pp. 276–281

[217] Ema M., Matsuda A., Kobayashi N., Naya M., Nakanishi J. Dermal and ocular irritation and skin sensitization studies of fullerene C60 nanoparticles. Cutan. Ocul. Toxicol. 2013, 32 pp. 128–134

[218] Baroli B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? J. Pharm. Sci. 2010, 99 pp. 21–50

[219] ECHA. 2014. Guinea pig maximization test of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT), synthetic graphite in tubular shape. European Chemicals Agency Registered Substances Database. EC List No. 936-414-1. Bayer MaterialScience AG, et al. Available at: https://echa .europa.eu/information-on-chemicals/registered-substances

[220] Rouse J.G., Yang J., Ryman-Rasmussen J.P., Barron A.R., Monteiro-Riviere N.A. Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin. Nano Lett. 2007, 7 pp. 155–160

[221] Hoet P.H., Brüske-Hohlfeld I., Salata O.V. Nanoparticles – known and unknown health risks. J. Nanobiotechnology. 2004, 2 p. 12

[222] Ryman-Rasmussen J.P., Riviere J.E., Monteiro-Riviere N.A. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. Toxicol. Sci. 2006, 91 pp. 159–165

[223] Samberg M.E., Oldenburg S.J., Monteiro-Riviere N.A. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro. Environ. Health Perspect. 2010, 118 pp. 407–413

[224] Monteiro-Riviere N.A., & Filon F.L. Skin. In: Adverse Effects of Engineered Nanomaterials. Elsevier, 2012., 10.1016/B978-0-12-386940-1.00011-8

[225] Ogunsola O.A., Kraeling M.E., Zhong S., Pochan D.J., Bronaughd R.L., Raghavan S.R. Structural analysis of "flexible" liposome formulations: new insights into the skin-penetrating ability of soft nanostructures. Soft Matter. 2012, 40 pp. 10226–10232

[226] Ryman-Rasmussen J.P., Riviere J.E., Monteiro-Riviere N.A. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes. J. Invest. Dermatol. 2007, 127 pp. 143–153

[227] Wang S., Lu W., Tovmachenko O., Rai U.S., Yu H., Ray P.C. Challenge in Understanding Size and Shape Dependent Toxicity of Gold Nanomaterials in Human Skin Keratinocytes. Chem. Phys. Lett. 2008, 463 pp. 145–149

[228] Karadzovska D., Brooks J.D., Monteiro-Riviere N.A., Riviere J.E. Predicting skin permeability from complex vehicles. Adv. Drug Deliv. Rev. 2013, 65 pp. 265–277

[229] Lee H.A., Imran M., Monteiro-Riviere N.A., Colvin V.L., Yu W.W., Riviere J.E. Biodistribution of quantum dot nanoparticles in perfused skin: Evidence of coating dependency and periodicity in arterial extraction. Nano Lett. 2007, 7 pp. 2865–2870

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

[231] Monteiro-Riviere N.A., Wiench K., Landsiedel R., Schulte S., Inman A.O., Riviere J.E. Safety Evaluation of Sunscreen Formulations Containing Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in UVB Sunburned Skin: An In Vitro and In Vivo Study. Toxicol. Sci. 2011, 123 pp. 264–280

[232] Prow T.W., Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O., Grice J.E., Chen X., Zhao X. Quantum dot penetration into viable human skin. Nanotoxicology. 2012, 6 pp. 173–185

[233] Zhang L.S.W., & Monteiro-Riviere N.A. Use of confocal microscopy for nanoparticle drug delivery through skin. J. Biomed. Opt. 2013, 18 p. 6

[234] Jatana S., Callahan L.M., Pentland A.P., DeLouise L.A. Impact of cosmetic lotions on nanoparticle penetration through ex vivo C57BL/6 hairless mouse and human skin: A comparison study. Cosmetics. 2016, 3 p. 6

[235] Ding L., Stilwell J., Zhang T., Elboudwarej O., Jiang H., Selegue J.P. Molecular Characterization of the Cytotoxic Mechanism of Multiwall Carbon Nanotubes and Nano-Onions on Human Skin Fibroblast. Nano Lett. 2005, 5 pp. 2448–2464

