МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

**ГОСТ ISO/TR 10993-22— 2020**

## Изделия медицинские

# ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

## Часть 22

## Руководство по наноматериалам

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

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2020

gost.e-ecolog.ru

## Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

**Сведения о стандарте**

1 ПОДГОТОВЛЕН Автономной некоммерческой организацией «Институт медико-биологических исследований и технологий (АНО «ИМБИИТ») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 31 августа 2020 г. № 132-П)

За принятие проголосовали:

| Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97 | Код страны по МК (ИСО 3166) 004 – 97 | Сокращенное наименование национального органа по стандартизации |
|---|---|---|
| Армения | AM | ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения |
| Беларусь | BY | Госстандарт Республики Беларусь |
| Киргизия | KG | Кыргызстандарт |
| Россия | RU | Росстандарт |
| Таджикистан | TJ | Таджикстандарт |
| Узбекистан | UZ | Узстандарт |

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 октября 2020 г. № 869-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO/TR 10993-22—2020 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 марта 2021 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу ISO/TR 10993-22:2017 «Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 22. Руководство по наноматериалам» («Biological evaluation of medical devices — Part 22: Guidance on nanomaterials», IDT).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5 (подраздел 3.6).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов и документов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.*

*В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»*

© ISO, 2017 — Все права сохраняются
© Стандартинформ, оформление, 2020

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

## Содержание

1 Область применения . . . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . . . 2
3 Термины и определения . . . . . 2
4 Общие требования . . . . . 4
4.1 Общие положения . . . . . 4
4.2 Биологическая оценка наноматериалов . . . . . 5
4.3 Категории наноматериалов . . . . . 5
4.4 Эквивалентность наноматериалов . . . . . 7
5 Свойства и характеристики наноматериалов . . . . . 7
5.1 Общие положения . . . . . 7
5.2 Определение характеристических свойств наноматериалов, методы их измерений . . . . . 9
5.3 Выбор контрольных образцов . . . . . 12
6 Подготовка образцов . . . . . 12
6.1 Общие требования . . . . . 12
6.2 Требования к подготовке образцов наноструктурированных материалов . . . . . 13
6.3 Требования к подготовке образцов нанообъектов . . . . . 13
6.4 Идентификация, хранение и стабильность исходных наноматериалов . . . . . 14
6.5 Описание химического состава исходных и разбавленных (дозовых) дисперсий . . . . . 15
6.6 Характеристика исходных растворов дисперсий . . . . . 16
6.7 Характеристика доз, приготовленных из исходных растворов дисперсий . . . . . 16
6.8 Единицы дозы . . . . . 16
6.9 Дополнительные положения . . . . . 17
7 Высвобождение нанообъектов из медицинских изделий . . . . . 19
7.1 Общие положения . . . . . 19
7.2 Продукты деструкции (деградации . . . . . 19
7.3 Высвобождение нанообъектов в процессе износа . . . . . 19
7.4 Обработка *in situ* . . . . . 20
8 Токсикокинетика . . . . . 20
8.1 Общие положения . . . . . 20
8.2 Факторы, влияющие на токсикокинетику . . . . . 20
9 Токсикологическая оценка . . . . . 23
9.1 Общие положения . . . . . 23
9.2 Исследование цитотоксичности *in vitro* . . . . . 24
9.3 Генотоксичность, канцерогенность и репродуктивная токсичность . . . . . 26
9.4 Иммунотоксичность, раздражение и сенсибилизация . . . . . 30
9.5 Гемосовместимость . . . . . 32
9.6 Общая токсичность . . . . . 34
9.7 Пирогенность . . . . . 34
9.8 Имплантация . . . . . 35
10 Протокол исследования . . . . . 35
11 Оценка риска . . . . . 36
11.1 Общие положения . . . . . 36
11.2 Оценка степени воздействия . . . . . 37

11.3 Определение биологической опасности . . . . . 39
11.4 Расчет степени риска . . . . . 39
11.5 Анализ риска . . . . . 39
12 Отчет о биологической оценке . . . . . 40
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов и документов межгосударственным стандартам . . . . . 41
Библиография . . . . . 42

## Введение

Настоящий стандарт является руководством для проведения биологической оценки медицинского изделия, содержащего, высвобождающего или состоящего из наноматериалов. Морфологические структуры, созданные на поверхности медицинского изделия, могут иметь размеры в нанодиапазоне. Следовательно, необходимо учитывать возможный эффект таких структур на биологический ответ на изделие.

Нанообъекты размерами от 1 до 100 нм могут высвобождаться в течение всего жизненного цикла медицинского изделия, поэтому необходима оценка возможных неблагоприятных эффектов, связанных с высвобождением нанообъектов при изготовлении, эксплуатации, износе или деградации изделия. Это относится к медицинским изделиям, изготовленным с применением наноматериалов и без использования наноматериалов, но имеющими потенциальную способность к высвобождению наночастиц в процессе износа и/или деструкции. Для биологической оценки медицинских изделий необходима информация об их потенциальных свойствах к генерации и/или высвобождению нанообъектов из таких материалов.

Требования к проведению биологической оценки медицинских изделий, установленные в серии стандартов ISO 10993, применимы для биологической оценки медицинских изделий, содержащих нанообъекты, не высвобождаемых из изделия, так как они являются его интегрированной частью. Тем не менее, если возможно высвобождение нанообъектов, то необходимо также провести анализ безопасности высвобождаемых нанообъектов. В дополнение к оценке медицинских изделий, компоненты или составляющие наноматериала также могут быть оценены отдельно.

В настоящем стандарте представлен общий подход к биологической оценке наноматериалов с применением различных стандартов серии ISO 10993. Различные методы, установленные в стандартах серии ISO 10993 не всегда применимы как таковые при исследовании наноматериалов. Сами наноматериалы могут быть в форме порошков или коллоидных дисперсий, но также находиться в медицинском изделии в составе матрикса в качестве наноструктурированного материала или как поверхностные структуры на материалах и/или медицинских изделий. В целом, должны быть оценены сами наноматериалы, а не экстракты, что, как правило, применяется при исследовании биоматериалов или медицинских изделий. Наноматериалы требуют особый подход при применении системы тестов, как правило, используемой для оценки медицинских изделий, и при интерпретации результатов испытаний.

Сферы нанотехнологии, развития наноматериалов и оценки потенциальной токсичности таких материалов являются формирующимися областями, настоящий стандарт представляет изложение совокупности знаний только на момент его создания. Хотя подходящие инструменты и методы оценки наноматериалов до сих пор находятся в процессе разработки, необходимо предоставить данные по характеристикам и биологическим эффектам наноматериалов для учета вопросов безопасности в их применении в медицинских изделиях, принимая во внимание анализ рисков и преимуществ.

Настоящий стандарт является частью серии стандартов ISO 10993 и содержит руководство по проведению оценки биологического действия медицинских изделий, которые содержат, генерируют или состоят из наноматериалов.

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й  С Т А Н Д А Р Т

**Изделия медицинские**

# ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

**Часть 22**

**Руководство по наноматериалам**

Medical devices. Biological evaluation of medical devices. Part 22. Guidance on nanomaterials

**Дата введения — 2021—03—01**

## 1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на медицинские изделия (далее — МИ), содержащие или состоящие из наноматериалов, и устанавливает требования к проведению оценки их биологического действия (далее — биологическая оценка). Настоящий стандарт может быть применен для оценки биологического действия нанообъектов, высвобождение которых произошло в результате деградации, износа или процессов механической обработки МИ (например, истирание, полировка МИ *in situ*) или их компонентов, изготовленных без использования наноматериалов.

Настоящий стандарт содержит информацию:

- о свойствах и характеристиках наноматериалов;
- подготовке образцов для исследования наноматериалов;
- высвобождении нанообъектов из МИ;
- токсикокинетике нанообъектов;
- биологической оценке наноматериалов;
- представлении результатов;
- оценке риска наноматериалов в контексте оценки МИ;
- составлении отчета о биологической оценке;
- наноструктурах на поверхности МИ, целенаправленно полученных в процессе создания, производства или обработки МИ.

Настоящий стандарт не распространяется на наноматериалы:

- природного и биологического происхождения, которые не были созданы, изготовлены или обработаны для применения в МИ;
- являющиеся неотъемлемыми наноструктурами в макроматериале;
- являющиеся наноструктурами на поверхности МИ, высвобождение которых произошло в результате изготовления или обработки МИ.

Примечание — Примерами случайных наноструктур на поверхности МИ могут служить следы штамповки и обработки.

Настоящий стандарт устанавливает общие принципы и выделяет важные аспекты, которые необходимо учитывать при анализе безопасности МИ, состоящих, содержащих и/или высвобождающих нанообъекты.

В настоящем стандарте приведены сведения о распространенных ошибках и трудностях, возникающих при исследовании наноматериалов по сравнению с макроматериалами или низкомолекулярными химическими соединениями. Настоящий стандарт не устанавливает требования к протоколу исследования наноматериалов.

**Издание официальное**

Настоящий стандарт может служить основой для разработки стандартов на методы испытаний МИ конкретных видов.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения).

ISO 10993 (all parts), Biological evaluation of medical devices (Оценка биологического действия медицинских изделий)

ISO/TR 13014, Nanotechnologies — Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment (Нанотехнологии. Руководство по физико-химическому описанию наноматериалов для токсикологической оценки)

ISO 14971, Medical devices — Application of risk management to medical devices (Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям)

## 3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ISO 10993 (все части), ISO/TR 13014 и ISO 14971, а также следующие термины с соответствующими определениями.

ИСО и МЭК ведут терминологические базы данных для использования в стандартизации по следующим адресам:

- Электропедия МЭК: доступна по адресу gost.e-ecolog.ru ;
- платформа онлайн-просмотра ИСО: доступна по адресу gost.e-ecolog.ru .

3.1 **агрегат** (aggregate): Совокупность сильно связанных между собой или сплавленных частиц, общая площадь внешней поверхности которой значительно меньше суммы площадей поверхностей ее отдельных компонентов.

Примечания

1 Силы, удерживающие частицы в составе агрегата, являются прочными и обусловлены, например, ковалентными или ионными связями, или образованы в результате спекания или сложного физического переплетения частиц друг с другом, или другим способом объединения первичных частиц.

2 Агрегаты также называют «вторичные частицы», а составляющие их исходные частицы называют «первичные частицы».

[ISO/TS 80004-2:2015, статья 3.5, в терминологической статье изменены определение и примечание 1]

3.2 **агломерат** (agglomerate): Совокупность слабо или средне связанных между собой частиц, площадь внешней поверхности которой равна сумме площадей внешних поверхностей ее отдельных компонентов.

Примечания

1 Силы, скрепляющие агломерат в одно целое, являются слабыми и обусловленными, например, силами взаимодействия Ван-дер-Ваальса или простым физическим переплетением частиц друг с другом.

2 Агломераты также называют «вторичные частицы», а составляющие их исходные частицы называют «первичные частицы».

[ISO/TS 80004-2:2015, статья 3.4]

3.3 **технический наноматериал** (engineered nanomaterial): Наноматериал (3.7), изготовленный для конкретного применения или реализации заданной функции.

[ISO/TS 80004-1:2015, статья 2.8]

3.4 **побочный наноматериал** (incidental nanomaterial): Наноматериал (3.7), непреднамеренно образующийся в ходе процесса.

Примечания

1 К понятию «процесс» относят технологические, биотехнологические и иные процессы.

2 См. определение термина «ультрамелкая частица» в ISO/TS 27628:2007, статья 2.21.

[ISO/TS 80004-1:2015, статья 2.10]

3.5 **промышленный наноматериал** (manufactured nanomaterial): Наноматериал (3.7), преднамеренно изготовленный с заданными свойствами и/или составом.

[ISO/TS 80004-1:2015, статья 2.9]

3.6 **нановолокно** (nanofibre): Нанообъект (3.8), линейные размеры которого по двум измерениям находятся в нанодиапазоне (3.12), а по третьему измерению значительно больше.

Примечания

1 Нановолокно может быть гибким или жестким.

2 Два сходных линейных размера по двум измерениям не должны отличаться друг от друга более чем в три раза, а размеры по третьему измерению должны превосходить размеры по первым двум измерениям более чем в три раза.

3 Наибольший линейный размер может находиться вне нанодиапазона.

[ISO/TS 80004-6:2013, статья 2.6]

3.7 **наноматериал** (nanomaterial): Твердый или жидкий материал, полностью или частично состоящий из структурных элементов, размеры которых хотя бы по одному измерению находятся в нанодиапазоне (3.12).

Примечания

1 Наноматериал является общим термином для таких понятий как «совокупность нанообъектов» (3.8) и «наноструктурированный материал» (3.17).

2 См. также термины «технический наноматериал» (3.3) и «побочный наноматериал» (3.4).

3 Рекомендуется проверить применение конкретных терминов и определений на национальном или региональном уровне. Следует учитывать, что другие диапазоны размеров или характеристики могут быть включены в такие определения.

[ISO/TS 80004-1:2015, статья 2.4, в терминологической статье изменено примечание 2, дополнительно включено примечание 3]

3.8 **нанообъект** (nano-object): Дискретная часть материала, линейные размеры которой по одному, двум или трем измерениям находятся в нанодиапазоне (3.12).

Примечание — Внешние линейные размеры нанообъекта определяют по трем измерениям.

[ISO/TS 80004-1:2015, статья 2.5]

3.9 **наночастица** (nanoparticle): Нанообъект (3.8), линейные размеры которого по всем трем измерениям находятся в нанодиапазоне (3.12), а размеры длин в направлении самой короткой и самой длинной из осей не имеют существенных отличий.

Примечание — Если по одному или двум измерениям размеры нанообъекта значительно больше, чем по третьему измерению (как правило, более чем в три раза), то вместо термина «наночастица» допускается использовать термины «нановолокно» или «нанопластина».

[ISO/TS 80004-2:2015, статья 4.4]

3.10 **нанопластина** (nanoplate): Нанообъект (3.8), линейные размеры которого по одному измерению находятся в нанодиапазоне (3.12), а размеры по двум другим измерениям значительно больше.

Примечания

1 Наименьший линейный размер — толщина нанопластины.

2 Размеры по двум другим измерениям значительно больше и отличаются от толщины более чем в три раза.

3 Наибольшие линейные размеры могут находиться вне нанодиапазона.

[ISO/TS 80004-6:2013, статья 2.4]

3.11 **наностержень** (nanorod): Жесткое сплошное нановолокно (3.6).

[ISO/TS 80004-2:2015, статья 4.7]

3.12 **нанодиапазон** (nanoscale): Диапазон линейных размеров приблизительно от 1 до 100 нм.

Примечания

1 Уникальные свойства нанообъектов проявляются преимущественно в пределах данного диапазона.

2 Свойства, влияющие на биосовместимость, также могут проявляться у более крупных объектов, например размерами от 100 нм до 1 мкм.

[ISO/TS 80004-1:2015, статья 2.1, в терминологическую статью дополнительно включено примечание 2]

3.13 **наноразмерный эффект** (nanoscale phenomenon): Эффект, возникающий вследствие наличия нанообъектов (3.8) или участков размерами в нанодиапазоне (3.12).

[ISO/TS 80004-1:2015, статья 2.13]

3.14 **наноразмерное свойство** (nanoscale property): Характеристика нанообъекта (3.8) или участка размерами в нанодиапазоне (3.12).

[ISO/TS 80004-1:2015, статья 2.14]

3.15 **научные основы нанотехнологий** (nanoscience): Система знаний о материи, в которой размерные и структурные свойства и явления проявляются в нанодиапазоне (3.12) и отличаются от тех, которые присущи отдельным атомам, молекулам или объектам размерами, превышающими нанодиапазон.

[ISO/TS 80004-1:2015, статья 2.2]

3.16 **наноструктура** (nanostructure): Композиция из взаимосвязанных составных частей различных веществ, одна или несколько из которых имеют линейные размеры в нанодиапазоне (3.12).

Примечание — Граница между составными частями определяется границей прекращения свойств.

[ISO/TS 80004-1:2015, статья 2.6]

3.17 **наноструктурированный материал** (nanostructured material): Материал, имеющий внутреннюю или поверхностную наноструктуру (3.16).

Примечание — Настоящее определение не исключает наличия у нанообъекта (3.8) внутренней или поверхностной структуры. Рекомендуется применять термин «нанообъект» к элементу наноструктурированного материала, если его линейные размеры по одному, двум или трем измерениям находятся в нанодиапазоне (3.12).

[ISO/TS 80004-1:2015, статья 2.7]

3.18 **нанотехнология** (nanotechnology): Применение научных знаний для изучения, проектирования, производства и управления строением материальных объектов преимущественно в нанодиапазоне (3.12) с использованием зависящих от размера и структуры свойств этих объектов или присущих им явлений, которые могут отсутствовать у отдельных атомов и молекул или аналогичных макрообъектов.

Примечание — Производство и управление строением включают в себя синтез материалов.

[ISO/TS 80004-1:2015, статья 2.3]

3.19 **нанотрубка** (nanotube): Полое нановолокно (3.6).

[ISO/TS 80004-2:2015, статья 4.8]

3.20 **представительный образец**; RTM (representative test material RTM): Материал, достаточно однородный и стабильный в отношении одного или нескольких установленных свойств, и потенциально подходящий для своего назначения в разработке методов испытаний (измерений) других показателей, для которых уже продемонстрирована однородность и стабильность.

[ISO/TS 16195:2013, статья 3.1, из терминологической статьи исключены примечания 1 и 2]

## 4 Общие требования

### 4.1 Общие положения

Наноматериалы изготавливают с целью применения их уникальных свойств, обусловленных уменьшением размера и увеличением площади поверхности. Микроматериалы (диапазон размеров от 100 нм до 1 мкм) могут обладать свойствами, отличными от свойств макроматериалов (размеры более 1 мкм). Допускается проводить оценку биологического действия микроматериалов по аналогии с наноматериалами (диапазон размеров от 1 до 100 нм).

Биологическая оценка любого материала или МИ, предназначенного для применения на человеке, должна составлять часть программы биологической оценки в рамках процесса управления рисками в соответствии с ISO 14971 и ISO 10993-1. Процесс управления рисками применим к МИ, которые содержат или состоят из наноматериалов. Процесс управления рисками также применим к МИ, которые высвобождают нанообъекты в результате деградации, износа или процессов механической обработки МИ (например, измельчении, полировки МИ *in situ*). При высвобождении нанообъектов существуют конкретные трудности при анализе безопасности МИ. Анализ безопасности и оценка риска наноматериалов требуют особой концентрации, так как различные наноматериалы, состоящие из одного химического вещества, могут иметь различный профиль токсикологического риска, в зависимости от характеристик, включая размеры, химический состав поверхности, физико-химические свойства и конкретное приме-

нение по назначению. Для МИ, состоящих из наноматериалов или их содержащих, программа оценки безопасности должна включать в себя задачи, связанные с анализом безопасности наноматериалов. В стандартах серии ISO 10993, ISO/TR 13014, ISO 14971 и [5], [14]—[16], [21], [23], [24], [28], [46], [47] и [49] приведены сведения о проведении биологической оценки МИ и различных свойствах наноматериалов.

