استاندارد ملی ایران

۱۲۹۶۳

چاپ اول

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران
Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI
12963
1st. Edition

فناوری نانو- تعیین ویژگی‌های همولیتیک نانوذرات- روش آزمون

Nanotechnologies- Analysis of hemolytic properties of nanoparticles

ICS:11.040.20-71.100.01

به‌نام خدا

آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه* صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی 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 وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی 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 می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذیصلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

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

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشو ر و / یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سا زمانها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، مؤسسهٔ استاندارد این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت می کند .ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این مؤسسه است.

---

* موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

1- International Organization for Standardization
2 - International Electro technical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)
4 - Contact Point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

"فناوری نانو- تعیین ویژگی‌های همولیتیک نانوذرات - روش آزمون"

رئیس:	**سمت و/ یا نمایندگی**
قاضی خوانساری، محمود (دکترای سم شناسی)	عضوهیئت علمی دانشگاه علوم پرشکی تهران وعضو کمیته فنی متناظر فناوری نانو (ISIRI/TC229)
دبیر:	
نوربخش، رویا (کارشناسی ارشد سم شناسی)	کارشناس گروه پژوهشی مواد غذایی سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
پوی پوی، حسن (کارشناس ارشد شیمی)	کارشناس ستاد ویژه توسعه فناوری نانو وعضو کمیته فنی متناظر فناوری نانو (ISIRI/TC229)
سیفی، مهوش (کارشناس ارشد مدیریت دولتی)	کارشناس استاندارد و نایب رئیس کمیته فنی متناظر فناوری نانو (ISIRI/TC229)
کوهی، محمد کاظم (دکترای سم شناسی)	عضو هیئت علمی دانشگاه تهران
مختاری، فهیم دخت (کارشناس ارشد شیمی)	مسئول آزمایشگاه بیولوژی مولکولی سازمان سازمان استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران
موسوی، ربابه (کارشناس ارشد شیمی	کارسناس اندیشگاه نانوفناوری وزارت بهداست و درمان و آموزش پزشکی

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد	ب
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	ج
پیش‌گفتار	ه
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاحات و تعاریف	۲
۴ اصول آزمون	۳
۵ وسائل	۴
۶ مواد و/یا واکنشگرها	۴
۷ تهیه و آماده سازی استانداردها و کنترل‌ها	۴
۸ تعیین **PFH** و **TBH** در نمونه های خون جمع آوری شده افراد بومی	۷
۹ روش اجرایی آزمون با مواد مورد آزمون	۸
۱۰ اندازه گیری میزان همولیز	۱۰
۱۱ محاسبات	۱۰
۱۲ معیارهای پذیرش	۱۱
۱۳ گزارش نتایج	۱۲

پیش‌گفتار

استاندارد" فناوری نانو- تعیین ویژگی‌های همولیتیک نانوذرات- روش آزمون" که پیش‌نویس آن درکمیسیون‌های مربوط توسط ستاد توسعه فناوری نانو مستقر در دفتر همکاری‌های فناوری ریاست جمهوری تهیه و تدوین شده و در دویست و سی و ششمین اجلاس کمیتهٔ ملی استاندارد مهندسی پزشکی مورخ ۱۳۸۹/۶/۲۷ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

منبع و ماخذی که برای تهیهٔ این استاندارد مورد استفاده قرارگرفته به شرح زیر است:

ASTM E 2524 : 2008, Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles

فناوری نانو- تعیین ویژگی‌های همولیتیک نانوذرات - روش آزمون

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد ارائه روش آزمون ارزیابی اثرات مواد حاوی نانوذرات[1] بر یکپارچگی گلبول‌های قرمز خون می‌باشد.

در این روش، از خون کامل رقیق شده و گرمخانه‌گذاری شده با ماده حاوی نانوذرات استفاده می‌شود و میزان هموگلوبین آزاد شده از گلبول‌های قرمز آسیب دیده خون، اندازه‌گیری می‌شود.