[236] Sayes C.M., Gobin A.M., Ausman K.D., Mendez J., West J.L., Colvin V.L. Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. Biomaterials. 2005, 26 pp. 7587–7595

[237] Papageorgiou I., Brown C., Schins R., Singh S., Newson R., Davis S. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro. Biomaterials. 2007, 28 pp. 2946–2958

[238] Zhang Y., Hu L., Yu D., Gao C. Influence of silica particle internalization on adhesion and migration of human dermal fibroblasts. Biomaterials. 2010, 31 pp. 8465–8474

[239] Kishore A.S., Surekha P., Murthy P.B. Assessment of the dermal and ocular irritation potential of multi-walled carbon nanotubes by using in vitro and in vivo methods. Toxicol. Lett. 2009, 191 pp. 268–274

[240] Warheit D.B., Hoke R.A., Finlay C., Donner E.M., Reed K.L., Sayes C.M. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO2 particles as a component of nanoparticle risk management. Toxicol. Lett. 2007, 171 pp. 99–110

[241] Park Y.H., Kim J.N., Jeong S.H., Choi J.E., Lee S.H., Choi B.H. Assessment of dermal toxicity of nanosilica using cultured keratinocytes, a human skin equivalent model and an in vivo model. Toxicology. 2010, 267 pp. 178–181

[242] Kolle S.N., Sauer U.G., Moreno M.C., Teubner W., Wohlleben W., Landsiedel R. Eye irritation testing of nanomaterials using the EpiOcular™ eye irritation test and the bovine corneal opacity and permeability assay. Part. Fibre Toxicol. 2016, 13 p. 18

[243] Szebeni J., Muggia F., Gabizon A., Barenholz Y. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: Prediction and prevention. Adv. Drug Deliv. Rev. 2011, 63 pp. 1020–1030

[244] Abalde S.L., & Fernandez A.G. Nanostructures and Allergy. In: Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials, (Dobrovolskaia M.A., & McNeil S.E. eds.). World Scientific Publishing Company, Ltd, Hackensack, New Jersey, 2013, pp. 528–9.

[245] Zhang X.-Q., Xu X., Bertrand N., Pridgen E., Swami A., Farokhzad O.C. Interactions of nanomaterials and biological systems: implications to personalized nanomedicine. Adv. Drug Deliv. Rev. 2012, 64 pp. 1363–1384

[246] Smith B.S., Yoriya S., Grissom L., Grimes C.A., Popat K.C. Hemocompatibility of titania nanotube arrays. J. Biomed. Mater. Res. A. 2010, 95 pp. 350–360 [Erratum in: J Biomed Mater Res A. 96, 608, 2011]

[247] Liu X, & Sun J. Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF-kB pathway. Biomaterials. 2010, 31 pp. 8198–8209

[248] Liu X, Xue Y, Ding T, Sun J Enhancement of proinflammatory and procoagulant responses to silica particles by monocyte-endothelial cell interactions. Part. Fibre Toxicol. 2012, 9 p. 36

[249] Liu X., & Sun J. Potential proinflammatory effects of hydroxyapatite nanoparticles on endothelial cells in a monocyte–endothelial cell coculture model. Int. J. Nanomedicine. 2014, 9 pp. 1261–1273

[250] Kelly L.S., Dobson E.L., Finney C.R., Hirsch J.D. Proliferation of the reticuloendothelial system in the liver. Am. J. Physiol. 1960, 198 pp. 1134–1138

[251] Parker H.G., & Finney C.R. Latent period in the induction of reticuloendothelial blockade. Am. J. Physiol. 1960, 198 pp. 916–920

[252] OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). Important Issues on Risk Assessment of Manufactured Nanomaterials. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 33. ENV/JM/MONO(2012)8. 2012

[253] MacPhail R.C., Grulke E.A., Yokel R.A. Assessing nanoparticle risk poses prodigious challenges. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2013, 5 pp. 374–387