Наноматериалы имеют размеры, аналогичные размерам структур на субклеточных уровнях, включая ДНК, и, следовательно, могут контактировать и взаимодействовать с такими структурами. Также МИ, имеющие в своем составе материалы с внутренними структурами в нанодиапазоне или структурой поверхности в нанодиапазоне, обусловленной функционализацией поверхности или наличием других топографических элементов в нанодиапазоне, обеспечивающих функциональность изделия, могут иметь конкретные и уникальные свойства, которые необходимо учитывать при биологической оценке. Например, топография поверхности в нанодиапазоне может влиять на распределение клеток, морфологию клеток, систему клеточных сигналов, экспрессию гена и внеклеточный матрикс [52]—[54].

Высвобождение или генерация нанообъектов при эксплуатации МИ и использование непосредственно самих наноматериалов представляют наивысшую степень риска с точки зрения потенциального внутреннего воздействия на организм человека.

### 4.2 Биологическая оценка наноматериалов

В ISO 10993-1:2009 (приложение А) приведены рекомендации по разработке программ биологической оценки МИ в зависимости от типа и длительности контакта с организмом. ISO 10993-1 также применим к МИ, которые содержат, высвобождают или состоят из наноматериалов. Биологическую оценку наноматериалов следует проводить на основании сведений о качественных характеристиках конкретного МИ и с учетом требований стандартов серии ISO 10993.

В ISO 10993-1 приведено руководство по управлению рисками, связанными с МИ, включая определение опасности, оценку воздействия и расчет степени риска. Данное руководство можно использовать в качестве основы для биологической оценки наноматериалов с учетом свойств и характеристик, отличающих их от обычных материалов. Биологическую оценку наноматериалов, включая определение стратегии, содержание программы и критерий приемлемости риска в соответствии с ISO 10993-1, должны выполнять специалисты, прошедшие профессиональную подготовку. Первым этапом биологической оценки наноматериалов является сбор существующей информации о данном конкретном наноматериале согласно общему подходу по ISO 10993-1. С целью подготовки объективного заключения по результатам анализа собранной информации о наноматериале и его возможности применения по назначению данные о клинических и неклинических (доклинических) исследованиях должны быть приведены в протоколе в соответствии с ISO 10993-1:2009 (приложение С). Дополнительная информация о наноматериалах представлена в [55]. Если по результатам биологической оценки в соответствии с ISO 14971 и ISO 10993-1 установлено, что риски при применении наноматериала являются приемлемыми, то дальнейшие исследования не проводят. С целью использования существующих данных для биологической оценки необходимо установить эквивалентность наноматериалов материалам, применяемым в МИ (см. 4.4).

### 4.3 Категории наноматериалов

Оценку воздействия и определение опасностей выполняют с учетом характеристик готового МИ и его применения по назначению. Оценку опасности выполняют с учетом физико-химических и токсикологических свойств наноматериала, включая добавки и вспомогательные технологические вещества. При оценке воздействия учитывают концентрацию наноматериала, используемого в МИ, конкретное применение и путь воздействия, скорость и путь выделения, рассчитанное время воздействия на пациента. Форма нахождения наноматериала в готовом МИ может значительно изменить характеристики воздействия [56]. В таблице 1 представлены общие рекомендации по проведению биологической оценки для различных категорий наноматериалов и МИ. Если МИ относится к нескольким категориям наноматериалов, то его биологическую оценку проводят для каждой категории. Оценку МИ, не подпадающего под приведенные ниже категории, проводят в соответствии с общими требованиями по ISO 10993-1 и учетом дополнительных требований, установленных в настоящем стандарте.

Таблица 1 — Рекомендации по проведению биологической оценки МИ, содержащих, генерирующих или состоящих из наноматериалов

| Категория[a] | Вид наноматериала в МИ | Дополнительные рекомендации по проведению биологической оценки МИ в соответствии с ISO 10993-1 |
|---|---|---|
| 1 | Поверхностные наноструктуры | При проведении биологической оценки МИ следует учитывать:<br>- потенциально возможные клеточные или тканевые эффекты в результате прямого взаимодействия с поверхностными наноструктурами (благоприятные и неблагоприятные);<br>- возможное высвобождение (отрыв) наноструктур от поверхности;<br>- возможность генерирования (образования) нанообъектов в результате деградации, износа или процессов механической обработки;<br>- свойства и характеристики наноструктур (см. раздел 5) |
| 2 | Нанообъекты, связанные или инкопорированные в МИ, без задачи их высвобождения | При проведении биологической оценки МИ следует учитывать:<br>- потенциально возможные клеточные или тканевые эффекты в результате прямого взаимодействия со связанными с поверхностью нанообъектами/наноматериалами (благоприятные и неблагоприятные);<br>- способность нанообъектов к высвобождению из МИ;<br>- возможность образования нанообъектов в результате деградации, износа или процессов механической обработки МИ;<br>- основные физико-химические свойства нанообъектов (см. раздел 5) |
| 3 | Нанообъекты/ наноструктуры на поверхности или в объеме МИ;<br>с намеренным/ ожидаемым высвобождением их из МИ | При проведении биологической оценки МИ следует учитывать:<br>- кинетику высвобождения (скорость и количество) нанообъектов и длительность контакта МИ;<br>- потенциально возможные клеточные или тканевые эффекты в результате прямого взаимодействия с нанообъектами/наноматериалами (благоприятные и неблагоприятные);<br>- физико-химические свойства высвобождаемых нанообъектов (см. раздел 5);<br>- токсикокинетику и распределение нанообъектов в тканях (см. раздел 8);<br>- результаты оценки биологического действия нанообъектов (см. раздел 9);<br>- потенциальную возможность образования нанообъектов в результате деградации, износа или процессов механической обработки |
| 4 | МИ — нанообъект | При проведении биологической оценки МИ:<br>- определяют физико-химические свойства нанообъектов (см. раздел 5);<br>- исследуют токсикокинетику и распределение нанообъектов в тканях (см. раздел 8);<br>- проводят биологическую оценку нанообъектов (см. раздел 9) |
| 5 | Нанообъекты[b], высвобождаемые из МИ в качестве продуктов деструкции, износа или в результате процессов механической обработки[c] (например, измельчение или полировка *in situ*) | При проведении биологической оценки МИ:<br>- определяют физико-химические свойства и характеристики нанообъектов (см. раздел 5);<br>- учитывают дополнительные аспекты для нанообъектов, высвобождаемых в результате износа или образующихся в результате обработки *in situ* (см. раздел 7);<br>- исследуют токсикокинетику и распределение нанообъектов в тканях (см. раздел 8);<br>- проводят биологическую оценку образующихся нанообъектов (см. раздел 9);<br>- учитывают длительность контакта и кинетику высвобождения (скорость и количество) |

[a] МИ может содержать наноматериалы, относящиеся более чем к одной категории.

[b] Нанообъекты могут высвобождаться из МИ, не содержащего нанообъекты.

[c] Во время деградации, износа или обработки МИ, содержащего нанообъекты, могут образовываться новые или побочные нанообъекты.

### 4.4 Эквивалентность наноматериалов

Для биологической оценки наноматериала требуется провести его идентификацию, установить эквивалентность материалам, применяемым в МИ, определить характеристики и свойства. Сведений о химическом составе наноматериала недостаточно для установления его эквивалентности материалам, применяемым в МИ, так как специфические свойства наноматериалов могут зависеть от ряда других факторов, таких как размер, форма и поверхностные свойства наноматериала, источник (изготовитель) этих наноматериалов, процесс производства и условия хранения. Эквивалентность наноматериала должна быть подтверждена должным образом и обоснована сопроводительными документами.

Экстраполяция результатов путем использования данных о других МИ, содержащих аналогичные наноматериалы или материалы со сходным химическим составом, не допускается. Если требуется проведение исследования, то его проводят на МИ и/или наноматериалах, которые могут войти в контакт с пациентами.

## 5 Свойства и характеристики наноматериалов

### 5.1 Общие положения

Для биологической оценки наноматериалов необходимы сведения об их физико-химических свойствах. Определение физико-химических свойств необходимо для идентификации конкретного наноматериала и установления его эквивалентности. Определение физико-химических свойств наноматериала/нанообъекта, входящего в МИ и/или образующегося в результате деградации, износа или процессов механической обработки МИ, является одним из основных этапов его биологической оценки. Определение физико-химических свойств требуется при скрининге новых наноматериалов, предполагаемых к применению для изготовления МИ. Определение характеристик наноматериала необходимо для установления или подтвержденияего специфических свойств, проявляющихся в определенной среде и условиях.

При исследовании физико-химических свойств наноматериала должны быть получены ответы на три фундаментальных вопроса:

- химический состав (Из чего он сделан?);
- описание физических свойств (Как он выглядит?);
- внешние свойства (Как он взаимодействует с окружающей средой?).

Физико-химические свойства, подпадающие под ответы на данные вопросы, включают широкий диапазон характеристик нанообъектов. В соответствии с руководством по биологической оценке обычных материалов, используемых в МИ, определение физико-химических характеристик наноматериалов следует осуществлять с учетом свойств, относящихся к применению МИ по назначению (клиническое применение и длительность использования). Общие требования к исследованиям химических, физико-химических, морфологических и топографических свойств материалов, используемых в МИ, установлены в ISO 10993-18 и ISO/TS 10993-19. Руководство по определению и количественной оценке продуктов деструкции (деградации) МИ приведено в ISO 10993-9, ISO 10993-13, ISO 10993-14 и ISO 10993-15. Руководство по определению физико-химических свойств и характеристик должны быть установлены в документах на наноматериалы конкретных видов, например ISO/TR 13014 и ISO/TR 14187 и [57]—[59].

В ISO/TR 13014 приведены рекомендации по определению следующих основных свойств и характеристик промышленных наноматериалов при проведении токсикологического исследования:

- химический состав;
- чистота;
- размеры объекта и распределение по размерам;
- состояние агрегации и агломерации;
- форма;
- площадь поверхности;
- химический состав поверхности;
- поверхностный заряд;
- растворимость;
- дисперсность.

Определение указанных свойств и характеристик наноматериалов, используемых в МИ, следует рассматривать как основу для проведения их биологической оценки. Дополнительное исследование других свойств и характеристик наноматериалов может быть рекомендовано в зависимости от кон-

струкции, назначения и характеристик износа МИ. Примеры других физико-химических свойств и характеристик наноматериалов, которые могут быть исследованы в каждом конкретном случае:

- кристалличность;
- пористость;
- редокс-потенциал;
- (фото)катализ;
- способность к радикалообразованию;
- коэффициент разделения октанол/вода (допускается не применять для твердых материалов).

Для получения данных о свойствах и характеристиках наноматериалов, описанных выше, требуется совместная работа специалистов различных областей, включая токсикологию, физику, химию и др., с целью разработки соответствующей программы исследований характеристик и свойств конкретного МИ, содержащего наноматериал.

Разработаны стандарты, содержащие рекомендации по исследованию характеристик и свойств конкретных наноматериалов, например одностенных и многостенных углеродных нанотрубок (ОУНТ, МУНТ), нанопорошка карбоната кальция, нанопорошка диоксида титана, наночастиц золота и серебра и наноглины[1)].

Для МИ, имеющих наноструктурированные поверхности, может потребоваться определение морфологии наноструктуры поверхности в дополнение к физико-химическим свойствам, приведенным выше. Измеряемые параметры, требуемые для адекватной характеристики морфологии поверхности, зависят от конкретного применения изделия [60], [61]. Рекомендуется использование как минимум трех статистических параметров в качестве стандарта для описания вертикальной и горизонтальной наноархитектур поверхностей в контексте с бактериальной адгезией [42]:

- средняя шероховатость поверхности (*Ra*): среднее отклонение показателей высоты поверхности от средней плоскости;
- разница площади поверхности (*Rsa*): повышение площади поверхности, вызванное шероховатостью, т. е. процентная разница между реальной площадью поверхности и проектной площадью поверхности (данный параметр может быть применим, если возможно точно измерить площадь поверхности);
- число пиков (*Rpc*): число пиков в измеренном профиле.

Рекомендуется определить дополнительные пространственные характеристики: высоту пика и расстояние от пика до пика.

Нанопористые материалы применяют для изготовления ряда МИ, включая системы доставки лекарственных средств и каркасов для тканеинженерных конструкций. Для проведения биологической оценки пористых наноматериалов должны быть определены следующие характеристики:

- размеры и структура пор или пустот;
- плотность пор или пустот;
- распределение пор или пустот.

Свойства и характеристики должны быть определены у наноматериала, представленного в той форме, в которой он будет применен конечным пользователем, т. е. в форме готового изделия. Репрезентативный (представительный) образец (далее — RTM) из готового изделия или материала, обработанный тем же образом, что и готовое изделие, может быть использован для прямой оценки в качестве компонента наноматериала. Исследование наноматериала в виде готового изделия может быть необходимо при проведении токсикологической оценки и определения биосовместимости. Для биологической оценки необходимо определить указанные выше физико-химические характеристики наноматериалов при их нахождении в биологической среде, используемой в тест-системе. Взаимодействие между средой и наноматериалом может существенно влиять на свойства наноматериала в тест-системе. Данный фактор следует учитывать при проведении исследований и оценке полученных результатов.

При контакте с биологическими жидкостями может произойти изменение характеристик поверхности наноматериалов и, следовательно, их биологических свойств, что может оказать влияние на опасность, вызванную наноматериалом (см. 8.2.2).

При определении характеристик нанообъектов, образующихся в процессе износа МИ, могут возникнуть определенные трудности. Методы *in vitro* для моделирования высвобождения наноматериалов/нанообъектов *in situ* должны быть репрезентативными для клинического использования.

---

[1)] Подробная информация размещена по адресу: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_tc_browse.htm?commid=381983.

### 5.2 Определение характеристических свойств наноматериалов, методы их измерений

В таблице 2 приведены основные свойства, которые могут быть использованы в качестве отправной точки для характеристики наноматериалов, используемых в МИ. Подробная информация о применимости этих параметров для биологической оценки приведена в ISO/TR 13014.

Примеры методов измерений, приведенные в таблице 2, могут быть использованы для получения количественных и/или качественных данных для определения свойств наноматериалов (см. ISO/TR 13014). Перечисленные методы разработаны для традиционного анализа частиц или конкретно для наноматериалов.

При исследовании конкретного физико-химического свойства наноматериала применяют несколько методов. Применение одного метода может привести к получению неточных и недостоверных результатов (например, при определении таких параметров как распределение по размерам, химический состав поверхности). Рекомендуется применять (при наличии) дополнительный метод с целью получения достоверных результатов при определении характеристических (основных) свойств наноматериала. Для определения одного свойства может понадобиться два независимых метода. Следует учитывать, что результаты исследования, полученные с использованием разных методов, конкретного свойства нанообъекта могут быть напрямую не сопоставимы, вследствие отсутствия стандартизованных методов физико-химической оценки наноматериалов при разработке надежного плана исследований. Методы, выбранные для определения характеристики или свойства, должны быть обоснованы, исходя из вида, формы наноматериала и предполагаемого назначения МИ. Для определения размеров нанообъектов следует применять как минимум один из методов микроскопии [например, просвечивающую электронную микроскопию (ПЭМ), конфокальную лазерную сканирующую микроскопию (КЛСМ)] [57]—[59]. Следует учитывать возможность получения недостоверных результатов измерений размеров нанообъектов [62].

Так как определение характеристических свойств наноматериалов, как правило, затруднено с научной и технической сторон, следует разработать программу с учетом современных лабораторных методов, гарантирующих качество исследований. Выбор методик, анализ наноматериалов и интерпретацию результатов определения свойств и характеристик наноматериалов должны проводить квалифицированные специалисты с надлежащими подготовкой и опытом. При проведении исследований необходимо тщательно рассмотреть процедуры подготовки образцов (пробоподготовки) для обеспечения того, что полученные данные адекватно представляют материал изделия. Все этапы исследования свойств и характеристик наноматериалов должны быть зафиксированы в протоколе с целью прослеживаемости и надежности результатов. В протоколе должно быть приведено обоснование применения данного метода для исследуемого наноматериала.

Таблица 2 — Основные физико-химические характеристики наноматериалов, используемых в МИ, и примеры соответствующих методов измерений

| Характеристика | Измеряемая величина | Методы измерений | Соответствующий стандарт ISO по методологии |
|---|---|---|---|
| Химический состав и чистота | Количество и характеристика отдельных элементов или в составе молекул (могут быть выражены химической формулой)<br>Уровень концентрации непреднамеренных составляющих (примесей) | Рентгеновская флуоресценция (РФ)<br>Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (РФЭС)<br>Электронная Оже-спектроскопия (ЭОС)<br>Рентгендифракция с инфракрасной спектроскопией с преобразованием Фурье<br>Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (Фурье-ИКС)<br>Спектроскопия комбинационного рассеяния света и другие молекулярные спектроскопии<br>Термогравиметрический анализ<br>УФ-спектрометрия и спектрометрия видимой части спектра | ISO 22309<br>ISO 22489<br>ISO 24173<br>ISO 13084<br>ISO 18144 |

*Продолжение таблицы 2*

| Характеристика | Измеряемая величина | Методы измерений | Соответствующий стандарт ISO по методологии |
|---|---|---|---|
| | | Растровая электронная микроскопия + рентгеновская дифракция или энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДРС)<br>Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия)<br>Масс-спектрометрия (одиночной частицы) с индуктивно связанной плазмой (spИСП-МС) | |
| Размер частиц и распределение частиц по размерам | Размер частиц:<br>эквивалентный сферический диаметр для частиц, демонстрирующих регулярную геометрию<br>Длина одного или нескольких конкретных аспектов геометрии частиц<br>Распределение частиц по размерам:<br>графическое представление, например гистограмма, и/или показатели для статистических параметров, таких как среднее, медиана и/или мода | Динамическое рассеяние света<br>Рентгеновское малоугловое рассеяние<br>Эксклюзионная хроматография (гель-фильтрационная хроматография)<br>Анализ изображений растровой электронной микроскопии (РЭМ), ПЭМ или сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ)<br>Дифференциальный анализ подвижности<br>Центробежное осаждение частиц в жидкости<br>Анализ отслеживания наночастиц<br>Спектроскопия комбинационного рассеяния света<br>Спектроскопия индуцированного лазерного излучения<br>Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)<br>spИСП-МС<br>Тангенциальная поточная фильтрация для отделения наноматериала, сопровождаемая надлежащим обнаружением, например ИСП-МС (ISO 10993-14) | серия стандартов<br>ISO 9276<br>ISO 9277<br>серия стандартов<br>ISO 13318<br>ISO 13320<br>ISO 22412<br>серия стандартов<br>ISO 13322<br>ISO 14488<br>ISO 14887<br>ISO 15900<br>ISO 16700<br>ISO/TS 19590<br>ISO 20998-1<br>серия стандартов<br>ISO 21501<br>ISO 22412 |
| Состояние агрегации/агломерации | Размер частиц<br>Количество частиц агрегата/агломерата по сравнению с общим числом первичных частиц<br>Количество первичных частиц в агрегате/агломерате<br>Распределение количества первичных частиц на агрегат/агломерат | Анализ изображения (крио-)<br>СЭМ или (крио-) ПЭМ<br>Углозависимое рассеяние на различных волнах<br>Статическое светорассеивание<br>Рентгеновское малоугловое рассеяние<br>Рентгеновская дифракция (РД)<br>Рентгеновская спектроскопия поглощения (РСП)<br>Малоугловое рассеяние нейтронов<br>Реологические методы<br>Центробежное осаждение частиц в жидкости<br>Лазерная дифракция<br>Анализ отслеживания наночастиц | См. руководство по определению размеров частиц<br>ISO/TR 13097<br>ISO/TS 12025<br>ISO 13322-1 |
| Форма | Независимые от размера дескрипторы формы<br>Распределение значений независимых от размера дескрипторов формы | Анализ изображений РЭМ, ПЭМ, атомно-силовой микроскопии (АСМ) или СЗМ<br>Методики рассеяния spИСП-МС | ISO 16700<br>ISO 13322-1 |