این روش، مشابه روش ارائه شده در استاندارد ASTM- F756 است با این تفاوت که حجم‌های به کار رفته برای تطبیق با ماده حاوی نانوذرات،کاهش می‌یابد.

این روش، بخشی از ویژگی‌های پیش بالینی برون تن[2] می‌باشد و برای ماده حاوی نانوذراتی که در پزشکی کاربرد دارد و با خون در تماس است، اهمیت دارد.

این استاندارد همه جنبه‌های ایمنی را در بر نمی‌گیرد. وظیفه کاربر این استاندارد است تا پیش از استفاده از این استاندارد روش‌های سلامت و ایمنی را مشخص نموده و قابلیت اجرا و محدوده مقررات را تعیین کند.

یاد آوری ۱- این روش یکی از مجموعه روش‌ها برای آزمون سازگاری زیستی مواد به کار رفته در پزشکی هنگام تماس با خون است که در استاندارد ASTM- F748 و استاندارد ملی ایران به شماره ۴-۷۲۱۶ فهرست شده‌اند.

یاد آوری۲ – این روش مشابه روش ارائه شده در استاندارد ASTM-F756 بوده که برای مواد حاوی نانوذرات بهینه شده است.

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن استاندارد به آنها ارجاع شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند. در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدید نظر و اصلاحیه‌های بعدی آن‌ها مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است.

1- Nanoparticulate
2- in vitro

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۴-۷۲۱۶، ارزیابی زیست شناختی وسایل پزشکی – بخش چهارم : گزینش آزمون جهت بررسی اثرات متقابل با خون (اثرات تداخل خونی)

2-2 ASTM-F 748-06:2010, Standard Practice for Selecting Generic Biological Test Method for Materials and Devices

2-3 ASTM-F 756-08:2010, Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials

2-4 ASTM-F 1877-05:2010, Standard Practice for Characterization of Particles

2-5 ASTM-F 1903-10:2010, Standard Practice for Testing for Biological Responses to Particles *in vitro*.

۳ اصطلاحات، تعاریف و اختصارات

در این استاندارد اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می‌رود:

۳-۱

درون تن[1]

مجموعه آزمایش‌هایی که در داخل بدن موجود زنده انجام می‌شود.

۳-۲

برون تن

مجموعه آزمایش‌هایی که در محیط آزمایشگاه و خارج از بدن انجام می‌شود.

۳- ۳ اختصارات

۳-۳-۱ استاندارد کالیبراسیون (Cal[2])

۳-۳-۲ سیان متهموگلوبین (CMH[3])

۳-۳-۳ فسفات بافر سالین دالبکو(DPBS [4])

1- in vivo
2- Calibration Standard
3- Cyanmethemoglobin
4- Dullbeco's Phospate – Buffered Sali ne

۳-۳-۴ پلی اتیلن گلیکول (PEG[1])

۳-۳-۵ پلاسما عاری ازهموگلوبین (PFH[2])

۳-۳-۶ کنترل کیفیت (QC[3])

۳-۳-۷ هموگلوبین کل خون (توتال) (TBH[4])

۳-۳-۸ نمونه های خون(هموگلوبین) رقیق شده تا ۱۰ میلی گرم ± ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (TBHd[5])

۴ اصول آزمون

۴-۱ کلیات

این روش آزمون پروتکلی را برای آزمون ضایعات حاد گلبول‌های قرمز خون (همولیز) در آزمایش‌های برون تن ناشی از قرار گرفتن در معرض نانوذرات ارائه می‌دهد.

این روش بر اساس اندازه‌گیری کمی هموگلوبین آزاد شده درون PFH به عنوان درصد غلظت TBH است هنگامی که خون در معرض مواد حاوی نانو ذره قرار می‌گیرد.

با استفاده ازیک روش‌آزمون رنگ سنجی مدون برای هموگلوبین و مشتقات آن مانند سولف هموگلوبین[6] در محیط قلیایی با فری سیانید به متهموگلوبین، اکسید می‌شود. غلظت پایداری از CMH با استفاده از اسپکترو فتومتر پلیت خوان[7] در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری می شود .