[254] Lee J.H., Kim Y.S., Song K.S., Ryu H.R., Sung J.H., Park J.D. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. Part. Fibre Toxicol. 2013, 10 p. 36

[255] Cho W.S., Kang B.C., Lee J.K., Jeong J., Che J.H., Seok S.H. Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. Part. Fibre Toxicol. 2013, 10 p. 9

[256] Ma X., Wu Y., Jin S., Tian Y., Zhang X., Zhao Y. Gold Nanoparticles Induce Autophagosome Accumulation through Size-Dependent Nanoparticle Uptake and Lysosome Impairment. ACS Nano. 2011, 5 pp. 8629–8639

[257] Simpson C.A., Salleng K.J., Cliffel D.E., Feldheim D.L. In vivo toxicity, biodistribution, and clearance of glutathione-coated gold nanoparticles. Nanomedicine. 2013, 9 pp. 257–263

[258] Elgrabli D., Floriani M., Abella-Gallart S., Meunier L., Gamez C., Delalain P. Biodistribution and clearance of instilled carbon nanotubes in rat lung. Part. Fibre Toxicol. 2008, 5 p. 20

[259] Geraets L. OOmen AG, Krystek P, Jacobsen NR, Wallin H, laurentie M, Verharen HW, Brandon EFA, De Jong WH. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of diffenrent titanium dioxide nanoparticles in rats. Part. Fibre Toxicol. 2014, 11 p. 30

[260] Ryman-Rasmussen J.P., Cesta M.F., Brody A.R., Shipley-Phillips J.K., Everitt J.I., Tewksbury E.W. Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice. Nat. Nanotechnol. 2009, 4 pp. 747–751

[261] Panneerselvam S., & Choi S. Nanoinformatics: emerging databases and available tools. Int. J. Mol. Sci. 2014, 15 pp. 7158–7182

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

[263] Xia X.R., Monteiro-Riviere N.A., Riviere J.E. An index for characterization of nanomaterials in biological systems. Nat. Nanotechnol. 2010, 5 pp. 671–675

[264] Winkler D.A., Mombelli E., Pietroiusti A., Tran L., Worth A., Fadeel B. Applying quantitative structure-activity relationship approaches to nanotoxicology: current status and future potential. Toxicology. 2013, 313 pp. 15–23

[265] ICRP (International Committee on Radiological Protection). Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. ICRP Publication 66. Ann. ICRP. 1994, 24 (1-3). Available at: http://www.icrp.org/publication.asp?id=ICRP%20Publication%2066

[266] Hofmann W. Modelling particle deposition in human lungs: modelling concepts and comparison with experimental data. Biomarkers. 2009, 14 () pp. 59–62

[267] Li M., Al-Jamal K.T., Kostarelos K., Reineke J. Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles. ACS Nano. 2010, 4 pp. 6303–6317

[268] Carlander U., Li D., Jolliet O., Emond C., Johanson G. Toward a general physiologicallybased pharmacokinetic model for intravenously injected nanoparticles. Int. J. Nanomedicine. 2016, 11 pp. 625–640

[269] Nel A., Xia T., Meng H., Wang X., Lin S., Ji Z. Nanomaterial Toxicity Testing in the 21st Century: Use of a Predictive Toxicological Approach and High-Throughput Screening. Acc. Chem. Res. 2012, 46 pp. 607–621

[270] Zuin S., Micheletti C., Critto A., Pojana G., Johnston H., Stone V. Weight of evidence approach for the relative hazard ranking of nanomaterials. Nanotoxicology. 2011, 5 pp. 445– 458

[271] Hristozov D.R., Zabeo A., Foran C., Isigonis P., Critto A., Marcomini A. A weight of evidence approach for hazard screening of engineered nanomaterials. Nanotoxicology. 2012, 6 pp. 880–898

[272] Tseng M.T., Fu Q., Lor K., Fernandez-Botran G.R., Deng Z.B., Graham U. Persistent Hepatic Structural Alterations Following Nanoceria Vascular Infusion in the Rat. Toxicol. Pathol. 2014, 42 pp. 984–996