*Окончание таблицы 2*

| Характеристика | Измеряемая величина | Методы измерений | Соответствующий стандарт ISO по методологии |
|---|---|---|---|
| Площадь поверхности | Объемная и/или массовая удельная площадь поверхности | Методы, основанные на газовых или жидких изотермах адсорбции [теория Брунауэра-Эмметта-Теллера (метод БЭТ)]<br>Жидкостная порозиметрия<br>Анализ изображения<br>Лазерно-индуцированная инкандесценция<br>Жидкостная порозиметрия<br>Анализ изображения<br>Лазерно-индуцированная инкандесценция | ISO 15901-1<br>ISO 15901-2<br>ISO 15901-3<br>ISO 18757<br>ISO 13322-1<br>ISO 9277 |
| Поверхностные наноструктуры | Размеры и геометрия | Интерферометрия<br>Рефлектометрия<br>СЗМ и АСМ | ISO 25178 |
| Химический состав поверхности | Элементарное и молекулярное обилие<br>Реактивность (скорость химической реакции) | Электронная Оже-спектроскопия<br>Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (РФЭС)<br>Масс-спектрометрия вторичных ионов (МСВИ)<br>3D атомная зондовая томография<br>Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДРС)<br>Спектроскопия характеристических потерь энергии электронами (СХПЭЭ)<br>Низкоэнергетическая ион-спектроскопия<br>Спектроскопия комбинационного рассеяния света и другие молекулярные спектроскопии | ISO/TR 14187<br>ISO 18115<br>ISO 24236<br>ISO 15471<br>ISO 18118<br>ISO/TR 19319<br>ISO 17973 |
| Поверхностный заряд | Общее число положительных и отрицательных зарядов на площадь поверхности единичной частицы<br>Зета-потенциал | Изоэлектрическая точка<br>Электрофорезное рассеивание света<br>Электрофорез<br>Электроосмос<br>Электросонарная амплитуда<br>Ток коллоидной вибрации | ISO 20998<br>ISO 13099 |
| Растворимость/диспергируемость | Растворимость:<br>максимальная масса или концентрация растворенного вещества, которая может быть растворена в единичной массе или объеме растворителя при заданной (или стандартной) температуре или давлении<br>Диспергируемость:<br>максимальная масса или концентрация диспергированной фазы в наличии в единичной массе дисперсной среды (растворителя) или единичном объеме дисперсии (растворитель плюс диспергированная фаза) при заданных (или стандартных) температуре и давлении | Конкретные методы определения растворимости нанообъектов отсутствуют<br>Тангенциальная поточная фильтрация с регистрацией размеров наноматериала, например, методом ИСП-МС (ISO 10993-14)<br>Методы определения диспергируемости нанообъектов основываются на размере частицы/распределении по размерам и состоянии (агрегаты/агломераты) (см. размер частицы выше) | ISO 20998<br>ISO 13099 |

Информация, приведенная в таблице 2, основана на ISO/TR 13014. Существуют другие документы, предоставляющие рекомендации по исследованию характеристик наноматериалов/нанообъектов (см. ISO/TS 17200).

Большинство из указанных методов измерений применимы для определения характеристических свойств наночастиц. При изготовлении МИ могут быть использованы другие формы и виды наноматериалов, например нановолокна и нанопластины. Следует учитывать, что указанные характеристики и/или методы могут быть не применимы к другим формам/видам наноматериалов.

У каждого из приведенных методов могут быть свои ограничения, следовательно, требуется обоснование того, что метод применим для исследования конкретного материала.

Некоторым наноматериалам (например, наносеребро, наноразмерный оксид цинка) свойственны растворение или высвобождение (диффузия) ионов. Характеристики растворимости наноматериалов в различных физиологических средах могут быть определены методом тангенциальной поточной фильтрации, которая является методом отделения наноматериалов от их растворенных аналогов. Затем выполняют количественный анализ полученных фракций методом ИСП-МС [63].

### 5.3 Выбор контрольных образцов

Для воспроизводимости и надежности результатов исследований безопасности наноматериалов необходимо наличие положительных и отрицательных контрольных образцов наноматериалов. Следует учитывать, что наличие положительных и отрицательных контрольных образцов наноматериалов ограничено. В связи с этим в качестве контроля используют RTM [65]. В ISO/TS 16195 дано определение термина RTM. Общие требования к RTM (наночастицам и нановолокон в виде порошков) с целью разработки стандартизованных методов определения основных свойств, в том числе для целей оценки безопасности, приведены в ISO/TS 16195.

Общее руководство по применению и приготовлению RTM в качестве контроля (образцов сравнения) для биологической оценки МИ приведено в ISO 10993-12. Образцов сравнения при исследовании свойств наноматериала, кроме сравнения по размерам, недостаточно. Образцы сравнения для определения размеров частиц наноматериала становятся доступны в национальных и международных организациях. База данных всех доступных образцов сравнения наноматериалов представлена на сайте http://gost.e-ecolog.ru. Доступные образцы сравнения включают в себя наночастицы двуокиси титана, коллоидную двуокись кремния, наночастицы золота и ОУНТ. Другие доступные образцы сравнения применимы для калибровки оборудования и неприменимы в качестве образцов сравнения для установления эталонных показателей биологических ответов.

Следует учитывать, что использование надлежащих стандартных материалов сравнения (CMC/SRM) возможно при применении стандартизованных методик измерений размеров и формы наночастиц. Методики измерений должны обеспечивать высокую статистическую достоверность результатов с минимальным влиянием человеческого фактора. Дополнительно образцы сравнения также могут быть использованы как внешний и/или внутренний эталон. Например, внешние стандарты могут быть использованы для калибровки шкалы длины средств визуализации для последующих измерений, а внутренние стандарты позволяют сопоставлять стандартный размер с неизвестным размером.

Разработка набора общепринятых материалов сравнения, включая консенсус по подходящим наночастицам положительного и отрицательного контроля для различных тест-систем, была обозначена как критически необходимая процедура для оценки риска наноматериалов [65]. Необходимость в таких образцах сравнения общеизвестна, из-за практических сложностей их разработка идет медленно, включая отсутствие согласия по вопросам, какие материалы и свойства нуждаются в охарактеризовании, из-за значительных технических препятствий и экономических факторов [64]—[66].

## 6 Подготовка образцов

### 6.1 Общие требования

Подготовка образцов является одним из основных процессов при определении характеристик и свойств МИ и материалов, используемых в их производстве, для биологической оценки. В исследование МИ в форме готового изделия должно быть предусмотрено получение RTM, включая приготовление экстрактов, хранение и стабильность подготовленного исследуемого материала. Общие требования к подготовке образцов МИ установлены в ISO 10993-12.

При подготовке образцов (пробоподготовке) МИ, содержащих или состоящих из наноматериалов (например, использование дисперсий нанообъектов вместо экстрактов), для исследований должны быть учтены дополнительные требования.

Примечание — Руководство по пробоподготовке и методам дозирования для исследований наноматериалов приведены в ISO/TR 16196.

### 6.2 Требования к подготовке образцов наноструктурированных материалов

Подготовку образцов наноструктурированных материалов выполняют в соответствии с ISO 10993-12, распространяющегося на МИ, имеющих внутренние (в объеме изделия) наноструктуры и/или поверхностные наноразмерные структуры. Наноструктурированная поверхность увеличивает общую площадь поверхности МИ. Использование рекомендуемых значений площади поверхности в ISO 10993-12 приводит к занижению значения истинной площади поверхности наноструктурированного материала, если оно получено измерением по внешним линейным размерам. Допускается осуществлять подготовку образцов наноструктурированных материалов в процессе экстракции в соответствии с ISO 10993-12 с учетом того, что пациент контактирует с истинной площадью поверхностью.

В соответствии с ISO 10993-12 стандартная площадь поверхности образца может быть использована для определения объема необходимого экстрагента. Стандартная площадь поверхности включает в себя суммарную площадь обеих сторон образца и исключает неопределяемые неровности поверхности. Данное требование следует применять к материалам с наноструктурированной поверхностью.

В соответствии с ISO 10993-12 могут быть применены другие соотношения площади поверхности к объему для экстракции из нанопористых материалов при условии, что при исследовании имитируют условия клинического применения или определяют потенциальную опасность наноматериала.

При применении методов экстракции по ISO 10993-12, возможно, не произойдет высвобождение наноматериалов из МИ вследствие сильного связывания наноматериалов с матриксом или поверхностью МИ. При относительно слабом связывании нанообъектов с поверхностью МИ может произойти их экстракция.

### 6.3 Требования к подготовке образцов нанообъектов

Для нанообъектов некоторые из требований к пробоподготовке, установленные в ISO 10993-12, могут быть не применимы, т. к. необходимо учитывать дополнительные процессы (например, агрегацию/агломерацию частиц). С использованием экстрактов оценивают только влияние примесей/контаминаций. Следует учитывать, что наноматериалы диспергируются в жидкости при проведении большинства исследований, необходимых для биологической оценки и оценки риска наноматериалов. Нанообъекты могут быть легко диспергированы в жидкостях, позволяя проведение большинства биологических анализов, таким образом, обеспечивая прямую оценку риска нанообъекта. Как правило, для экстракции используют полярные и неполярные среды согласно ISO 10993-12. Дисперсия нанообъектов должна быть выбрана с использованием среды, соответствующей условиям его клинического применения и диспергируемости. Дисперсия должна быть оптимизирована для доставки нанообъектов в конкретную тест-систему, и для большинства нанодисперсий используют полярный растворитель.

Следует учитывать, что небольшой размер и возможно измененные физико-химические характеристики нанообъектов представляют значительные трудности при подготовке образцов по сравнению с подготовкой образцов макроматериалов или химических веществ. При подготовке образцов следует учитывать дополнительные факторы, включая поверхностные свойства нанообъектов, повышающие их реактивность; возможность формирования агрегатов и агломератов; трансформацию нанообъектов в дисперсии путем гидратации, частичное растворение, потенциально сильное воздействие низкоуровневых загрязнений на физико-химические и токсикологические свойства нанообъектов. Следует учитывать возможность адсорбции нанообъектов к поверхностям емкостей. На скорость доставки клеток в культуру может влиять диффузия и гравитационное осаждение нанообъектов (см. 9.2). Следует контролировать численные концентрации нанообъектов в испытуемых образцах.

Протоколы пробоподготовки должны быть разработаны в сочетании с методами измерений (см. таблицу 2). Агрегация и агломерация ограничивают способность определения небольших изменений в распределении по размерам частиц с помощью высокопроизводительной автоматизированной системы измерения. Измерение больших популяций частиц или волокон позволяет определить степень агломерации и агрегации. Осознание этих факторов необходимо для разработки надежных протоколов пробоподготовки нанообъектов, изделий, которые содержат нанообъекты или изделий, генерирующих

или высвобождающих нанообъекты. Решение этих вопросов может потребовать значительных усилий, направленных на развитие стратегий приготовления и обработки образцов по сравнению с изделиями, использующие традиционные материалы.

При подготовке образцов наноматериалов следует учитывать отличие растворимости от диспергируемости его исследуемых нанообъектов или компонентов. Некоторые наночастицы могут быть растворяемы частично или медленно. Различие между растворимостью и диспергируемостью важно, так как дисперсия материала может вызвать ответ, отличающийся от молекулярной или элементарной токсичности, предсказанной на основе химического состава [67].

Нанообъект, являющийся растворимым или частично/медленно растворимым в биологической среде, как правило, следует вводить в тест-систему в молекулярной форме. Слаборастворимые или нерастворимые наноматериалы, как правило, следует вводить в тест-систему в виде дисперсии нанообъектов. На практике может потребоваться тщательный анализ для определения, был ли конкретный нанообъект полностью диспергирован, частично растворен (например, в случае некоторых металлов) или полностью растворен в конкретных лабораторных условиях. Растворенные нанообъекты могут вызвать ответ, сходный с ответом растворенных макро- и микроматериалов. Если возможно, то скорость растворения также должна быть рассмотрена в дополнение к самой растворимости.

Нанообъекты чувствительны к методам, применяемым при пробоподготовке, из-за своих уникальных свойств поверхности. Дисперсность нанообъектов зависит от их взаимодействия между собой и взаимодействия нанообъектов с окружающей их средой. Следует учитывать, что диспергированные нанообъекты необязательно существуют только в виде первичных частиц. Формирование вторичных частиц в виде агрегатов (объектов, включающих сильносвязанные или спеченные объекты) и агломератов (скоплений слабосвязанных частиц или агрегатов или смесей обоих) может происходить в растворах, порошках и аэрозолях, при условии, что они не стабилизированы поверхностным зарядом или стерическим взаимодействием. В результате, состояние дисперсии и распределение нанообъектов по размерам в образце могут измениться со временем. Данное свойство следует учитывать при приготовлении экстрактов и/или исходных (стоковых) и разбавленных (дозовых) дисперсий, в которых незначительные изменения pH, ионной силы или наличие молекулярных взаимодействий может значительно изменить дисперсию нанообъектов. По этой причине определение стабильности исследуемого объекта является критическим фактором для получения репрезентативных и воспроизводимых результатов при проведении биологической оценки.

Подготовка образцов нанообъектов может включать в себя описание свойств готового МИ или комплектующих материалов, приготовление основных и дозовых растворов для испытаний на животных и *in vitro*. Требования к пробоподготовке могут варьироваться в зависимости от способов дозирования и метода доставки нанообъекта. Общепринятые этапы пробоподготовки и способов введения исследуемого образца включают в себя следующее:

- идентификацию, хранение и стабильность исследуемых материалов, включая вариативность между партиями;
- химический состав тестовой среды;
- выбор подходящей единицы (размерности) дозы;
- описание свойств образцов, приготовленных из основных дисперсий до введения дозы.

Дополнительная информация приведена в других подразделах настоящего стандарта. Процедура подготовки образца должна быть подробна описана в протоколе с обоснованием выбора соответствующего метода.

### 6.4 Идентификация, хранение и стабильность исходных наноматериалов

В настоящем подразделе приведены факторы, которые следует учитывать при получении дисперсий и хранении приготовленных наноматериалов.

Основные дисперсии получают по технологиям, используемым для изготовления готового МИ из наноматериала. Альтернативные технологии могут быть применимы для приготовления дисперсий для биологической оценки. Исходные дисперсии в идеальном случае содержат объекты одинаковых размеров и имеют предсказуемую полидисперсность [68].

Получение дисперсий нанообъектов осуществляют методами ультразвуковой обработки, перемешиванием, применением растворителей и стабилизирующих реагентов, например поверхностно-активных веществ. Химические компоненты, например поливинилпирролидон, цитрат или дубильная кислота, могут быть добавлены в нанообъекты для предотвращения их агломерации/агрегации или

увеличения степени дисперсности в растворе. Небольшие линейные полимеры, такие как полиэтиленгликоль, могут быть конъюгированы с нанообъектами для предотвращения распознавания системой мононуклеарных фагоцитов (СМФ), таким образом повышая время их циркуляции в организме [69], [70]. Белки или углеводы могут быть добавлены к нанообъектам для адресной доставки их в конкретные клетки или ткани организма. Необходимо иметь подробные сведения о химических веществах/покрытиях, которые связаны с исследуемым наноматериалом, так как они являются ключевыми при определении биологических эффектов и могут быть источником контаминаций.

Методы получения дисперсий нанообъектов должны быть тщательно выбраны, так как они потенциально могут изменить физико-химические свойства и токсичность нанообъектов. Возможные механизмы изменения токсичности включают в себя фрагментацию нанообъектов при их измельчении, модифицирование свойств поверхности диспергирующими агентами, десорбцию покрытий, окислительно-восстановительные процессы и другие. Методы получения дисперсий должны быть оценены на предмет наличия таких эффектов в каждом конкретном случае. Эффекты, наблюдаемые во время оценки способа получения дисперсий нанообъектов, должны контролироваться или измеряться количественно, если существуют данные об изменении токсичности образца наноматериала и/или нанообъекта.

Наноматериалы следует хранить в соответствии с установленными требованиями к конкретному методу исследований и пробоподготовки. Общие требования к хранению — исключение воздействия крайних значений температур, света и влаги.

Процедуры хранения и обработки должны учитывать реакционные свойства наноматериала.

Наноматериалы, используемые в МИ, должны быть проанализированы на предмет контаминаций и примесей. Наличие низких уровней контаминаций или примесей может значительно повлиять на физико-химические и токсикологические свойства образцов наноматериалов и исказить результаты исследований. Примеры контаминаций, обнаруживаемых в наноматериалах, включают в себя бактериальный эндотоксин, поверхностно-активные вещества, остаточные количества растворителей, металлы и катализаторы. Контаминация может произойти при изготовлении, обработке и диспергировании наноматериалов, следовательно, образцы наноматериалов следует проверять на наличие контаминаций на каждой стадии процесса подготовки образца.

Необходимо оценить стабильность образцов наноматериала при пробоподготовке с целью определения возможности:

- растворения, деградации или трансформирования наноматериала с течением времени (см. раздел 7);
- изменений распределения частиц по размерам или поверхностного заряда с течением времени.

При необходимости исходные растворы дисперсий должны быть подготовлены заново и повторно охарактеризованы.

### 6.5 Описание химического состава исходных и разбавленных (дозовых) дисперсий

Приготовленные дисперсии нанообъектов, используемые для биологической оценки, должны быть совместимы с физиологическими условиями. Например, разбавленные растворы для методов *in vitro* с клетками млекопитающих должны быть изотоничными, приведенными до pH, равным 7,4, и применимыми в присутствии бивалентных ионов и смесей белков [71]. Химический состав раствора, применяемого для создания физиологических условий, может оказать влияние на физико-химические характеристики наноматериала, включая степень агломерации и/или агрегации нанообъектов.

Нанообъекты могут оказывать влияние на используемую культуральную среду. Для обеспечения воспроизводимости результатов исследований в протокол включают описание, состав и характеристики тестовой среды и применяемых растворов. Следующие параметры являются обязательными для характеристики химического состава среды и разбавленных растворов дисперсий, используемых для исследований *in vitro* и *in vivo* [68]:

- ионная сила;
- концентрация кальция и магния и анион, использованный в качестве источника катионов (например, $MgSO_4$ или $MgCl_2$);
- pH и состав буферного раствора;
- органические добавки (например, сыворотка, альбумин бычьей сыворотки, антибиотики);
- состав и концентрация диспергирующих агентов.