برای رسم منحنی استاندارد، استانداردهای هموگلوبین به کاررفته باید محدوده غلظتی ۰/۰۲۵ تا ۰/۸ میلی گرم برمیلی‌لیتر را پوشش دهند و نمونه های کنترل کیفی ارزیابی عملکرد روش در سه سطح غلظتی، پایین (۰/۰۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر)، متوسط ۰/۱۲۵ (میلی گرم بر میلی لیتر) و بالا ۰/۶۲۵ (میلی گرم بر میلی لیتر)، آماده شود. حجم نمونه مورد نیاز ۱۰۰ میکرو لیتر در هر تکرار آزمون می باشد.

نتایج بیان شده به عنوان درصد همولیز برای آزمون ویژگی‌های حاد همولیتیک نانوذرات در برون تن ارزیابی می‌شود.

1- Poly Ethylen Glycol
2- Plasma- Free Hemoglobin
3- Quality Control
4- Total Blood Hemoglobin
5- TBHd - Blood sample diluted to 10mg ±1 mg/ml
6- Sulfhemoglobin
7- Plate Reader

۵ وسایل

۵-۱ پیپت در محدوده حجمی ۰/۰۵ میلی‌لیتر تا ۱۰ میلی‌لیتر

۵-۲ پلیت‌های ۹۶ چاهکی[1]

۵-۳ حمام آب تنظیم شده در (۱± ۳۷) درجه سلسیوس

۵-۴ پلیت‌خوان با قابلیت اندازه‌گیری در طول موج ۵۴۰ نانو متر

۵-۵ تکان دهنده صفحه‌ای

۵-۶ بشرهای پلاستیکی

۵-۷ لوله‌های میکرو سانتریفوژ ۱/۵ میلی‌لیتری شفاف و غیررنگی

۵-۸ سانتریفوژ تنظیم شده در ۷۰۰gتا ۸۰۰g

۶ مواد و/ یا واکنشگرها

در تمام آزمون‌ها باید از مواد با درجه شیمیایی و خلوص بالا استفاده شود. سایر خلوص‌ها نیز ممکن است به کار رود، به شرط آن که ثابت شود که خلوص واکنشگر به قدر کافی بالا است که کاربرد آن موجب کاهش درستی اندازه‌گیری نمی‌شود.

۶- ۱ واکنشگر CMH

۶- ۲ هموگلوبین استاندارد

۶-۳ DPBS عاری از یون‌های Ca^{+2} و Mg^{+2}

۶-۴ مخلوطی از چند نمونه خون کامل چند انسان[2] که به آن ماده ضد انعقاد لیتیم- هپارین افزوده شده باشد.

۶-۵ پلی ال لیزین هپارین هیدرو برومید[3] با وزن مولکولی ۱۵۰۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰۰

۶-۶ PEG با وزن مولکولی متوسط ۸۰۰۰

۶-۷ آب مقطر

۷ تهیه وآماده سازی استانداردها و کنترل‌ها

1- 96 Well Plate
2- Pooled blood
3- Poly-L- lysine hydrobromide

یاد آوری - نیازی به انجام اقدامات احتیاطی و ایجاد شرایط استریل نیست، اما از آلوده شدن واکنشگرهای نگهداری شده جلو گیری کنید.

۷-۱ آماده سازی استانداردهای کالیبراسیون

حجم‌های مورد نیاز باید بر طبق جدول ۱ تنظیم شوند.

جدول ۱- استانداردهای کالیبراسیون

ردیف	سطح	غلظت اسمی میلی گرم بر میلی لیتر	روش تهیه
۱	کالیبراسیون ۱	۰/۸	۲ میلی‌لیتر از محلول مادر
۲	کالیبراسیون ۲	۰/۴	یک میلی‌لیتر از کالیبراسیون ۱ + یک میلی‌لیتر از واکنشگر CMH
۳	کالیبراسیون ۳	۰/۲	یک میلی‌لیتر از کالیبراسیون ۲+ یک میلی‌لیتر از واکنشگر CMH
۴	کالیبراسیون ۴	۰/۱	یک میلی‌لیتر از کالیبراسیون ۳+ یک میلی‌لیتر از واکنشگر CMH
۵	کالیبراسیون ۵	۰/۰۵	یک میلی‌لیتر از کالیبراسیون ۴+ یک میلی‌لیتر از واکنشگر CMH
۶	کالیبراسیون ۶	۰/۰۲۵	یک میلی‌لیتر از کالیبراسیون ۵+ یک میلی‌لیتر از واکنشگر CMH

۷-۲ آماده سازی استانداردهای کنترل کیفی

حجم‌های مورد نیاز باید بر طبق جدول ۲ تنظیم شوند.

جدول ۲- کنترل‌های کیفی

ردیف	سطح	غلظت اسمی میلی گرم بر میلی لیتر	روش تهیه
۱	کنترل‌کیفیت ۱	۰/۶۲۵	۱/۵ میلی‌لیتر از محلول مادر+ ۰/۴۲ میلی‌لیتر از واکنشگر CMH
۲	کنترل‌کیفیت ۲	۰/۱۲۵	۲۰۰میکرولیتر از کنترل کیفیت ۱ + ۸۰۰میکرولیتر از واکنشگر CMH
۳	کنترل‌کیفیت ۳	۰/۰۶۲۵	۱۰۰میکرولیتر از کنترل کیفیت ۱ + ۹۰۰میکرولیتر از واکنشگر CMH

۷-۳ آماده سازی کنترل مثبت

پودر پلی ال لیزین هپارین هیدروبرومید را در آب مقطر استریل شده حل کنید تا به غلظت ۱٪ (۱۰ میلی گرم برمیلی‌لیتر) برسد. بخش‌های مساوی را برای مصرف روزانه تهیه کنید و در دمای

C°(۳± ۲۰-) درجه سلسیوس برای مدت دو ماه نگهداری کنید. به عنوان جایگزین می‌توان از محلـول ٪۱۰ تریتون – ایکس صد[1] در آب به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده کرد.

۷-۴ آماده سازی کنترل منفی

واکنشگر PEG به صورت محلول مادر ٪۴۰ وجود دارد. این محلول را به عنوان محلول کنترل منفی به کار ببرید. محلول مادر را در دمای C°(۳± ۴) نگهداری کنید.

۷-۵ آماده سازی نمونه های حاوی مواد نانو ذره

۷-۵-۱ برای دوز اولیه از بالاترین غلظت نانوذرات که به خوبی در محلول فیزیولوژیک پراکنـده مـی‌شـود استفاده کنید. اگر غلظت پایانی مشخص است، می‌توان آن را به عنوان غلظت آغازی به کار برد. مواد بایـد تحـت شـرایط فیزیولوژیـک طبـق روش‌هـای اسـتانداردی کـه در مـورد ذرات در اسـتاندارد ASTM F1877 و ASTM F1903 ارائه شده به خوبی توصیف شوند. موادحاوی نانوذرات برای آزمـون بایـد در محلـول فیزیولـوژیکی کـه در۲± ۷/۲ = pH ایـزو تونیـک [2] قـرار گیرنـد. ویژگـی ایـن محلـول (میلی گرم بر میلی لیتر) باید تعریف شده و ویژگی ذرات(تعداد ذرات در میلی لیتر) باید به درستی در این محلول تعیین شده باشند.

تعیین ویژگی‌های قبلی باید به طور مناسب انجام گیرد تا امکان داده‌های تفسیری به حـد کـافی فـراهم شود.

مثال: تنوع در اندازه و ویژگی های سطحی ذرات از بهر[3] به بهر می تواند موجب تفاوت در نتایج آزمون شود.

چنانچه ذرات معلق استریل می‌شوند، روش استریل کردن بایـد مشـخص شـود. مـواد حـاوی نـانو ذره و بافرهای به‌کاررفته برای نگهداری / باز ترکیبی[4] باید با همان روش مورد آزمون قرار گیرد.