### 6.6 Характеристика исходных растворов дисперсий

Для обеспечения воспроизводимости результатов исследований в протоколе должны быть зафиксированы методы, применяемые для получения исходных растворов дисперсий. Следующие сведения являются обязательными для описания свойств исходных дисперсий [68]:

- информация от изготовителя;
- аналитические данные о физико-химических свойствах (см. раздел 5);
- измеренная массовая концентрация в исходной дисперсии (также должна быть определена как объемная концентрация и счетная концентрация наночастиц);
- для наноматериалов на основе металлов, измеренная концентрация растворенных ионов металла;
- состав и (если возможно) концентрации примесей и контаминаций;
- прочие условия, включая форму, объем и тип материала емкости, используемой для получения исходной дисперсии;
- стабильность (срок годности) исходных дисперсий.

Необходимость определения других свойств рассматривают в каждом конкретном случае.

Должны быть описаны действия, предпринятые для предотвращения контаминаций (например, использование ультрачистой воды и реагентов). Необходимо учитывать возможность контаминации, происходящей от износа кончика зонда или поверхности емкости, если образцы готовят методом ультразвуковой обработки суспензий. Также необходимо учитывать появление контаминации из других источников.

Требования к подготовке и определению свойств образцов наноматериалов для исследования их ингаляционной токсичности установлены в ISO 10801 и ISO 10808.

### 6.7 Характеристика доз, приготовленных из исходных растворов дисперсий

Методы, используемые для приготовления доз (разбавленные растворы дисперсий), должны быть подробно описаны в протоколе для обеспечения воспроизводимости и помощи в интерпретации результатов исследования. Следующие параметры являются обязательными для определения свойств разбавленных растворов дисперсий до момента их введения экспериментальным животным или в *in vitro* тест-системы [68]:

- рекомендуемые параметры для определения характеристик исходных дисперсий (см. 6.5 и 6.6);
- состав среды, использованной для приготовления разбавленного образца раствора и его объем;
- pH разбавленного образца раствора и состав буферной системы;
- описание примененного способа или способов приготовления доз дисперсии, включая длительность звуковой обработки/перемешивания и/или энергозатрат;
- описание введения дозы/образца, включая введенный объем, процедуру смешивания (для исследований *in vitro*) и время, прошедшее после соникации или перемешивания образца дисперсии;
- описание повторного анализа подвыборки из основных или образцовых/дозовых дисперсий для уточнения свойств при завершении дозирования или после модификации дозового раствора.

Меры, предпринятые для улучшения дисперсии и/или ее диспергируемости, должны быть подробно описаны и обоснованы в протоколе.

Рекомендации по приготовлению дозовых дисперсий нанообъектов для исследований пероральной, ингаляционной и дермальной токсичности приведены в ISO/TR 16196 и [68].

### 6.8 Единицы дозы

Уровни доз для токсикологических исследований, как правило, выражают в единицах массовой концентрации. Тем не менее, существует множество характеристик наноматериалов, способных повлиять на их токсикологические свойства. Общепринято, что в дополнение к массовой концентрации, для полной характеристики дозы наноматериалов должны быть использованы другие характеристики, включая объемную концентрацию и счетную концентрацию частиц. Необходимо предоставить адекватное подробное описание характеристики наноматериалов, чтобы конечный пользователь мог сопоставить друг с другом различные единицы/размерности дозы, включая массовую, счетную и объемную концентрацию частиц [72]. Тем не менее, не всегда возможно точно измерить площадь поверхности и/или концентрации частиц, особенно при наличии их агломерации. Кроме того, измерение площади поверхности в настоящее время ограничены измерениями наноматериалов в виде порошка, в то время как определение размеров жидких нанодисперсий до сих пор находятся в стадии разработки. Если кон-

центрация частиц или площадь поверхности не могут быть измерены напрямую, они, вероятно, будут иметь большее значение неопределенности, чем массовая концентрация [73].

Возможны ситуации, когда массовая концентрация больше подходит для описания дозы наноматериала. Например, когда токсичность обусловлена ионами, высвобождаемыми нанообъектами, наиболее подходящей единицей размерности дозы может быть масса растворимых ионов. Для ингаляционного (аэрозольного) воздействия могут быть применимы другие метрические единицы дозы.

Наличие клеточных отложений (депозитов) должно быть учтено при определении значимой токсичной дозы в исследованиях наноматериалов *in vitro* [72], [74], [75]. Контакт небольших нанообъектов (например, с гидродинамическим диаметром менее 40 нм) со слоями культивированных клеток в основном определяется диффузией и силами конвекции. Более крупные нанообъекты и формирующиеся в культуральной среде их агрегаты оседают значительно быстрее из-за дополнительного влияния сил седиментации. Эти факторы, а также взаимодействие с белками и другими компонентами культуральной среды, могут повлиять на количество нанообъектов, которые непосредственно контактируют с культивированными клетками.

Параметры, которые влияют на механизм формирования депозитов [такие как плотность и бивариантное (длина и ширина) распределение размеров], концентрация, которая достигает поверхности клеточного слоя (отложенная доза) и количество наноматериала, поглощенных клетками (клеточная доза) могут дать дополнительную информацию для интерпретации наблюдаемых биологических ответов [72], [76], [118]. Необходимо отметить, что на практике может быть сложно измерить депозиты клеток и клеточное поглощение.

### 6.9 Дополнительные положения

#### 6.9.1 Эндотоксин

Бактериальный эндотоксин или липополисахарид (LPS), компонент клеточной стенки грамотрицательной бактерии, является наиболее преобладающим видом пирогена. Эндотоксин распространен в окружающей среде и является контаминирующим агентом наноматериалов [77].

Наличие эндотоксина в качестве контаминирующего агента наноматериалов может оказать влияние на результаты биологической оценки и привести к получению недостоверных результатов биосовместимости [77]—[79]. Следовательно, важно оценить контаминацию эндотоксином, что, как правило, происходит на стадии исходного раствора дисперсии и/или самого наноматериала.

Результаты традиционных количественных анализов на эндотоксин для наноматериалов могут быть ненадежными вследствие того, что свойства наноматериалов могут препятствовать реагентам и/или методам обнаружения, применяемым в анализах [80], [81]. Например, в пробе лизата амебоцитов мечехвоста (ЛАЛ) нанообъекты могут препятствовать реакционной активности эндотоксина, реакции ЛАЛ или обнаружению продуктов реакции [81]. Данные эффекты могут привести к переоценке или недооценке эндотоксина в образце. Дополнительно, для исключения наличия эндотоксина в исследуемом растворе могут быть определены содержание и состав фосфолипидов.

Выбор подходящего метода для оценки контаминации эндотоксином в МИ проводят отдельно для каждого конкретного случая. Существуют адаптированные протоколы ЛАЛ-теста для наноматериалов. Разработана диаграмма решений для помощи в выборе подходящего протокола ЛАЛ-теста для конкретного наноматериала и устранения потенциальных проблем, связанных с тестированием различных типов наноматериалов [83]. Альтернативные методы, их преимущества и недостатки по сравнению с ЛАЛ-тестом приведены в [82] и [83].

В ISO 29701 приведено описание ЛАЛ-теста, применяемого для оценки наноматериалов на клеточных биологических системах *in vitro*. Метод применяют для образцов нанообъектов, диспергированных в водной среде, например воде, сыворотке или реакционной среде, с инкубированием нанообъектов в таких средах в течение заданного времени при температуре 37 °С. Метод, установленный в ISO 29701, ограничен исследованиями образцов *in vitro*, при этом данный метод может быть адаптирован к нанообъектам для введения животным парентеральным путем.

Другим способом является метод активации моноцитов (МАТ) — валидированный количественный метод, в котором используют естественный механизм повышения температуры организма и который применяют для исследования на эндотоксины, связанные с наноматериалами, а также на другие биологические пирогены (например, дрожжевые, паразитические и вирусные пирогены) [84]—[86].

Существующие методы удаления эндотоксина из наноматериалов могут привести к агломерации наночастиц или другим нежелательным изменениям. Рекомендуется применять методы, препятствующие контаминации в процессе изготовления наноматериалов [77].

Эндотоксин не дезактивируется большинством методов стерилизации [82]. Эндотоксин может быть дезактивирован обработкой в течение 30 мин сухим жаром при температуре от 250 °С и выше (Европейская Фармакопея 8.0, секция 2.6.14). Сухой жар при температуре выше 220 °С, как правило, применяют для стерилизации и депирогенизации стеклянных емкостей (Европейская Фармакопея 8.0, секция 5.1.2). Полученное снижение ≥ 3-log концентрации терморезистентного в бактериальном эндотоксине может быть использовано для замены биологических индикаторов. Следует учитывать, что приведенные выше методы для дезактивации эндотоксина могут изменять свойства наноматериалов или разрушать их.

**6.9.2 Стерилизация**

Стерилизация является важным вопросом при доклинической биологической оценке МИ и эксплуатации готового изделия.

В процессе исследования добавление нестерильных дисперсий нанообъектов в среду, содержащую белки и питательные вещества, может привести к появлению таких инфекционных агентов, как бактерии, грибки и вирусы. Стерилизация образцов нанообъектов необходима для предотвращения микробной и вирусной контаминации, что может препятствовать нормальному функционированию тест-систем и искажать результаты исследования.

Стерилизация готового МИ требуется для исключения потенциальной контаминации инфекционными агентами.

Методы стерилизации наноматериалов приведены в [87] и [88] и включают в себя следующее:

- автоклавирование;
- стерилизующую фильтрацию;
- гамма-облучение;
- этиленоксид.

Дополнительным методом стерилизации является высокое гидростатическое давление [87], при этом должно быть обеспечено уничтожение бактериальных спор.

В процессе стерилизации методами, приведенными выше, могут измениться свойства наноматериала или может произойти его разрушение. Потенциальные изменения в результате стерилизации, зависящие от материала, могут влиять:

- на степень разрушения;
- размеры и формы;
- агрегационное состояние;
- вид и концентрацию примесей;
- механизм и скорость деградации;
- стабильность;
- биосовместимые свойства;
- функциональные свойства.

Например, термическая стерилизация автоклавированием может изменить механические свойства полимеров, имеющих точку стеклования и/или плавления ниже 120 °С [87]. В процессе стерилизации методами с применением гамма-облучения или этиленоксида, используемыми к термочувствительным материалам, может произойти образование свободных радикалов, инициирующих появление токсичных продуктов деструкции материала [88]. Исследование характеристических (основных) свойств наноматериалов или МИ, содержащих наноматериалы, следует проводить после стерилизации, чтобы учитывать все изменения, вызванные данной обработкой.

Стерилизующая фильтрация, альтернативный метод для термо- и химически-чувствительных наноматериалов [87], использует фильтрацию через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (220 нм). Стерилизующая фильтрация не может быть использована для наноматериалов, содержащих фракции с частицами диаметром приблизительно 220 нм или более, а также сильновязких суспензий. Нанообъекты могут абсорбироваться или адгезироваться на волокна фильтра, таким образом, снижая концентрацию нанообъектов.

Последствия стерилизационной обработки в значительной степени зависят от природы материала. Влияние стерилизации на свойства наноматериалов нужно оценивать отдельно в каждом конкретном случае. Возможно, понадобится несколько методов для выбора оптимального способа стерилизации конкретного наноматериала.

Изменения, вызванные стерилизацией наноматериала, могут иметь длительный эффект. Например, даже короткоживущие свободные радикалы, генерированные при стерилизации гамма-облучением или этиленоксидом, могут инициировать каскадные (цепные) реакции, которые ведут к образованию

продуктов деструкции и/или изменению функции изделия. Однако добавление в состав материала ловушек свободных радикалов (например, гистидина или фенилаланина) может защитить его от деструкции, что продемонстрировано для биоматериалов на основе альгината [89].

В связи с этим необходимо проведение мониторинга стабильности свойств стерильного наноматериала и/или готового изделия в течение всего срока его годности.

В некоторых случаях может быть затруднено или невозможно найти приемлемый метод стерилизации для конкретного наноматериала. В таких случаях может стать решением производство наноматериалов/изделий при стерильных условиях.

## 7 Высвобождение нанообъектов из медицинских изделий

### 7.1 Общие положения

Всестороннюю идентификацию и характеристику потенциально высвобождаемых нанообъектов необходимо проводить при физиологических условиях, сходных с условиями применения МИ. Необходимо оценить кинетику высвобождения, количество, миграцию и аккумуляцию нанообъектов в биологической среде.

### 7.2 Продукты деструкции (деградации)

Требования ISO 10993-9 предоставляют основу и обязательные условия для рассмотрения идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деструкции из МИ. Согласно ISO 10993-9:2009, приложение А, исследования процессов деструкции обязательны, если:

a) МИ является резорбируемым,

b) МИ предназначено для имплантации на срок более чем 30 сут, или

c) имеющаяся информация указывает на то, что материалы МИ при его контакте с организмом могут образовывать токсичные вещества.

В ISO 10993-13, ISO 10993-14 и ISO 10993-15 приведены общие аспекты деструкции полимеров, керамики, металлов и сплавов соответственно.

В совокупности с высвобождением ионов случаи коррозии также могут привести к выделению частиц в нанодиапазоне. Для отдельных наноматериалов известно, что новые нанообъекты могут формироваться на основе высвобожденных ионов (например, наносеребро [90]).

### 7.3 Высвобождение нанообъектов в процессе износа

При эксплуатации многие МИ подвержены износу с течением времени и высвобождению нанообъектов (например, частиц, волокон, хлопьев, фрагментов) в его среду. При проведении оценки риска МИ следует учитывать биологическую устойчивость отдельных нанообъектов, которые, благодаря их размерам, большой удельной площади поверхности и высокой реакционной способности, могут эффективно взаимодействовать с биологическими структурами [91]. Следовательно, процессы высвобождения нанообъектов из-за износа должны быть рассмотрены соответствующим образом при соблюдении следующих условий:

a) МИ является наноматериалом;

b) МИ покрыто наноматериалом;

c) при нормальных условиях функционирования МИ происходит трение с биологической тканью или трение между его компонентами, например стоматологическим цементом или композитами;

d) если следы производственной обработки могут включать в себя побочные наноматериалы.

Методы отбора образцов частиц износа, генерируемых имплантатами при протезировании суставов человека и в имитаторах суставов, приведены в ISO 17853. В ISO 17853 приведены приборы, реагенты и методы исследования отбора и характеристики как полимерных, так и металлических частиц износа из образцов тканей, иссеченных вокруг имплантата при протезировании сустава, полученных при ревизионной операции или посмертно, и из образцов исследуемых жидкостей имитатора сустава. Допускается некоторые из этих процедур адаптировать для отбора и определения характеристик частиц из биологических жидкостей человека (например, синовиальной жидкости).

Следует учитывать, что МИ (например, имплантаты, зубные пломбы), при изготовлении которых наноматериалы не применяют, при эксплуатации могут высвобождать нанообъекты в результате износа.

### 7.4 Обработка *in situ*

Механическая обработка (например, полировка, измельчение) отдельных МИ *in situ*, проводимая в стоматологии, может привести к образованию наноматериалов, вне зависимости от того, содержит ли исходное МИ наноматериалы или нет [92]. Данные сведения должны быть учтены при проведении оценки риска.

## 8 Токсикокинетика

### 8.1 Общие положения

Основным риском, связанным с наноматериалами, является наличие или высвобождение свободных нанообъектов, ионов или компонентов, которые составляют отдельные наноматериалы. В МИ наноматериалы могут находиться в свободном состоянии, связанном или внедренном в структуру изделия, каждый со своим потенциалом к высвобождению в организм.

Кинетические свойства нанообъектов потенциально могут быть описаны последовательными процессами абсорбции клетками, распределением в тканях, метаболизмом и экскрецией/элиминацией.

Токсикокинетические исследования включают в оценку токсикологического риска МИ, содержащих наноматериалы. Токсикокинетическое исследование проводят при условии, если наноматериал имеет свойство к высвобождению нанообъектов из МИ с последующей абсорбцией, распределением, метаболизмом и/или экскрецией (АРМЭ). В ISO 10993-16 установлены основные требования к проведению токсикокинетических исследований. Настоящий стандарт применим к наноматериалам, но может потребоваться введение ряда поправок в методы детектирования, модели на животных, длительности исследования, способы дозирования и методики анализа.

Такие факторы, как путь введения, размер нанообъекта или его агрегатов/агломератов, характеристики поверхности (химические свойства и заряд), вид животных, доза и методы дозирования, могут влиять на характер токсикокинетики в моделях на животных [69], [70], [93]—[95]. При исследовании наноматериалов в тест-системах необходимо учитывать, что некоторые из определяемых свойств могут быть изменены во время измерений, что зависит, в основном, от окружающей среды (например, культуральной среды ткани, наличия крови/сыворотки, белка). Данные взаимодействия со средой могут привести к временной эволюции самих наноматериалов, например приобретению/сбрасыванию белковой оболочки, формированию агломератов/агрегатов нанообъектов и другим изменениям наноматериалов. Данные изменения могут повлиять на свойства наноматериала, включая его токсикологические свойства.

Следовательно, при проведении оценки риска следует провести токсикокинетическое исследование с учетом факторов, влияющих на план исследования, его проведение и интерпретацию результатов.

### 8.2 Факторы, влияющие на токсикокинетику

#### 8.2.1 Физико-химические свойства

Выявлено, что такие свойства, как размер и распределение по размерам, форма, заряд, агломерация и агрегация, гидрофильность и структура поверхности, влияют на характер процессов АРМЭ. Например, более мелким наночастицам (от 10 до 15 нм) свойственно широкое распределение, более крупные наночастицы имеют тенденцию к накоплению в органах СМФ, особенно в печени и селезенке [69], [95], в органах, которые, как правило, играют важную роль в фильтрации старых или поврежденных эритроцитов (RBC) и других частиц крови [97]. Выявлено, что частицы размером более 200 нм с большей вероятностью аккумулируются в селезенке, а не в печени, из-за размера межэндотелиального клеточного пространства (примерно 200 нм шириной). В исследовании, проведенном на наночастицах золота размером от 1,4 до 200 нм, получен аналогичный результат. В печени накопление наночастиц увеличивается с увеличением размеров частиц [95]. На клеточном уровне наночастицы размером более 100 нм могут быть захвачены клетками посредством различных механизмов эндоцитоза, таких как клатрин- или кавеолин-опосредованный эндоцитоз [98]. Более крупные наночастицы с меньшей вероятностью проникают через кожу, а более мелкие могут быть способны достичь более глубоких слоев эпидермиса, дермы и нижних слоев клеток [96].