در این آزمون حداقل به ۳۰۰ میلی‌لیتر از ماده مورد آزمون و مقدار کـافی از آن بـرای تهیـه رقـت‌هـای مختلف نیاز است. سوسپانسیون آغازین باید در DPBS با نسبت رقت یک به پنج (۱:۵) در حد اقل سه نوبت رقیق شده تا چهار نمونه آزمایشی برای آزمون را تامین کند.

۷-۵-۲ چون نانوذرات در طول موج ۵۴۰ نانومتر جذبی ندارند، برای تشخیص ناخالصی‌ها پیشـنهاد می‌شود تا مواد حاوی نانوذرات در DPBS در طول موج ۵۴۰ نانومتر کنترل شوند. اگر جذبی مشاهده شد، توصیه می‌شود برای حذف تداخل ها، سانتریفوژ با سرعت بالا انجام شده و ذرات رسوب داده شـوند. در صـورتی کـه سـانتریفوژ کـردن تـاثیری نداشـته باشـد، نتـایج آزمـون بـه دسـت آمـده بـرای ذرات

1- - Triton -100X
2 - Isotonic
3- Lot to lot
4-Reconstitution

گرمخانه‌گذاری شده خون با تفریق نتایج بدست آمده برای همان ذرات درنمونه‌های کنترل بدون خون (طبق بند ۹-۴) تصحیح می‌شود.

۶-۷ آماده‌سازی نمونه‌های خون

نمونه‌های خون کامل را از حداقل سه دهنده در لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد لیتیم – هپارین جمع‌آوری کنید. خون را می‌توان در دمای$^{\circ}C$ ۲ تا $^{\circ}C$ ۸ به مدت ۴۸ ساعت نگهداری نمود. درروز انجام آزمون، نمونه خون (مخلوطی از خون جمع آوری شده چند انسان)[1] را با مخلوط کردن نسبت‌های برابر خون از هر دهنده آماده کنید. اگر ریز توده‌هایی[2] ازخون مشاهده شد، خون را از یک صافی ۴۰ میکرومتری مخصوص خون عبور دهید. بخش‌های ۲ تا ۳ میلی‌لیتری از نمونه خون جمع آوری شده را بردارید و به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۸۰۰ سانتریفوژ کنید.

محلول رویی (پلاسما) را جمع‌آوری کنید. در طول تهیه منحنی کالیبراسیون، نمونه‌های کنترل‌کیفی و هموگلوبین کل را در دمای اتاق نگهداری کنید.

پلاسمای جمع آوری شده را برای تعیین PFH به کار ببرید.

۸ تعیین PFH و TBH در نمونه های خون جمع‌آوری شده افراد بومی[3]

۸-۱ به هر چاهک در پلیت ۹۶ چاهکی،۲۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد کالیبراسیون، کنترل‌کیفی و واکنشگر CMH شاهد را بیفزایید. از دو چاهک برای هر کالیبره‌کننده و چهار چاهک برای هر QCو شاهد استفاده کنید. بنابر این نمونه آزمایشی با QC ها محصور می‌شود.

مثال: ترتیبی مانند: شاهد، Cal6,Cal1 ,QC3,QC2,QC1, نمونه آزمایشی، شاهد، QC3,QC2,QC1 رعایت شود.

۸-۲ نمونه‌های TBH را با ترکیب کردن ۲۰ میکرولیتر از نمونه خون جمع آوری شده و ۵ میکرو لیتر ازواکنشگر CMH تهیه کنید. پس از ۱۵ دقیقه ۲۰۰ میکرولیتر به هر ۶ چاهک بیفزایید.

۸-۳ به ۶ چاهک ۱۰۰ میکرولیتر پلاسما (طبق بند۷-۶-۳) اضافه کنید و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از واکنشگر CMH را به هر چاهک بیفزایید. واکنشگرCMH را به چاهک های حاوی استانداردهای کالیبراسیون و کنترل کیفی اضافه نکنید.

1- Pooled blood
2- Micro Aggregate
3- Native

۸-۴ درپوش پلیت را گذاشته و آن را روی یک تکان‌دهنده پلیت به آرامی(با سرعت متوسط ۲-۳) تکان دهید.