Физико-химические свойства поверхностей наноматериалов играют критическую роль в характере взаимодействия с биомолекулами [99] и биологическими системами. Выявлено, что такие свойства поверхности как гидрофильность и гидрофобность и заряд, влияют на адсорбцию белков, стабиль-

ность и силу их адсорбции, а также на свойства адсорбированных биомолекул (см. 8.2.2). «Концевые» («якорные») агенты могут быть использованы для стабилизации нанообъектов путем связывания к поверхности нанообъекта ковалентными связями или нековалентными химическими взаимодействиями. Данные «концевые» агенты могут предотвращать агрегацию нанообъектов. «Концевыми» агентами являются, например, небольшие органические молекулы, водорастворимые полимеры, полисахариды, липиды, белки и поверхностно-активные вещества. «Концевые» агенты могут влиять на стабилизацию связывания и/или токсичность.

Выявлено, что некоторые физико-химические свойства наночастиц влияют на токсикокинетику. Наночастицы размерами 10 нм или менее имеют более быструю экскрецию через мочу [100] и более широкое распределение в тканях [93]. Гидрофильное покрытие [например, полиэтиленгликоль (ПЭГ)] увеличивает время циркуляции наночастиц в крови [69], [70]. Выявлено, что количество наночастиц двуокиси кремния размером 20 нм в печени и селезенке больше по сравнению с количеством наночастиц двуокиси кремния размером 80 нм [101]. Наночастицы двуокиси кремния размером как 20 нм, так и 80 нм, обнаруживали в моче, при этом скорость экскреции для наночастиц 80 нм выше [102]. Выявлено, что нанообъекты диаметром менее 12 нм могут проникать через гематоэнцефалический барьер [103]. Помимо этого, величина поверхностного заряда контролирует формирование белковой «короны» (см. 8.2.2), а также взаимодействие с клеточными мембранами, что также может повлиять на токсикокинетику. Тем не менее, на данный момент остается открытым вопрос, какой параметр является наиболее значимым по влиянию на процессы АРМЭ.

**8.2.2 Биомолекулярная адсорбция**

На поверхность наноматериалов в биологических средах быстро адсорбируются белки, формируя так называемую белковую «корону». Выявлено, что белковые «короны» являются двуслойными системами, состоящими из внутреннего ядра сильно связанных белков и внешнего слоя легко обменивающихся молекул [104]. Необходимо отметить, что белковая «корона» не является статичной и может меняться в зависимости от окружающей нанообъекта среды. Дополнительно, другие биомолекулы, такие как липиды, могут также адгезироваться на поверхность наноматериала. Формирование «короны» сывороточного белка улучшает распознавание и захват клетками системы мононуклеарных фагоцитов [99], [104], [105]. Это, как правило, приводит к достаточно быстрой очистке крови от нанообъектов, обычно печенью и селезенкой, которые являются ключевыми органами системы мононуклеарных фагоцитов [70], [93], [94], [105]—[110].

Структура и состав белковой «короны» зависят от синтетической природы наноматериала (т. е. относится к таким свойствам материала, как размер, форма, состав, заряд и гидрофобность [111]), типа физиологической среды (например, крови, межклеточной жидкости, цитоплазмы клеток) и длительности воздействия окружающей среды [112].

Белковая «корона» изменяет размер и поверхностный состав наноматериала, придавая ему биологические свойства, отличные от его синтетических свойств. В результате приобретенные биологические свойства влияют на характер физиологических ответов, включая перенос сигналов, кинетику, транспорт, аккумуляцию и токсичность [104], [105], [113]. В зависимости от типа тканей и клеточного состава выявлены значительные отличия в биохимическом составе, ионной силе и кислотности биологических жидкостей. Свойства и количество белков, адсорбированных на нанообъекты, окружающее биологическое пространство могут повлиять на характер и степень клеточных ответов, включая распознавание клеток нанообъекта, интернализацию (например, макрофагами) и последующие результаты.

Среды плазмы и сыворотки наиболее подходят для определения типов белков, абсорбирующихся на конкретных наноматериалах. Использование модельных жидкостей, имитирующих биологическое окружение, может помочь прогнозировать поведение нанообъектов при физиологических условиях. Модельные жидкости могут быть использованы для определения биомолекул, которые могут адсорбировать к поверхности наноматериала и оценки трансформаций жизненного цикла наноматериалов [114]—[117]. Например, применяют модельную биологическую жидкость (раствор Гэмбла) для оценки прочности различных видов УНТ [117].

При взаимодействии нанообъекта с окружающей средой носитель (например, суспензия) может влиять на токсикокинетику нанообъектов. Некоторые носители влияют на агломерацию нанообъектов, изменяя распределение наночастиц по размерам, другие носители влияют на адгезию веществ к поверхности. Предпочтительно, чтобы носитель был тем же, что и в других исследованиях токсичности. Проведение полноценной характеристики материала как чистого наноматериала, так и наноматериала, используемого в тест-системе, является критическим.

Морфология наноструктуры поверхности может влиять на взаимодействие/адсорбцию наноматериала и белков, их циркуляцию/распределение и токсикокинетический профиль.

Химический состав поверхности и структура наноматериалов особенно важны, так как они определяют характер и интенсивность первичных стадий взаимодействия с биологическими системами и последующую цепь событий. Молекулы поверхности могут быть естественной структурой наноматериалов или целенаправленно добавленными компонентами, предназначенными для изменения поверхностных свойств наноматериалов с целью придания им конкретной функции. Например, покрытия могут быть использованы для изменения поверхностных свойств наночастиц с целью предотвращения процессов агрегации или агломерации, способствовать преимущественной адсорбции конкретного белка или усилить адресную доставку в конкретные ткань или клетки [118].

**8.2.3 Способ введения образца**

Важен способ введения образца, так как он может влиять на свойства поверхности наноматериалов/наночастиц и биораспределение нанообъектов в организме [94], [104], [105], [119]—[121]. В зависимости от места введения дальнейшая кинетика выделенного нанообъекта может быть изменена процессом адгезии молекул к поверхности наноматериала. В этом отношении формирование «короны» сывороточного белка предполагает улучшение распознавания и захвата клетками СМФ [99], [104], [105]. Это, как правило, приводит к достаточно быстрой очистке крови от наночастиц, обычно печенью и селезенкой, которые являются ключевыми органами СМФ [70], [93], [94], [106]—[110]. Выявлено, что модифицирование поверхности, например, иммобилизация полиэтиленгликоля (ПЭГ) на поверхность наноматериалов, замедляет скорость выведения наноматериалов из крови, введенных внутривенно [69], [70]. Для большинства способов введения образцов, кроме внутривенного, большинство нанообъектов остается у входной точки в близлежащих тканях или местном дренирующем лимфатическом узле. После локального введения нанообъекты могут поступать в системный кровоток прямо или косвенно через лимфодренаж.

Распределение по органам наночастиц золота Au (размером приблизительно 1,4 нм) после интратрахеального введения происходит неравномерно с наибольшим накоплением в почках, по сравнению с печенью, при этом печень является доминантным органом-мишенью после внутривенного введения [122]. Соответственно, нанообъекты, высвобожденные из МИ, могут покрываться различными биомолекулами в зависимости от способа введения (например, внутривенные катетеры или интратрахеальная интубация). Исходя из существующих в научной литературе данных, можно предположить, что системный захват нанообъектов, введенных через кожу, имеет ряд ограничений [123]—[125]. Абсорбция наночастиц в дермальном слое кожи зависит от их свойств, анатомической структуры (толщины кожи) и целостности кожного барьера [125]. Механические движения и химические вещества могут улучшить абсорбцию нанообъектов. Если нанообъекты вводят в легкое, то распределение в легком будет зависеть от свойств нанообъектов, для которых размеры нанообъекта являются важным параметром. По данным исследований, при введении нанообъектов в носовую полость грызунов происходит перенос нанообъектов в мозг через сенсорные нервы [126]—[128].

Наноматериалы могут быть выявлены почти во всех типах органов и тканей, что осложняет прогнозирование органов-мишеней. Уровень наноматериалов, обнаруженных в различных органах, как правило, низок, что делает нахождение и количественное определение наноматериалов проблематичным.

**8.2.4 Доза**

Если введенные дозы образца превышают эффективность его выведения, происходит накопление нанообъекта в организме. Нанообъекты, осевшие в альвеолах, в основном фаготицируются альвеолярными макрофагами, которые, в итоге, переносятся в мукоцилиарный эскалатор и механически выводятся через дыхательные пути. Если доза превышает скорость выведения нанообъектов, происходит перегрузка/насыщение клиренса с изменением его кинетики [129]. Кровь, в основном, очищается от нанообъектов путем захвата фагоцитарных клеток в органах СМФ. При этом высокие или повторные дозы нанообъектов, введенные в кровоток, могут подавить фагоцитарные клетки в печени и селезенке. В данном случае частицы будут перераспределены в другие органы [130], [131]. Выявлено, что на токсикокинетику нанообъектов в кровотоке влияет временной интервал между введением доз [132].

**8.2.5 Вид и пол**

Физиология и анатомия различаются между видами и полами и, следовательно, недопустимо исключать, что это приводит к изменению токсикокинетики нанообъектов. Результаты исследования влияния гендерных различий на токсикокинетику показывают, что самки крыс более подвержены накоплению нанообъектов серебра и их производных в почках, чем самцы [133], [134]. Выявлены токси-

кокинетические различия между видами. При ингаляционном введении нанообъектов диоксида титана мышам, крысам и хомякам, нарушения выведения нанообъектов из легких наблюдали у мышей и крыс. В результате, накопление нанообъектов в легком мышей и крыс была выше, чем у хомяков [135]. При сравнении клиренса некоторых частиц в легких крыс и человека выявлена более высокая скорость выведения наночастиц для крыс, чем для человека [136]. Если орган-мишень для нанообъекта является одним и тем же, внутри органа его локализация может отличаться в зависимости от пола [137]. Вид и пол животных, которых используют для токсикокинетикки, влияют на результаты исследования системной токсичности. Необходимо рассмотреть координирование исследований токсикокинетики и системной токсичности при выборе вида и пола. В свете ограниченной информации по этой проблеме этот вопрос должен быть более изучен.

**8.2.6 Методы измерений**

Для количественного определения наличия наноматериалов в тканях и органах наноматериал или его составляющие должны быть отличимы от биологического фона. Для этого нанообъект должен быть помечен радиоактивными или флуоресцентными метками или определен по своему элементарному составу аналитическими методами, например ИСП-МС. Определение наноматериала по элементарному составу имеет недостаток в том, что он не несет информации о характере наноматериала (т. е., присутствует ли тот в качестве нанообъекта или разрушился до элементарной формы. Это ограничение может быть преодолено путем применения ИСП-МС одиночной частицы (spИСП-МС) [138]. spИСП-МС является относительно новым методом, который крайне полезен для характеристики и количественного определения наночастиц, так как способен предоставить информацию по элементарному химическому составу, размеру, распределению по размерам и концентрации наночастиц.

Метод spИСП-МС способен различать уровень риска изделий, которые содержат или выщелачивают нанообъекты, от уровня риска элементарных ионов, которые могут представлять разную степень токсичности.

Способы мечения также имеют недостатки. Например, метка может отделиться от нанообъекта и/или она может изменить взаимодействие нанообъекта с его средой, что, в свою очередь, повлияет на токсикокинетику. При выборе способа мечения, стабильность связи между меткой и нанообъектом должна быть рассмотрена вместе с его пределом детектирования. Способы мечения с низкой чувствительностью могут оказаться неспособными обнаруживать очень низкие уровни нанообъектов в тканях и органах без повторного введения меченого нанообъекта. Для некоторых аналитических методов (например, ИСП-МС) для повышения чувствительности может понадобиться дополнительное введение дозы тестируемых образцов. Если доза повышена или повторное дозирование используется для обеспечения обнаружения нанообъектов в ткани/органах, СМФ может стать перенасыщенной, что может привести к изменению токсикокинетического потенциала (см. 8.2.4).

## 9 Токсикологическая оценка

### 9.1 Общие положения

Физико-химические свойства (например, механические, химические, магнитные, оптические или электрические) наноматериалов отличаются от аналогичных свойств макроматериалов, поэтому наноматериалы по-другому влияют на биологические реакции, происходящие на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях (например, гены и белки), включая клеточный захват. В результате воздействия наноматериалов можно ожидать токсикологический ответ, отличный от ответа, индуцированного традиционными материалами.

Нанообъекты могут мигрировать по организму и быть захваченными тканями, находящимися ниже по потоку от места введения (см. раздел 8). Нанообъекты могут проходить через клеточную мембрану и проникать в ядра и митохондрии клеток, оказывая влияние на функции клеток, в том числе, останавливая синтез ДНК [139].

При контакте с биологической средой нанообъекты взаимодействуют с белками на количественном и качественном уровнях. Данное взаимодействие обусловлено особенностями характеристик физиологической среды (например, крови, плазмы, цитоплазмы и т. д.) и наноматериалов. Аналогично нанообъекты будут взаимодействовать с испытательной средой и/или влиять на нее в зависимости от своих свойств и условий введения, т. е. могут продемонстрировать свойства, отличающиеся от свойств аналогичных макроматериалов. Следовательно, необходимо конкретно валидировать любой метод исследования, предназначенный для оценки биологического действия нанообъектов. При этом опреде-

ление длительности воздействия будет зависеть от времени и места контакта. Кроме того, на выбор конкретного метода могут также влиять свойства наноматериала, так как они могут препятствовать получению достоверных результатов тем или иным методом исследования.

Выявлены несколько известных ошибок в исследовании токсичности наноматериалов, которых следует избегать (см. 9.2 по 9.8 для конкретных исследований). С целью предотвращения ошибок при исследовании токсичности наноматериалов следует учитывать информацию о последних достижениях в этой области.

Ожидаемое биологическое действие наноматериала/нанообъекта не зависит напрямую от концентрации или числа молекул, а обусловлено свойствами самого наноматериала/нанообъекта. Поэтому при исследовании отношения «доза—ответ» доза наноматериала может быть определена в единицах массовой, счетной или объемной концентрации нанообъектов.

Протокол должен содержать подробное описание характеристик наноматериала/нанообъекта и условий исследований, включая следующую информацию:

- описание не менее трех характеристик нанообъекта (массу, число частиц и площадь поверхности) для обеспечения перехода с одной единицы измерений дозы на другую или вычисления дозы разной размерностью (ISO/TR 13121);
- суспензия/модельные среды;
- описание испытательной среды (например, % сыворотки);
- характеристики среды (pH, соль, поверхностно-активное вещество и т. д.);
- перечень всех добавок к испытательной среде и их влияние на нанообъекты, такие как дисперсность, агрегация и т. д.;
- характеристику высвобождение ионов в конкретной среде;
- состояние суспензии в модельной/суспензии и испытательной среде;
- материал емкости.

Разработаны альтернативные методы исследования для замены, уменьшения количества и улучшения достоверности исследований на животных *in vivo*. Данные методы, если они валидированы, следует применять для токсикологической оценки наноматериалов и нанообъектов, высвобождаемых из МИ.

В ISO/TR 16197 установлены методы токсикологического скрининга для промышленных наноматериалов.

### 9.2 Исследование цитотоксичности *in vitro*

#### 9.2.1 Общие положения

Цитотоксичность — нарушение клеточных функций, включая повреждение целостности плазматической мембраны, нарушение функций органелл, повреждение цитоскелета и др. Степень цитотоксичности зависит от концентрации агентов. Оценка цитотоксичности наноматериалов, входящих в состав МИ, включает в себя инкубацию культивированных клеток с изделием и/или экстрактами изделия, или непосредственно (прямой контакт), или через диффузию экстрагирующих веществ (косвенный контакт). Исследования *in vitro* проводят с целью определения биологического ответа клеток млекопитающих и потенциальных цитотоксичных действий МИ и материалов, входящих в их состав. Цитотоксичность нанообъектов может зависеть от чувствительности клеток к токсическому агенту, наличия конкретных рецепторов или механизмов клеточного захвата. При оценке цитотоксичности наноматериала следует уделять особое внимание выбору методов *in vitro*. В дополнение к выбору подходящей модели культуры клеток, следует учитывать специфичные свойства нанообъектов.

В ISO 10993-5 установлены стандартизованные методы оценки цитотоксичности МИ *in vitro*. К ним относят такие методы, как поглощение клетками нейтрального красного, формирование колоний, МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид] и ХТТ {2,3-бис[2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил]-5-[(фениламино) карбонил] -2Н-гидроксид тетразолия} методы, которые в качестве индикаторов цитотоксичности оценивают:

- захват клетками;
- клеточный лизис;
- ингибирование клеточного роста;
- формирование клеточных колоний;
- метаболическая активность;
- другие воздействия на клетки (например, морфология, повреждения мембраны и т. д.).

Данные методы исследования МИ, изготовленных из традиционных материалов, допускается использовать для исследования наноматериалов с учетом их физико-химических свойств. Предложен ряд стратегий для исследований *in vitro* [140], включая оценку существующих данных на предмет применимости методов к ожидаемому характеру биологического действия нанообъектов [141].

При исследованиях *in vitro* нанообъекты, как правило, захватываются клетками. Попав внутрь клетки, нанообъекты могут взаимодействовать с биологическими компонентами и нарушать клеточные функции. Внутриклеточная локализация нанообъектов внутри клетки будет зависеть от их физико-химических свойств, размера и дозы. *In vivo* нанообъекты имеют тенденцию оказываться, в основном, в клетках СМФ, поэтому следует проводить исследование цитотоксичности *in vitro* на фагоцитарных (например, макрофаги мыши RAW264,7, клетки человека THP-1 как дифференцированные макрофаги) и нефагоцитарных клеточных линиях (например, фибробласт мыши 3T3, фибробласты мыши L929, кератиноциты человека HaCaT) (ISO 10993-5, ISO 19007, приложение А).

Одним из механизмов клеточной токсичности является оксидативный стресс [142], [143], запускающий активацию сигнальных путей, чувствительных к редокс-потенциалу, который в итоге, определяет выработку цитокинов и хемокинов, участвующих в провоспалительных реакциях. В случаях, когда цитотоксичность наноматериалов связана с индуцированием активных форм кислорода (АФК), нанообъектам необязательно проникать в клетки. Сходная ситуация может складываться для наноматериалов, таких как нанообъекты ZnO и Ag, индуцирующих цитотоксичность через высвобождение ионов.

Некоторые параметры при исследовании цитотоксичности *in vitro* считаются критическими. Примеры приведены ниже.

**9.2.2 Влияние наноматериала на выбор метода исследования**

Выявлены несколько известных ошибок, которые необходимо учитывать при оценке токсичности наноматериалов. При оценке цитотоксичности наноматериалов *in vitro* возможно большое разнообразие влияния свойств наноматериала на выбор метода исследования [150]. Из-за электрических зарядов и оптических свойств наноматериалы могут потенциально делать невозможным использование методов, применяющих колориметрические пробы и/или флуоресцентные агенты. Взаимодействие с питательными веществами культуральных сред, например адсорбция, может быть причиной ложно-позитивных результатов теста на цитотоксичность.

Выявлено, что нанообъекты взаимодействуют с красителями, используемыми в тестах, например MTT, XTT, лактатдегидрогеназа (LDH) и дихлорфлуоресцин (DCF) [151]—[154]. Некоторые нанообъекты сами могут диспергировать/абсорбировать свет и, таким образом, препятствовать измерениям в колориметрических пробах. Данные аспекты следует учитывать при использовании колориметрических методов. В дополнение к прямому влиянию нанообъекты могут непосредственно связываться/адсорбироваться к биологическим медиаторам, что оказывает влияние на результаты исследований [150], [152], [153], [157]—[159]. Введение необходимых контролей и удаление нанообъектов центрифугированием перед проведением анализа может сократить разброс результатов, полученных для тестируемого нанообъекта [155], [156]. Для обоснования интерпретации результатов испытаний может потребоваться их подтверждение различными методами.

**9.2.3 Необходимая доза и ее размерность**

При использовании методов *in vitro* важно, чтобы при оценке цитотоксичности дозы исследуемых нанообъектов находились в широком диапазоне значений (ISO 19007). Кроме того, важно знать о существовании различных размерностей дозы и использовать подходящую величину дозы для выражения любого соотношения «доза—ответ». Определение соответствующей размерности дозы нанообъектов представляет собой проблемный вопрос при оценке цитотоксичности на клеточных культурах. Такие величины, как масса, площадь поверхности и число наночастиц были предложены в качестве важной характеристики дозы и рассматриваются на уровне ОЭСР [72], [144]—[146].

**9.2.4 Характер кинетики нанообъекта**

В клеточных культурах *in vitro* растворенные вещества достигают клетки посредством диффузии, при этом нанообъекты могут входить в контакт с клетками путем седиментации [агрегированные наночастицы] и через диффузию (одиночные частицы). Выявлено, что эти процессы преимущественно зависят от размеров объекта [147]. На агрегацию также влияют состав культуральной среды и условия проведения исследования, физико-химические свойства нанообъектов, влияющие на их взаимодействие с окружающей средой [148].

Размер и плотность наночастиц в клеточной культуре являются функцией их состояния агломерации/агрегации, плотности упаковки и формы. Данные свойства оказывают воздействие на скорость доставки нанообъекта к клеткам в культуре путем диффузии и гравитационного осаждения [148]. Выяв-

лено, что состояние агломерации влияет на опосредованные оксидативным стрессом профили «доза—ответ» *in vitro*.

Нанообъекты, благодаря своей небольшой массе, могут долго оставаться в суспензии из-за относительно низкой скорости седиментации [72]. Это ограничивает их контакт с клетками и дозу доставленных нанообъектов в культуру, где клетки адгезированы к нижней поверхности культуральных чашек. Следовательно, необходимо учитывать специфическую кинетику нанообъектов в растворе, которая зависит от плотности и вязкости среды, размера частиц, формы, заряда и плотности и т. д.

В зависимости от этих факторов нанообъекты могут затем диффундировать, оседать или накапливаться, что влияет на степень их контакта с клетками и транспорт в клетки [72]. В зависимости от использованной системы/модели культуры клеток, номинальная и эффективная величина дозы нанообъектов в разных единицах (т. е. масса, число или площадь поверхности частиц, воздействующих на клетки) могут значительно различаться, что ведет к отличиям между полученным эффектом и реальным эффектом нанообъектов [149]. Данная проблема может быть решена методом компьютерного моделирования, например с помощью математических моделей седиментации, диффузии и дозиметрии *in vitro* (ISDD) и многовариантной дозиметрии частиц (MPPD) для нахождения диапазонов доз для осевших наночастиц.

### 9.3 Генотоксичность, канцерогенность и репродуктивная токсичность

#### 9.3.1 Общие положения

В ISO 10993-3 установлены требования к определению биологической безопасности и методы исследований МИ для следующих биологических эффектов: генотоксичность, канцерогенность, репродуктивная и пренатальная токсичность. ISO 10993-3 применим для оценки биологического действия МИ или его компонентов, потенциал которого к генотоксичности, канцерогенности или репродуктивной токсичности определен или неизвестен. Наноматериал может иметь другие виды генотоксичности, канцерогенности или репродуктивной токсичности по сравнению с соответствующим макроматериалом. Существует два основных типа генотоксического повреждения, которые следует оценить: мутагенный и кластогенный.

Выявлены конкретные пути исследования генотоксичности наноматериалов [160]. Известны и противоречивые результаты при определении генотоксичности наноматериалов. Генотоксические эффекты наночастиц необходимо исследовать индивидуально в каждом конкретном случае. Если по результатам одних исследований выявлена положительная генотоксичность наночастиц, а по результатам других исследований — отрицательная, то при оценке риска наночастицы следует рассматривать как потенциально генотоксичные. Некоторые отрицательные результаты недостоверны, так как не было показано воздействие нанообъектов на ДНК (например, отрицательный тест Эймса).

Некоторые нанообъекты могут проходить через клеточную мембрану, проникать в ядро и взаимодействовать с ядерным ДНК и белками. Прямой контакт между нанообъектами может происходить во время деления клеток, во время которого исчезает ядерная оболочка. Металлические нанообъекты представляют интерес с точки зрения генотоксичности и канцерогенности из-за их реакционной активности. Выявлена генотоксичность наночастиц некоторых металлов, например наночастиц серебра [157], [161]—[163], золота [164], [165] и никеля [139], [166]—[168]. Выявлены и отрицательные результаты генотоксичности частиц металлов [167]—[169], [182]. При экспериментальных исследованиях на крысах выявлено развитие рабдомиосаркомы после внутримышечной имплантации наночастиц и микрочастиц никеля [170].

Нанообъекты могут генерировать свободные радикалы с последующим их взаимодействием с компонентами клеток, что может индуцировать повреждения ДНК или влиять на расщепление хромосом во время митоза и приводить к пертурбации деления клеток и сбоя в трафике клеток. Установлено, что ОУНТ могут смягчить повреждение ДНК, индуцированного ультразвуковой обработкой [172].

Следует учитывать, что генотоксический эффект наноматериалов может быть результатом косвенных механизмов, включая прооксидативные эффекты или ингибирование репарации ДНК.

Выявлено, что оксидативный стресс с последующим воспалительным ответом и абнормальным клеточным апоптозом являются одними из негенотоксических эффектов, которые могут быть вызваны нанообъектами [139]. Данные процессы могут предрасположить клетки к карценогенному результату. Исследования клеточных ответов в моделях *in vitro* и *in vivo* могут быть проведены в качестве индикаторов, определяющих потенциал нанообъектов индуцировать косвенное повреждение ДНК [139]. Выявлено, что наличие дифференцированных ответов двуокиси титана ($TiO_2$), кристаллизованного в форме анатаза и рутила, связано с выработкой активных форм кислорода (АФК) [173]. В качестве результата

сравнения выбрана генерация АФК в эпителии человека и клетках фибробластов легкого. Из полученных результатов [174] выявлено, что существует разница в реакционной способности различных частиц двуокиси титана ($TiO_2$) в зависимости от кристаллической структуры (анатаза или рутила) по сравнению с некристаллическими частицами двуокиси титана ($TiO_2$) размерами более 10 мкм [174].

Выявлено, что наночастицы цинка, серебра и алюминия демонстрируют сходную токсичность в альвеолярных клетках человека [171]. Выявлена связь между ингаляционным введением металлических наночастиц и возникновением лимфомы Ходжкина [139]. За исключением индукции опухолей хроническим воспалением и перегрузкой легких (см. 9.3.4), обнаружены данные по канцерогенезу, вызванному наночастицами.

Требуется тщательно анализировать отрицательный результат теста на генотоксичность. Для исключения прямого генотоксического эффекта важным аспектом является потенциальное воздействие на компартмент клетки-мишени (ядро) в тестах *in vitro* и/или ткань при исследованиях *in vivo*. За генотоксичность могут быть ответственны косвенные эффекты (например, в результате индукции АФК).

**9.3.2 Исследования генотоксичности *in vitro***

Метод обратных мутаций у бактерий (см. ISO 10993-3), применяемый в тесте на генотоксичность, может не подходить для исследования мутагенности нанообъектов из-за неопределенности механизма захвата нанообъектов клетками, и, таким образом, неопределенности в отношении воздействия на ДНК [57], [58], [175]. Выявлено, что некоторые нанообъекты проникают в *Salmonella typhimurium*, клеточную культуру, используемую в методе обратных мутаций Эймса [176]. Слабые генные мутации в штаммах сальмонеллы TA102, TA104 и YG3003 вызваны С60 в поливинилпирролидонеоблученном видимым светом [177]. Проблематичной в тестах бактериальной мутации является интерпретация (и заключение) при получении отрицательных результатов.

Для исследований генотоксичности нанообъектов используют клеточные культуры млекопитающих из-за их способности к захвату нанообъектов. Следующие методы применяют для оценки генотоксичности наноматериалов *in vitro*:

- исследование генной мутации *in vitro* в клетках млекопитающих (проба *tk* лимфомы мыши, MLA); или проба мутации гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (ГГФТ). MLA имеет способность к обнаружению как генных мутаций, так и хромосомных повреждений (формирование больших и малых колоний);
- микроядерная проба *in vitro* для обнаружения цитогенетических повреждений в связке с пробой генной мутации (например, HPRT) или проба лимфомы мыши, обнаруживающая маломасштабные изменения секвенций (точечные мутации);
- кометная проба (анализ единичной клетки методом гель-электрофореза) для обнаружения различных видов повреждений ДНК (например, одинарных и двойных разрывов нитей ДНК, оксидированных баз и перекрестных связей ДНК), в зависимости от условий пробы, например двойные разрывы нитей являются нейтральной пробой; одинарные разрывы нитей — щелочной пробой; степень оксидативного повреждения зависит от добавления ферментов.

При исследовании генотоксичности *in vitro* могут возникнуть сходные ошибки (см. 9.2). Дополнительно существуют для анализа и особые вопросы.

Увеличение метаболических фракций печени S9 зависит от основного материала, покрытия и других добавок, присутствующих в наноматериале. Неорганические наночастицы могут не подвергаться метаболической активации, материалы другой природы, возможно, могут. Для тестирования некоторых неорганических нанообъектов (например, нанообъектов оксида металла), может не иметь смысла добавлять метаболические фракции печени S9 к пробам *in vitro*, потому что химические компоненты нанообъекта могут быть не метаболизированы. Тем не менее, с наноматериалами, которые содержат органические компоненты или химические соединения (например, наноматериалы на основе полимеров углерода) могут произойти метаболические трансформации. Кроме того, при наличии S9 или других белков, например в сыворотке, на поверхности нанообъектов будет образовываться белковое покрытие, что будет влиять на их клеточное поглощение и реакционную активность. Следовательно, в каждом конкретном случае необходимо оценить целесообразность добавления метаболической фракции печени S9.

Микроядерный тест может быть использован для исследования наноматериалов. В случае использования цитохалазина В (cyt-B) для определения разделившихся клеток необходимо убедиться в отсутствии влияния cyt-B на эндоцитоз и/или экзоцитоз наноматериалов или использовать последовательный вариант теста, когда cyt-B добавляется после времени инкубации и потенциального поглощения. Выявлено, что cyt-B может влиять на поглощение нанообъектов клетками [178], [179].

**9.3.3 Исследования генотоксичности *in vivo***

Если требуется проведение исследований *in vivo*, то применяют метод, в котором исследуемый нанообъект гарантированно достигает органа-мишени. Если это невозможно, то необходимо проведение второго исследования *in vivo* для другого органа-мишени, для которого может быть продемонстрировано наличие процесса клеточного поглощения нанообъектов для подтверждения отсутствия генотоксичности. Исследования острой и/или субхронической токсичности *in vivo* могут быть использованы для определения распределения нанообъектов в тканях и органах. Информация о том, что исследуемый орган имеет отношение к распределению и накоплению нанообъектов, может служить руководством при выборе метода исследования генотоксичности *in vivo*. «Подводным камнем» теста на генотоксичность *in vivo* может быть то, что исследуемый орган-мишень не подвергается воздействию нанообъектов. Существует мнение о целесообразности объединения проведения тестов на генотоксичность с другими тестами *in vivo* [180], [181].

Для каждого протокола исследования необходимо учитывать способ введения нанообъекта для предполагаемой популяции человека. Должно быть доказано воздействие нанообъекта на органы-мишени. Результаты исследований токсикокинетики могут быть использованы для доказательства наличия воздействия на органы.

Следующие методы применяют для оценки генотоксичности *in vivo*.

- микроядерный тест на эритроцитах или костном мозге грызунов;
- хромосомный анализ костного мозга грызунов;
- анализ разрыва нитей ДНК (кометная проба *in vivo*).

В протоколе исследований фиксируют сведения о применяемой тест-системе и приводят обоснование ее выбора.

Если применены другие тест-системы *in vivo* для получения дополнительной информации по генотоксичности наноматериала, то в протоколе исследований фиксируют сведения о данной тест-системе и приводят обоснование ее выбора.

При оценке генотоксичности *in vivo*, например гелиевая проба единичной клетки (кометная проба), рекомендуется определять органы-мишени, основываясь на результатах токсикокинетиких и/или субхронических тестов *in vivo*.

Разработаны несколько моделей на трансгенных животных для определения повреждения ДНК нанообъектами *in vivo* (OECD TG 488, 2013). Одной из этих моделей является трансгенная модель мыши Lac-Z, которая была использована для оценки генотоксичности нанообъектов $TiO_2$ *in vivo* [182]. Модель состоит из мышей C57Bl/6 с введеным плазмидом pUR288 (содержащий ген-репортер LacZ), вставленным гомозиготно в последовательности голова-хвост на обеих хромосомах 3 и 4 [182], [183]. Эта модель мыши позволяет оценить мутагенность в нескольких органах, что делает ее ценной моделью *in vivo* для исследования генотоксических эффектов и механизмов восстановления после воздействия химических агентов.

Другими трансгенными моделями, приведенными в OECD TG 488, для которых существует достаточно данных для их применения в TG 488, являются: lacZ бактериофаг мыши (Muta™Mouse[2)]); lacZ плазмид мыши; gpt дельта (gpt и Spi−) мыши и крысы; lacI мыши и крысы (BigBlue®[3)]). Метод позитивной селекции cII может быть использован для оценки мутаций на моделях BigBlue® и Muta™Mouse. Мутагенез в трансгенных моделях грызунов, как правило, оценивается как частота мутантов; тем не менее, если требуется, дополнительную информацию может дать молекулярный анализ мутаций (OECD 488).

**9.3.4 Канцерогенность**

Геном человека постоянно подвергается воздействию агентов, повреждающих ДНК, например активные формы кислорода, ультрафиолет и генотоксичные химические вещества [184]. По данным исследований *in vitro* и *in vivo* выявлено, что наноматериалы индуцируют повреждения ДНК и мутацию. Выявлена связь между генотоксичностью и раком. Данные результаты следует учитывать при прогнозировании канцерогенности наноматериалов [185]. Хроническое воспаление, как предполагается для стержнеподобных нанообъектов [192], [193], может играть ключевую роль, так как способно привести

---

[2)] Muta™Mouse является торговой маркой HRP Inc. Данная информация приведена для удобства пользования настоящим стандартов и не является поддержкой ISO указанного продукта. Допускается использовать эквивалентные продукты, если подтверждено, что при их применении получены такие же результаты.

[3)] BigBlue® является торговой маркой Stratagene. Данная информация приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не является поддержкой ISO указанного продукта. Допускается использовать эквивалентные продукты, если подтверждено, что при их применении получены такие же результаты.

к повышенным уровням оксидантов. Хотя существует значительное количество информации, касающейся генотоксичности (см. 9.3.1), включая противоречивые результаты для многих наноматериалов, знание механизма канцерогенности наноматериалов достаточно ограничены.

Генотоксичность и хроническое воспаление могут привести к канцерогенности. Биоперсистенция (биологическая стойкость) и индукция хронического воспаления индуцируют опухоли в легком [186], [187]. Данные эффекты могут быть вызваны «перегрузочным» дозированием нанообъектами [188]—[191]. Биоперсистенцию нанообъектов, в основном, определяют химическим составом, размером и формой нанообъектов (например, волокон). Некоторые наноматериалы, например наночастицы $TiO_2$ и УНТ, могут вызывать развитие опухолей в моделях на животных [193]. Возможные механизмы включают в себя процессы повреждения ДНК и образования АФК в течение воспаления.

Если воздействие нанообъектов на человека является сильным или хроническим, то проводят оценку канцерогенного риска. Исследования *in vivo* для оценки канцерогенного потенциала химических веществ приведены в ЕС B.32 и OECD 451, комбинированное исследование хронической токсичности/канцерогенности приведены в ЕС B.33 и OECD 453. Требования к проведению исследований канцерогенности для МИ установлены в ISO 10993-3. В качестве краткосрочного альтернативного теста вместо двухлетнего исследования канцерогенности допускается использовать трансгенных животных, например модель мыши rasH2 [194], [195].

Тем не менее, необходимо отметить, что адекватность применения таких тестов следует оценивать в каждом индивидуальном случае, так как возможность их использования не была обоснована для нанообъектов.

**9.3.5 Репродуктивная токсичность**

Данные по репродуктивной токсичности наноматериалов недостаточны, при этом существует повышенный интерес к изучению их потенциального действия на репродуктивный механизм, половые клетки, эмбриональное развитие и потомство. Наночастицы могут проникать сквозь биологические барьеры. При пересечении барьеров репродуктивной системы (например, барьера кровь-семенники и плацентарный барьер) наночастицы могут оказывать влияние на жизнеспособность и функцию спермы, развитие эмбриона. Некоторые нанообъекты могут пересекать биологический барьер репродуктивных тканей, например барьер кровь-семенники или плацентарный барьер, в зависимости от их вида и условий/моделей исследования [196]. По результатам исследований выявлено, что наночастицы могут перемещаться из дыхательных путей в плаценту или плод, при этом негативные эффекты могут возникать вторично из-за воспалительной реакции матери [197]. Повреждение генетического материала, обусловленное взаимодействием нанообъектов с молекулами ДНК, может привести к мутациям и повлиять на воспроизводство и развитие следующих поколений.

Заключение о необходимости проведения исследования репродуктивной генотоксичности может быть сделано на основе длительности воздействия и назначения МИ, включенного в оценку риска. При необходимости, анализ репродуктивной токсичности используемых наноматериалов проводят в соответствии с требованиями ISO 10993-3 на основе оценки риска МИ.

Если достоверные и адекватные результаты свидетельствуют, что наноматериал или его метаболиты не достигают органов репродуктивной системы, то исследование репродуктивной токсичности не проводят. Данные результаты могут быть основаны на данных исследований абсорбции, распределения, метаболизма и экскреции (АРМЭ).

При отсутствии доказательств, исключающих контакт нанообъектов с органами репродуктивной системы, рекомендуется проведение исследования их репродуктивной токсичности в следующих случаях:

a) МИ длительного или постоянного контакта, которые наиболее вероятно войдут в прямой контакт с репродуктивными тканями, эмбрионами или плодом;

b) МИ для депонирования энергии;

c) абсорбируемые или содержащие выщелачиваемые наноматериалы/наночастицы, для которых не было доказано полное высвобождение.