۸-۵ جذب را در ۵۴۰ نانومتر برای تعیین غلظت هموگلوبین بخوانید. استفاده ازفاکتور رقت ۲ برای نمونه های PFH و ۲۵۱ را برای نمونه های TBH در نظر بگیرید. اگر غلظت محاسبه شده PFH زیر یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، مرحله بعدی را انجام دهید. اگر غلظت بالای یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود نمونه های خون برای این روش مناسب نیستند.

۹ روش اجرای آزمون با مواد موردآزمون

۹-۱ نمونه خون جمع‌آوری شده را با DPBS عاری از یون کلسیم و منیزیم برای تثبیت غلظت TBH در (۱۰±۱) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر براساس نتایج به دست آمده از بند ۸-۵ رقیق کنید.

۹-۲ درلوله‌های میکروسانتریفوژ، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه، محلول شاهد (PBS یا هر بافری که برای انحلال نانوذرات به کار رفته است.)، محلول کنترل مثبت ومحلول کنترل منفی را بریزید. شش لوله برای نمونه مجهول، سه لوله برای شاهد، دو لوله برای محلول کنترل مثبت و دو لوله برای محلول کنترل منفی آماده کنید.

۹-۳ به هر لوله، ۷۰۰ میکرولیتراز DPBS عاری از یون کلسیم و منیزیم بیفزایید.

۹-۴ در همه لوله‌ها به جز سه لوله نمونه، ۱۰۰ میکرولیتر از خون کامل آماده شده را طبق بند ۹-۱ بریزید. در این سه لوله ، ۱۰۰ میکرولیتر از DPBS عاری از یون کلسیم و منیزیم بریزید. این نمونه ها نمایندهٔ نمونه کنترل بدون خون بوده و برای ارزیابی تداخل‌های نانو مواد با آزمون (به طور مثال جذب در نزدیکی و یا خود طول موج ۵۴۰ نانو متر، بر هم کنش با واکنشگر CMH و مانند آن) به کار می‌رود.

۹-۵ در لوله‌ها را ببندید و به آرامی تکان دهید تا مخلوط شوند. در یک بازه زمانی ۳۰ دقیقه‌ای مشاهده کنید که آیا در طول آزمایش نانوذرات لخته، پراکنده، غوطه‌ور یا شناور می‌شوند.

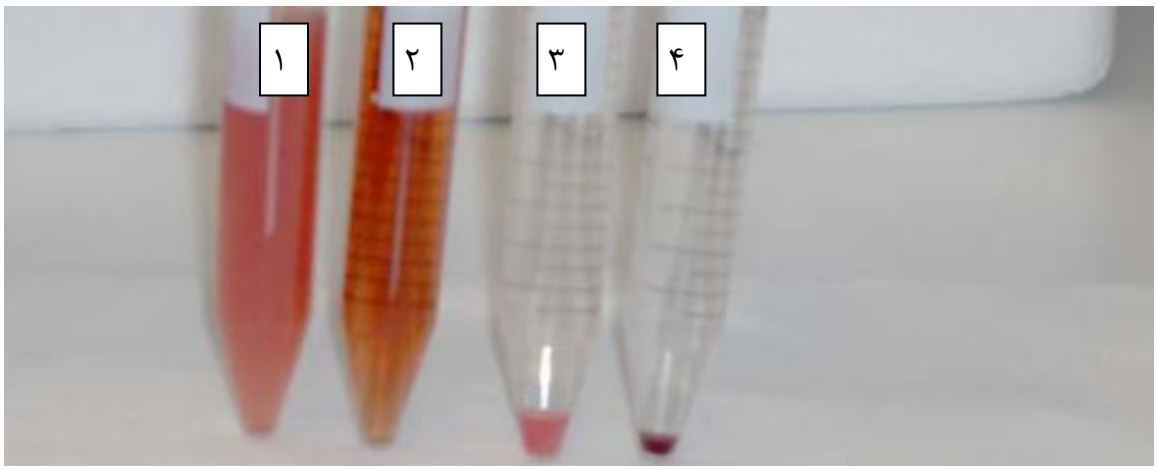
یاد آوری – از تکان دادن به دلیل امکان تخریب گلبول‌های قرمز خون خودداری کنید.

۹-۶ لوله‌ها را در حمام آب تنظیم شده در دمای $37\pm1^{\circ}C$ و به مدت (۱۵±۱۸۰) دقیقه قرار داده و در دمای $37\pm1^{\circ}C$ گرمخانه‌گذاری کنید و هر ۳۰ دقیقه یکبار نمونه را با چرخاندن مخلوط کنید. لوله‌ها را می توانید در یک چرخاننده لوله در یک گرمخانه که در دمای $37\pm1^{\circ}C$ تنظیم شده گرمخانه گذاری کنید.

۹-۷ نمونه‌ها را از حمام آب یاگرمخانه بیرون بیاورید. اگر از حمام آب استفاده می‌کنید، لوله ها را با کاغذ جاذب خشک کنید.

۹-۸ لوله ها را به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۸۰۰ سانتریفوژکنید.

۹-۹ پس از پایان سانتریفوژ کردن، لوله‌ها را بررسی کنید و هر گونه ظاهر غیرطبیعی در مایع رویی یا توده‌هایی را که نشان‌دهنده تخریب اضافی گلبول‌های قرمز یا هموگلوبین باشد ثبت کنید. (مطابق شکل ۱)



شکل ۱- شمایی از اهمیت ثبت شکل ظاهری نمونه ها پس از سانتریفوژ برای جلوگیری از نتایج منفی کاذب

۹-۱۰ در شکل ۱، ذرات موجود تجاری پلی استیرن با اندازه ۲۰ نانومتر (لوله شماره ۱)و ۵۰ نانومتر(لوله شماره ۲) فعالیت همولیتیک را نشان داده که می‌تواند به وسیله رنگ مایع رویی مشاهده شود. ذرات پلی استیرن با اندازه ۸۰ نانومتر نیز همولیتیک هستند، در حالی که هموگلوبین را جذب می‌کنند و این با رنگ و اندازه توده معین می‌شود (لوله شماره ۳). اگر که مایع رویی برای این آزمون به کار رود، جذب در طول موج ۵۴۰ نانو متر نتیجه منفی نشان خواهد داد. نمونه شماره ۴ کنترل منفی است. هیچ فعالیت همولیتیکی در محلول رویی مشاهده نمی‌شود و گلبول‌های سالم قرمز خون به صورت یک توده فشرده قرمز تیره در ته لوله دیده می‌شود.

۹-۱۱ چنانچه نانوذرات در محدوده و یا خود طول موج ۵۴۰ نانومتر جذبی داشته باشند، این ذرات را پیش از انجام مرحله بعدی از مایع رویی حذف کنید (طبق بند ۷-۵). این مایع رویی باید به لوله‌های تمیز منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه در ۴۰۰۰۰ دور بر دقیقه ویا سرعت تعیین شده طبق بند ۷-۵ سانتریفوژ شود.

۱۰ اندازه گیری میزان همولیز

۱-۱۰ سری تازه‌ای از محلول‌های کالیبره‌کننده و کنترل‌کیفی را مطابق بندهای ۷- ۱ و ۷-۲ آماده کنید.

۲-۱۰ به هر پلیت ۹۶ چاهکی تازه ، مقدار ۲۰۰/۰ میکرولیتر از CMH شاهد ، کالیبره‌کننده‌ها، کنترل‌های کیفی یا TBHd رقیق شده (TBHd رقیق شده به صورت ترکیبی از ۴۰۰/۰ میکرولیتر خون با ۵/۰ میلی‌لیتر واکنشگر CMH که مطابق بند ۹-۱ تهیه می شود) اضافه کنید. دو چاهک را با هرکالیبره کننده، چهار چاهک را با هرشاهد و هر کنترل کیفی و شش چاهک را با هر نمونه TBHd پر کنید. همه نمونه های آزمایشی را بین کنترل های کیفی در پلیت محصور کنید.