Не рекомендуется применение некоторых способов введения нанообъектов в организм лабораторного животного, так как они могут повлиять на пренатальное развитие. Например, интраперитонеальное введение может привести к прямой инъекции нанообъектов в саму матку или пересечь стенку матки и напрямую повлиять на развивающиеся эмбрионы/плод. Также, ингаляционное воздействие «только через нос» может быть не подходящим для беременных самок, так как животные содержатся при стрессовых условиях и не имеют доступа к еде и воде [59].

В дополнение к ISO 10993-3, OECD 421 может использоваться для сбора исходной информации о возможных репродуктивных токсических эффектах наноматериалов. Результаты испытаний также могут быть применены для первоначальной оценки опасности и могут быть полезны в процессе принятия решения о необходимости дальнейших исследований. Если, с учетом результатов скринингового исследования, дополнительные исследования считаются необходимыми, то они должны проводиться в соответствии с OECD 414, OECD 415, OECD 416 или OECD 422, в зависимости от обстоятельств.

### 9.4 Иммунотоксичность, раздражение и сенсибилизация

#### 9.4.1 Общие положения

В ISO/TS 10993-20 приведены сведения о иммунотоксикологии с указанием потенциальной иммунотоксичности МИ.

В ISO 10993-10 установлена процедура оценки биологического действия МИ и входящих в их состав материалов, вызывающих раздражение и сенсибилизацию кожи. Данный стандарт включает в себя следующее:

- предварительные тесты на раздражение, в том числе виртуальные методы и методы *in vitro* для воздействия на кожу;
- описание процедур исследований *in vivo* (раздражение и сенсибилизация);
- рекомендации по интерпретации результатов.

Воспаление и аллергические/аутоиммунные реакции могут возникать в результате воздействия нанообъектов на иммунную систему. Степень и тип реакций зависят от антигенных характеристик нанообъектов, их адъювантного потенциала, воспалительного действия и их способности активировать систему комплемента. Иммунный ответ затем может быть стимулирован или подавлен.

#### 9.4.2 Иммунотоксичность

Большинство исследованных наноматериалов составляют нанообъекты, которые, войдя в системный кровоток, оказываются в клетках СМФ (например, макрофагах, дендритных клетках или клетках Лангерганса), которые играют центральную роль в иммунной системе. Следовательно, потенциальная иммунотоксичность наноматериалов требует особого рассмотрения. В целом, иммунотоксичность оценивают как токсичность повторной дозы (например, на 28 или 90 сут), во время которой могут быть обнаружены первые признаки иммуносупрессии и/или иммуностимуляции. Общие положения тестов на иммунотоксичность МИ приведены в ISO/TS 10993-20. Для МИ исследования иммунотоксичности, как правило, включают длительные исследования при имплантации МИ (ISO 10993-6 и ISO 10993-11). Для нанообъектов необходимо рассмотреть альтернативные пути воздействия, такие как внутривенное введение для системного воздействия, например для наночастиц серебра [198].

Из-за сложности иммунной системы рекомендуется применять модели *in vitro,* так как они предоставляют надежный и предпочитаемый метод изучения функции иммунных клеток. Влияние наноматериалов на функцию иммунных клеток может быть изучено путем оценки сигнальных путей, таких как путь ядерного фактора каппа В, в конкретных иммунных клеточных линиях [199], [200]. Лабораторией нанотехнологических характеристик Национального института рака опубликованы сообщения о нескольких тестах на иммунотоксичность *in vitro,* конкретно для исследований наночастиц и их действия на иммунные клетки (gost.e-ecolog.ru). Эти методы предназначены для оценки таких параметров как фагоцитоз, хемотаксис и выработка окиси азота макрофагами в дополнение ко многим другим результатам.

Выявлено влияние наноматериалов на иммунную систему [82], [207]—[209]. Нанообъекты использовались как гаптены или носители гаптенов, т. е. они способны проявлять адъювантную активность, влияющую на иммунную систему [201]—[204]. Для наночастиц серебра воздействие на иммунную систему оказалось наиболее чувствительным параметром общей (системной) токсичности после внутривенного введения в течение 28 сут [198], [205].

Сведения о моделях на животных, используемых для оценки иммунотоксичности химических веществ, приведены в [206]. ВОЗ опубликованы три документа критериев качества окружающей среды (EHC) в рамках Международной программы по химической безопасности (ICPS) по иммунотоксичности (EHC 180), сенсибилизации (EHC 212) и аутоиммунного ответа (EHC 236).

#### 9.4.3 Сенсибилизация

Нанообъекты и наноматериалы могут проявлять сенсибилизирующее действие; при этом потенциал их сенсибилизирующего действия мало изучен. Взаимодействие нанообъектов с белками ведет к формированию комплексов нанообъектов/белков, что, как вторичный эффект, может привести к сенсибилизации [210]. Дополнительно может понадобиться исследование возможных иммунных реакций

против белка как части комплекса нанообъектов/белков (см. 8.2.2 о формировании белковой «короны»).

Выявленным единственным типом реакции (гипер) чувствительности для нанообъектов является псевдоаллергия, обусловленная активацией комплемента (CARPA, см. 9.5.2).

По данным исследований у наночастиц отсутствует способность к сенсибилизации [211]—[217]. Методы, установленные в ISO 10993-10, включают тест Бюлера (BT), тест максимизации на морских свинках (GPMT), тест регионарных лимфоузлов (LLNA), аппликационную пробу на человеке (HPT) и модифицированную GPMT (GPMT с нанесением на кожу). Данными методами исследованы наночастицы золота (размерами 150 нм), серебра (размерами 10 нм), оксида цинка (размерами 20 нм), диоксида титания (размерами от 20 до 100 нм), полистирольные латексные шарики (размерами 50 нм), фуллерены С60 (размерами 1 нм), диоксида кремния (размерами от 7 до 10 нм) и УНТ (размерами от 1.8 до 60 нм).

Исследования сенсибилизации BT, LLNA, HPT и модифицированным тестом GPMT могут быть не эффективными для многих наноматериалов из-за барьерной функции кожи [218]. Например, нанообъекты могут не достигать клетки-мишени и органы-мишени для сенсибилизации, дендритные клетки в коже и дренирующем лимфоузле. Следовательно, отрицательный результат может не означать, что наноматериалы не проявляют сенсибилизирующее действие; так как отрицательный результат может быть следствием неспособности нанообъектов проникнуть через поверхность кожи. В модифицированном тесте GPMT исследуемые вещества не вводят параллельно с полным адъювантом Фрейнда (FCA), а наносят наружно на место (воспаления), в которое введен FCA [58], [219]. Для конкретного наноматериала должен быть разработан соответствующий тест на сенсибилизацию.

Разработаны несколько методов на сенсибилизацию *in vitro*. Наиболее широко исследованными являются прямой анализ пептидной реактивности (DPRA), исследование активации линии клеток человека (h-CLAT), KeratinoSens[4)] и SenCeeTox[5)]. В настоящее время неясно, способны ли эти тесты *in vitro* оценить потенциал к сенсибилизации технических наноматериалов.

**9.4.4 Раздражение**

В соответствии с ISO 10993-1 тесты на раздражение (включая внутрикожную реакцию) должны быть рассмотрены для оценки свойств МИ, материалов и/или их экстрактов вызывать раздражение, используя соответствующее место для нанесения, такое как кожа, глаз и слизистая оболочка в подходящей модели. Это требование также применимо к наноматериалам. Проводимые исследования должны соответствовать способам введения (кожа, глаз, слизистая) и длительности экспозиции/воздействия) согласно ISO 10993-10.

К свойствам нанообъектов, которые могут повлиять на их клеточное поглощение/захват после воздействия на кожу, глаза или слизистую, относят (но не ограничиваются таковыми): размеры, форму, площадь поверхности, поверхностный заряд, поверхностную энергию/активность, растворимость, состояние агрегации, полидисперсность и кинетику растворения ионов [218]. Более крупные нанообъекты менее вероятно проникают через кожу, в то время как их более мелкие аналоги могут достигнуть глубокий эпидермис, дерму и нижние слои клеток [96], [220], [221]. Дополнительно также необходимо рассмотреть эффективный размер (т. е. гидродинамический радиус) функционализированных нанообъектов, так как он будет определять их взаимодействия с кератиноцитами, которые могут повлиять на диффузию нанообъектов после их введения. Размеры и форма нанообъектов могут влиять на проникновение через кожу, при этом для сферических нанообъектов свойственны более высокие значения диффузии по сравнению с удлиненными нанообъектами [222].

Химический состав исходного наноматериала может влиять на потенциальное раздражение, вызванное наноматериалами. Выявлено, что нанообъекты Au проникают в более глубокие слои кожи, в то время как наночастицы Ag [223] и $TiO_2$ остаются в роговом слое [224]. Выявлено, что некоторые нанообъекты (например, дендримеры на основе углерода) способны в определенной степени проникать через кожу [225]. Тем не менее, было обнаружено, что ОУНТ в минимальной степени раздражают кожу и глаза при испытаниях *in vivo*, согласно OECD TG 404 и OECD TG 405 соответственно [216].

Состав поверхности нанообъекта также важен для возможной его диффузии через кожу. Выявлено, что поверхностный заряд влияет на проникновение квантовых точек и высвобождение цитоки-

---

[4)] KeratinoSens является торговой маркой Cyprotex. Данная информация приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не является поддержкой ISO указанного продукта. Допускается использовать эквивалентные продукты, если подтверждено, что при их применении получены такие же результаты.

[5)] SenCeeTox является торговой маркой Cyprotex. Данная информация приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не является поддержкой ISO указанного продукта. Допускается использовать эквивалентные продукты, если подтверждено, что при их применении получены такие же результаты.

нов [226]. В частности, функционализация или дериватизация покрытия нанообъекта может являться причиной токсичности с большей вероятностью, чем сам нанообъект [173], [227]. Следовательно, необходимо тщательно планировать как методы исследования, так и интерпретировать полученные результаты.

Выявлено, что неповрежденная и имеющая загар кожа является барьером для проникновения нанообъектов, при этом их диффузия в кожу не происходит [228]—[233]. Волосяные фолликулы, потовые железы и участки кожи, поврежденные в результате механической травмы (например, порезы, царапины), дерматологического состояния (например, дерматит, псориаз, экзема), патологических состояний (например, инфекция, воспаление) и фотоповреждения (например, солнечный ожог), могут содействовать проникновению наноматериала в организм через кожу. Применение некоторых косметических средств может увеличить риск проникновения нанообъектов через кожу [234].

Для материалов или изделий, контактирующих с пациентом не через неповрежденную кожу, необходимо провести исследование внутрикожной реакционной способности для оценки локальной реакции ткани на наноматериалы. Это исследование может быть применимо в тех случаях, когда тест на раздражение кожи или слизистой не применимым (например, когда МИ имплантированы или контактируют с кровью). При внутрикожном введении нанообъекты минуют роговой слой и, таким образом, нанообъекты могут иметь более высокую способность раздражать фибробласты, нежели кожу [235]—[238]. Этот способ введения также может быть эффективным для гидрофобных наноматериалов (см. ISO 10993-10). Для других клинических путей воздействия нанообъектов раздражение может быть оценено путем местного применения наноматериалов. В ISO 10993-10 тесты на раздражения слизистой приведены в приложении В как специфические тесты. Выбор методов должен быть обоснован исходя из конкретных условий применения и локализации в организме материалов и МИ. При испытании нескольких нанообъектов выявлено, что тест раздражения глаза сопоставим или более чувствителен, чем тест кожного раздражения при выявлении потенциально возможных отрицательных эффектов, вызванных этими материалами [216], [239]. Существует мало информации в опубликованной литературе по использованию других методов раздражения слизистой при тестировании нанообъектов.

Были предприняты различные попытки для оценки и валидации моделей раздражения кожи *in vitro* в качестве альтернативных методов для исследования наноматериалов. Тем не менее, необходимо рассмотреть многие вопросы при выборе моделей и плана исследования. В то время как в некоторых исследованиях были получены эквивалентные результаты *in vitro* и в моделях раздражения кожи, в других сообщалось о возможных артефактах, вызванных взаимодействием нанообъектов с тестовыми реагентами или интерлейкинами. Известно незначительное число исследований, сравнивающих эффективность различных типов моделей раздражения кожи при оценке наноматериалов [239]—[241].

Анализ прозрачности/непрозрачности бычьей роговицы (BCOP) и проба раздражения глаза EpiOcular™[6)] (EIT) применен для оценки нескольких наноматериалов на выявление их свойств к раздражению глаза [242]. Некоторую степень раздражения наблюдали только для наночастиц серебра в тесте раздражения глаза EpiOcular™ (EIT), в то время как различные результаты были получены с BCOP. Для некоторых сухих порошковых наноматериалов [оксиды металлов (ZnO, $TiO_2$, $CeO_2$), аморфный $SiO_2$ и МУНТ], трех органических пигментов, кварца и талька результаты были отрицательными в обоих тестах.

### 9.5 Гемосовместимость

#### 9.5.1 Общие положения

Оценку гемосовместимости следует проводить на МИ, содержащих наноматериалы, находящихся в прямом или косвенном контакте с кровью. Исследования на гемосовместимость проводят на МИ, не предназначенных для контакта с кровью, при обнаружении в токсикокинетическом тесте возможного транспорта свободных наночастиц, высвобождаемых из МИ в системный кровоток.

В ISO 10993-4 установлены общие требования к проведению оценки взаимодействий МИ с кровью, включая:

a) классификацию МИ, контактирующих с кровью, выполненную на основе применения по назначению и длительности контакта в соответствии с ISO 10993-1;

b) основные принципы, регулирующие оценку процессов взаимодействия МИ с кровью;

---

[6)] EpiOcular™ является торговой маркой MatTekCorporation. Данная информация приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не является поддержкой ISO указанного продукта. Допускается использовать эквивалентные продукты, если подтверждено, что при их применении получены такие же результаты.

c) обоснование выбора метода исследования в соответствии с конкретными категориями МИ и с учетом данных проведенных исследований.

Методы оценки гемосовместимости МИ подразделяют на несколько категорий, основанных на первичных процессах их взаимодействия с кровью: гематология, гемолиз, тромбоз, свертывание крови, активация тромбоцитов и системы комплемента. Данные категории методов исследования также применимы к оценке гемосовместимости наноматериалов с учетом рекомендаций, приведенных в настоящем пункте.

Из-за своих размеров нанообъекты способны мигрировать и достигать системы кровотока, в котором они могут индуцировать протромботические эффекты и активацию тромбоцитов. Оценку гемосовместимости проводят для наноструктурированных материалов, МИ, содержащих наноматериалы и нанообъекты, высвобождаемых из МИ, находящихся в прямом или косвенном контакте с циркулирующей кровью.

Многие реакции крови на МИ обусловлены размером контактирующей площади поверхности изделия с кровью. Соотношение площади поверхности МИ к объему цельной крови при контакте ($см^2$/мл цельной крови, WB) является основным фактором для оценки гемосовместимости. К другим факторам, влияющим на характер взаимодействия МИ с кровью, относят морфологию и химический состав поверхности. Исследования «доза—ответ» выполняют на наноматериалах с использованием подходящих моделей *in vitro* и *in vivo* для соответствующих категорий взаимодействий с кровью, отмеченных выше. См. также ISO 10993-4.

**9.5.2 Активация системы комплемента**

Система комплемента задействована во врожденной иммунной защите против чужеродных объектов через опсонизацию материалов, позволяющую их распознавать и поглощать макрофагами. Выявлено, что взаимодействие между нанообъектами и системой комплемента регулируется несколькими факторами, включая размер, морфологию и поверхность [128]. Абнормальное повышение активации системы комплемента из-за присутствия в крови наноматериалов может индуцировать значительные воспалительные реакции.

Степень активации системы комплемента включают в оценку биологического риска наноматериалов, особенно, если они предназначены для прямого контакта с циркулирующей кровью или, если существует вероятность миграции свободных наночастиц в системный кровоток.

Активация комплемента может привести к реакции острой гиперчувствительности [243]. Конкретный тип синдрома гиперчувствительности называют псевдоаллергией, обусловленной активацией комплемента (CARPA). Существует несколько отчетов о каскадной активации такого типа, индуцированной ПЭГ-модифицированными липосомами и другими наноразмерными веществами. Такие индукторы CARPA включают следующее: липосомные лекарственные средства, мицеллярные растворители, рентгеноконтрастные агенты, УНТ, нанопрепараты на основе липосом и полимеров, везикулы с покрытием ПЭГ и другие препараты на липидной основе, стабилизированные фосфолипид-метоксиПЭГ-конъюгатом [244], [245].

**9.5.3 Особые положения при исследовании гемосовместимости**

Гемосовместимость является основным свойством при биологической оценке наноматериалов, контактирующих с кровью. Причиной этого является тот факт, что белки крови быстро адсорбируются на поверхность нанообъектов, что приводит к каскаду событий, которые, в итоге, определяют судьбу МИ. В зависимости от их размера/площади поверхности и других исходных или приобретенных характеристик поверхности нанообъекты могут проявлять как положительные, так и отрицательные гемосовместимые свойства. Выявлено, что размер и шероховатость поверхности играют важную роль в процессах адсорбции белков сыворотки крови, адгезии и активации тромбоцитов и кинетики свертывания цельной крови [246], см. также 8.2.2.

Если материалы с наноструктурированной поверхностью могут быть исследованы традиционными методами в соответствии с ISO 10993-4, то оценка гемосовместимости свободных нанообъектов может быть гораздо более проблематичной. Из-за более высокого соотношения поверхность/объем по сравнению с макроматериалами гораздо большее количество сывороточного белка может немедленно адсорбироваться на поверхность нанообъектов, искажая последующий каскад реакций, происходящий в крови в ответ на контакт с чужеродным материалом. Характер взаимодействия с тромбоцитами, факторами свертывания и эндотелиальными клетками может быть изменен из-за потенциально возможной агрегации/агломерации свободных нанообъектов при контакте с кровью. Вследствие данных потенциальных проблем для методов *in vitro* особое внимание следует уделить воспроизводимости, надежности и чувствительности используемых тестов, прежде чем делать какие-либо заключения относительно

гемосовместимости свободных нанообъектов. Стандартный метод для исследования гемолитических свойств наночастиц представлен в [51], адаптированным из оценки гемолитических свойств макроматериалов.

Следует учитывать, что провоспалительные и прокоагулянтные факторы (например, TNF-a, IL-6, IL-8, MCP-1, тканевой фактор) из эндотелиальных клеток могут быть индуцированы наночастицами [247]. Прокоагулянтный и провоспалительный потенциал наночастиц может быть обнаружен в эндотелиальных клетках и модели сокультивированных моноцитов [248], [249]. В дополнение к основному скринингу гемосовместимости должны быть определены активация эндотелиальных клеток и/или моноцитов и взаимодействие эндотелиальных клеток, моноцитов с наночастицами (например, путем оценки маркеров молекул клеточной адгезии, таких как CD54/CD106/CD62E, провоспалительных цитокинов, таких как TNF-α, IL-6, IL-8, MCP-1 и прокоагулянтных факторов).