۳-۱۰ به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر ازنمونه آزمایشی، محلول کنترل مثبت و محلول کنترل منفی آماده شده طبق بند ۹-۲، اضافه کنید. شش چاهک را با نمونه‌های آزمایشی (دو چاهک برای هرسه لوله آزمایش آماده شده طبق بند ۹-۲) و ۴ چاهک را با هریک از محلول ای کنترل (دو چاهک برای هر دو لوله آزمایش)پر کنید.

۴-۱۰ به هریک از چاهک‌های حاوی نمونه و محلول کنترلی، ۱۰۰ میکرولیتر واکنشگر CMH اضافه کنید. واکنشگر CMH را به چاهک‌های حاوی استانداردهای کالیبراسیون، محلول‌های کنترل کیفی و TBHd که خود حاوی CMH می‌باشند اضافه نکنید.

۵-۱۰ پلیت را با درپوش، پوشانده و به آرامی با یک تکان‌دهنده پلیت(با سرعت متوسط ۲ تا ۳) تکان دهید.

۶-۱۰ جذب را در ۵۴۰ نانومتر برای تعیین غلظت هموگلوبین قرائت کنید. فاکتور رقیق سازی ۱۸ را برای نمونه و کنترل‌ها و فاکتور رقیق سازی ۱۳/۵ را برای TBHd در نظر بگیرید.

۱۱ محاسبات

۱-۱۱ یک الگوریتم رگرسیون چهار پارامتری برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار ببرید. پارامترهای زیر را در هر استاندارد کالیبره‌کننده و محلول‌های کنترل محاسبه کنید.

۲-۱۱ درصد اختلاف از مقدار نظری

$$PDFT = \frac{\text{غلظت نظری} - \text{غلظت محاسبه شده}}{\text{غلظت نظری}} \times ۱۰۰٪ \qquad (۱)$$

که در آن :

PDFT، درصد اختلاف از مقدار نظری است.

۱۱-۳ درصد CV باید برای هر نمونه شاهد، کنترل مثبت،کنترل منفی و نمونه مجهول محاسبه شود.

$$\%CV=\frac{SD}{\text{میانه}}\times 100\% \qquad (۲)$$

که در آن:

CV، ضریب تغییرات

SD، انحراف معیار

۱۱-۴ درصد همولیز از فرمول زیر محاسبه می شود :

$$\%\text{همولیز}=\frac{PFH_{\text{نمونه}}}{TBHd}\times 100\% \qquad (۳)$$

۱۲ معیارهای پذیرش

۱۲-۱ درصد CV و PDFT برای هر استاندارد کالیبراسیون و کنترل‌کیفی بایدتا ۲۰٪ باشد. تنها مورداستثنا Call6 است که تا ۳۰٪ قابل پذیرش است. پلیتی قابل قبول است که $\frac{۲}{}$ میزان همه کنترل کیفی ها وحداقل یکی از هر سطح عملکرد قابل قبولی داشته باشد. در غیر این[۳]صورت کل آزمون باید تکرار شود.

۱۲-۲ درصد CV برای هر کنترل مثبت و منفی و نمونه مجهول باید تا ۲۰٪ باشد.

۱۲-۳ اگر هر دوتکرار کنترل مثبت یا کنترل منفی با معیار شرح داده‌شده در بند ۱۲-۱مردود شود، کل آزمون باید تکرار شود.

۱۲-۴ در پذیرش هر دور آزمون، اگر دو از سه تکرار از نمونه مجهول با معیار شرح داده‌شده در بند ۱۲-۱مردود شود، نمونه مجهول باید مجددا آزمون شود.

۱۳ گزارش نتایج

درصد همولیز ایجاد شده در نمونه را تعیین کنید. درصد همولیزی که بیشتر از ۵٪ باشد نشان‌دهنده آن است که مواد موجب تخریب گلبول‌های قرمز خون می‌شوند. چنانچه منحنی دوز – پاسخ [1]وجود دارد، آن را تعیین کنید.

1-Dose-response curve