### 9.6 Общая токсичность

Общая (системная) токсичность наноматериалов не может быть выявлена на основе результатов оценки токсичности соответствующих макроматериалов в связи со способностью нанообъектов мигрировать в организме и достигать органов, труднодоступных для обычных материалов. Нанообъекты потенциально могут пересекать все защитные барьеры, включая ядерную оболочку, гематоэнцефалический и фетоплацентарный барьеры. Поэтому требуется проведение исследования общей токсичности нанообъектов.

Одной из основных характеристик при анализе общей токсичности наноматериала является его растворимость. Растворение легкорастворимых наноматериалов при контакте с тканями или жидкостями происходит аналогично легкорастворимым макроматериалам в МИ. Для труднорастворимых наноматериалов способность организма к их выведению и защитные механизмы могут быть быстро перегружены, что ведет к длительному системному накоплению наноматериалов, что может вызвать отрицательные эффекты. Биоперсистенция нерастворимых наноматериалов может привести к изменениям в лизосомальной проницаемости, ферментной активности и апоптозу макрофагов. В зависимости от клинического применения и свойств наноматериалов при оценке их потенциальной общей токсичности проводят исследование их воздействия разной продолжительностью (см. ISO 10993-11).

Нанообъекты могут распределяться по всему организму, поэтому отдельно в каждом конкретном случае определяют ткани/органы, предназначенные для гистологического анализа (см. ISO 10993-11), с акцентом на СМФ (например, в печени и селезенке, почках, мозге, костном мозге и др. в зависимости от пути введения и предназначенного клинического применения).

Вводимая доза, измеряемая в единицах массовой концентрации, как правило, используемая для макроматериалов, может не подходить для наноматериалов, общая токсичность которых будет в основном зависеть от взаимодействия самих наночастиц с биологической системой. Для описания соотношения «доза—ответ» допускается использовать число введенных наночастиц и/или суммарную площадь поверхности, воздействующую на пациента.

Массовая концентрация является удобной единицей для определения дозы. Если известны размерные характеристики наночастиц, то доза, определенная в единицах массовой концентрации, может быть преобразована в дозу, определенную в единицах счетной концентрации (по числу частиц) и/или объемной концентрации (по площади поверхности частиц).

Размер дозы и частота дозирования могут повлиять на результат исследования общей токсичности. Воздействие нанообъектов может перенасытить или стимулировать их захват органами, особенно органами СМФ. При испытаниях на грызунах выявлено, что фагоцитарные клетки в печени и селезенке могут быть перенасыщены с перераспределением нанообъектов в другие органы [130], [131]. При введении углеродных нанообъектов в кровь крыс происходит их накопление в печени и увеличение количества при повторном дозировании [132]. Выявлено, что данное изменение связано с адаптацией СМФ к новым условиям, особенно к содержанию нанообъектов в крови [132]. При введении внутривенно коллоидного углерода, вызывающего блокаду и поглощаемого печенью, фагоцитарная активность печени возвращается к нормальной в период от 3 до 6 сут [250], [251].

### 9.7 Пирогенность

Если наноматериал изготавливают в нестерильных условиях или с применением воды, то его поверхность может быть покрыта бактериальными эндотоксинами или липополисахаридами (LPS). Наличие эндотоксинов на поверхностях наноматериалов может влиять во взаимодействие между на-

номатериалами и биологическими системами и, следовательно, на результаты оценки (например, вызвать неспецифическое воспаление). Следует учитывать, что термическая стерилизация (сухой жар, автоклавирование), этиленоксид, гамма- и электронно-лучевое излучение не дезактивируют бактериальный эндотоксин. Рекомендуется выполнять обработку материалов при достаточном времени и температуре для достижения редукции ≥ 3-log в активности эндотоксина (как правило, при температуре 250 °С не менее 30 мин) (USP 1995) (см. 6.9.1).

В ISO 29701 установлен метод определения содержания эндотоксинов с использованием лизата амебоцитов (ЛАЛ-тест) для испытаний наноматериалов в тест-системах *in vitro*.

Другим методом является исследование активации моноцитов (МАТ), валидированный количественный метод, в котором используют естественный человеческий механизм повышения температуры. Данный метод может быть применен для пробы на эндотоксины, связанные с наноматериалами, а также другие биологические пирогены (например, дрожжевые, паразитические и вирусные пирогены) [84]—[86]. Информация, относящаяся к тестированию эндотоксиновой активности наноматериалов, приведена в 6.9.1 и ISO 10993-11, USP 85, USP 151 [50]. В дополнение к пирогенности, опосредованной эндотоксином, при биологической оценке наноматериала следует учесть пирогенность, вызванную самим наноматериалом, в соответствии с ISO 10993-11.

### 9.8 Имплантация

Имплантационные тесты для МИ приведены в ISO 10993-6. В зависимости от вида МИ имплантацию выполняют в различные места (например, подкожно, внутримышечно, внутричерепная имплантация и т. д.). Для свободных нанообъектов выполняют прямую инъекцию в соответствующую ткань.

Следует учитывать возможность миграции нанообъектов в местный дренирующий лимфоузел при высвобождении нанообъектов из МИ.

При использовании имплантационного теста для оценки общей токсичности следует учитывать требования ISO 10993-6 и ISO 10993-11.

В имплантационных тестах используют контрольный материал/образец. Для этих целей применяют сертифицированные наноматериалы сравнения, например стандартизованные для измерений размеров, и RTM (см. 5.3).

## 10 Протокол исследования

Протокол исследования, содержащий данные о характеристиках и биологическим эффектам наноматериалов, должен включать, как минимум, следующую информацию:

a) описание МИ и наноматериала, включая следующие физико-химические свойства:

1) описание наноматериала, включая химический состав и структуру;

2) размеры;

3) морфологию;

4) скорость/состояние образования агломератов и агрегатов;

5) растворимость,

6) поверхностный заряд, площадь и химический состав поверхности;

7) описание конкретного применения МИ, характер и длительность биологического контакта/взаимодействия;

8) подтверждение химической чистоты наноматериала в готовом МИ, если необходимо, экспериментальное или теоретическое определение выщелачиваемых и/или химических примесей;

9) аналитические данные о стабильности наноматериала (например, для нанообъектов это может быть скорость/состояние образующихся агрегатов, полученная для исходных образцов и различных доз, используемых в ряде тестов);

b) вид образцов (например, экстракты, прямой контакт) и условия исследования (концентрация наноматериала и среда, материал емкости), включая идентификацию примененных стандартных протоколов;

c) стандартные аналитические методы, если применимо;

d) описание аналитических методов исследования, включая предельные значения;

e) оценка деструкции (деградации, резорбции) материала МИ и потенциально возможного высвобождения нанообъектов, включая обоснования для поддержки адекватности условий исследования условиям клинического применения МИ по назначению;

f) описание методов исследования деструкции материала МИ и способности к высвобождению нанообъектов, условий и этапов исследования, материалов, включая контроли;

g) определение и количественный анализ продуктов деструкции (например, форма и состояние продуктов деструкции, их стабильность и используемые контроли);

h) доказательство валидируемости исследования, включая использование необходимых контролей и обоснований (где применимо);

i) результаты исследования;

j) интерпретация, описание результатов и выводы;

k) заявление о соответствии надлежащим методам лабораторной практики и/или системам контроля качества для исследовательских лабораторий (например, ISO/IEC 17025).

При применении и валидации новых методов проводимое исследование должно содержать информацию в соответствии с ISO/TR 13014.

## 11 Оценка риска

### 11.1 Общие положения

Общие подходы к оценке химического риска применимы к наноматериалам [55], [59], [252], [253]. Для наноматериалов, благодаря их уникальным физико-химическим свойствам, большой композиционной неопределенностью, изменяющимся свойствам биологических систем, сложности в измерении воздействия и соответствующим решениям по уровням дозы, требуется применение конкретного подхода при оценке риска. Таким образом, прозрачность имеет важное значение в процессе оценки рисков, когда следует обсуждать включение и исключение данных, допущения, вариативность и неопределенности.

При отсутствии ключевых данных испытатель не будет способен завершить оценку риска. Следовательно, из результатов оценки должно быть ясно, как была учтена информация при определении конечной ее оценки. Необходимо отметить, что оценка биологического риска наноматериалов включает в себя как растворимые, так и нерастворимые его фракции. Допускается, что критическая информация, необходимая для оценки риска наноматериалов, часто может быть недостаточной, что ведет к значительной неопределенности. Ожидается, что такие неопределенности будут уменьшаться по мере поступления соответствующих новых данных, полученных в результате испытаний и исследований наноматериалов.

Периодическую переоценку рисков, связанных с использованием, следует проводить при поступлении каждой новой информации.

Для оценки химического риска возможная биоперсистентность/биоаккумуляция наноматериалов представляет особую проблему. Во многих случаях организм может быть не способен к метаболизму или активному разрушению наноматериала, что приводит к потенциальной неопределенной его биоперсистенции (биологической стойкости) в тканях или клетках.

Выявлена биологическая стойкость наноматериалов внутри тканей и клеток, включая наночастицы серебра [90], [254], наночастицы оксида цинка, наночастицы диоксида титана [255], наночастицы золота [237], [238] и УНТ [239]. Выявлена длительная биоперсистенция для наночастиц диоксида титана $TiO_2$ [259]. Конкретные биологические эффекты, связанные с биоперсистентностью, не до конца изучены, но существуют некоторые доказательства, которые позволяют предположить, что длительная биоперсистенция может вызвать состояние постоянного воспаления, которое может в итоге привести к канцерогенезу [192], [260]. Следует учитывать возможность высвобождения нанообъектов в результате износа/старения/использования МИ, не имеющих в своем составе наноматериалы.

Процесс управления риском при биологической оценке МИ приведен в ISO 10993-1:2009 (приложение В). ISO 10993-1 не определяет такие термины как «оценка риска», «рассмотрение риска» и «анализ риска», но следует формулировкам ISO 14971 и ISO/TR 15499. Тем не менее, в ISO 10993-1:2009, приложение В, понятие «риск» расширено и также включает в себя понятия «анализ риска» и «контроль риска». ISO/TR 15449 предоставляет более детальные рекомендации по проведению анализа биологического риска в рамках процесса управления рисками, чем ISO 10993-1. Блок-схема процесса управления рисками приведена на рисунке 1, но область применения настоящего стандарта ограничивается только оценкой риска, которая включает рассмотрение и анализ риска. Риск описан в ISO 14971 как продукт двух независимых факторов: вероятность ущерба и серьезность этого ущерба.

Процесс оценки риска для наноматериалов постоянно улучшается, многие инструменты находятся в разработке для помощи в оценке рисков наноматериалов, такие как виртуальные технологии наноинформатики [261], количественная зависимость активности наночастиц (QNAR) [262]—[264], модели воздействия наночастиц [265], [266], физиологически обоснованная фармакокинетическая модель (ФКОФ) [248], [249], системное токсикологическое исследование и высокая производительность скрининговых тестов [269] (см. ISO/TR 16197). При этом данные инструменты не часто используют при оформлении регистрационных документов для наноматериалов. «Совокупность доказательств» является другим термином, часто упоминаемым в документах по оценке риска, который может быть полезным [271], [272]. ОЭСР предоставляет обобщение важных факторов для рассмотрения при оценке риска наноматериалов, которые также применимы к МИ [252].

На рисунке 1 представлен обзор всего процесса управления рисками, основанный на ISO 10993-1, но область применения настоящего стандарта ограничена оценкой риска, представленной на рисунке 1 выше затемненной части. Затемненная часть на рисунке 1 обозначает контроль риска как часть управления рисками.

### 11.2 Оценка степени воздействия

Вероятность риска, как правило, определяют оценкой степени воздействия, клиническим опытом применения или сравнением с аналогом. Для наноматериалов, применяемых в МИ, вероятность риска связана с возможностью их высвобождения из МИ и формированием нанообъектов. Оценку степени воздействия выполняют с целью определения количества наноматериала, воздействующего на пациента, и установления того, делает ли данное воздействие нанообъекты доступными для местных тканевых ответов и/или системного воздействия. Следовательно, становится важным описание сценария воздействия и анализ процессов высвобождения, миграции и формирования нанообъектов из МИ путем выбора точных методов исследования. При оценке степени воздействия необходимо учитывать:

- интенсивность, частоту и длительность контакта;
- способ введения/путь воздействия (например, ткань/кровь, чрескожный, пероральный или респираторный);
- скорость поступления или поглощения;
- биодоступность.

Изначально, основное внимание уделяется расчету вероятности и степени абсорбции/распределения нанообъектов в организме путем моделирования процесса воздействия, измерения реального воздействия или делая предположения о степени воздействия. Системный захват может, тем не менее, различаться при разных условиях воздействия, путях воздействия, состоянии здоровья пациента и биодоступности. Ингаляционный, внутривенный или имплантационной способ введения наночастиц часто нуждается в большем внимании, чем пероральное или чрескожное воздействие.

Во время оценки результатов воздействия проблематичной является характеристика наноматериала. Она может быть затруднена *in vivo*, особенно в тканях и физиологических жидкостях из-за ограниченного количества аналитических методов, а также из-за низких концентраций нанообъектов. Другим ограничением является то, что химический анализ не всегда предоставляет информацию о специфических свойствах наноматериалов. Следовательно, эта характеристика должна подтвердить, находится ли наноматериал в твердой, растворенной или деструктированной форме. Выявлено, что отдельные наноматериалы (например, наносеребро) могут растворяться или выделять ионы металла, что может привести к появлению новых наноматериалов с другим химическим составом [90], [272]. Аналитические методы должны быть описаны и обоснованы. Оценка степени воздействия должна учитывать такие аспекты как:

- пригодность;
- чувствительность;
- надежность;
- точность;
- пределы обнаружения;
- форма материала (твердая, растворимая или деструктированная);
- источники вариабельности и неопределенности.

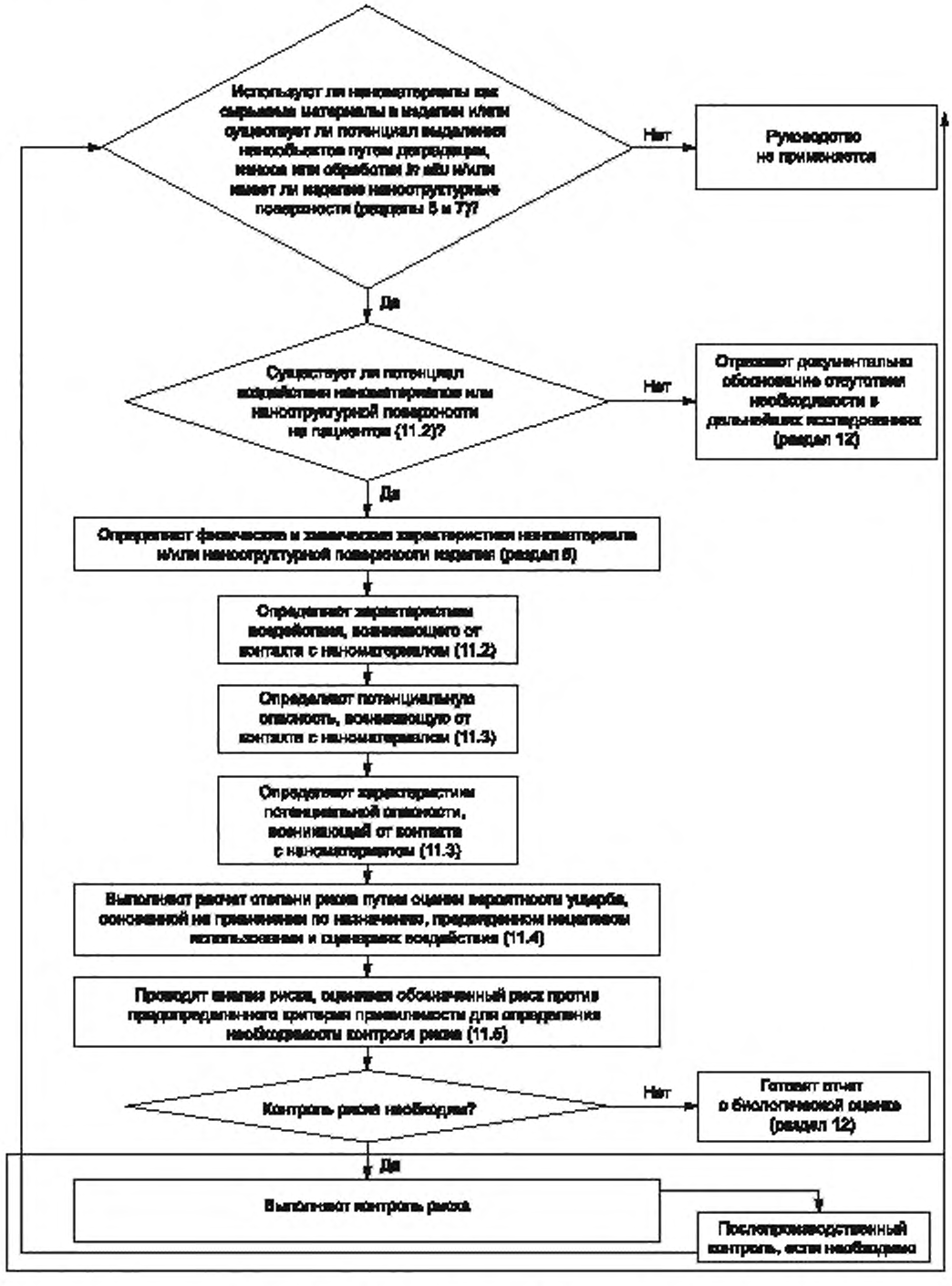



Рисунок 1 — Блок-схема процесса управления рисками

### 11.3 Определение биологической опасности

Опасность является потенциальным источником ущерба. Все известные и предсказуемые опасности, связанные с наноматериалами, в нормальных и разумных условиях отказа должны быть определены. Тем не менее, для причинения ущерба должна произойти опасная ситуация, которая часто включает последовательность событий. Определение и характеристика этих событий представляется важным, если существует необходимость оценить риски.

При оценке риска на этапе определения/характеристики опасности учитывают:

- информацию из научной литературы;
- результаты исследований по определению свойств материала;
- сведения о подготовке образцов;
- выбор и описание дозы;
- методы исследования;
- токсикокинетику;
- описание опасности, включая реакцию на введение исследуемой дозы образца и способ введения нанообъектов.

Для некоторых типов биологических эффектов невозможно вывести типичное токсикологическое соотношение «доза—ответ». В таких случаях необходимо использовать другие методы для описания опасности и классификации серьезности ущерба. Здесь особое внимание должно быть уделено тому, как появляются опасные ситуации и характеру их результатов. Примеры таких биологических эффектов включают в себя реакции на инородное тело с имплантированными наноматериалами и свертывание крови из-за особенностей структуры поверхности и дизайна наноматериалов. Надлежащее документирование таких и других типов биологических эффектов необходимо для обеспечения прозрачности и прослеживаемости полученных результатов.

### 11.4 Расчет степени риска

Принципы расчета степени риска считают применимыми для наноматериалов, но могут быть более сложными из-за ограниченного понимания в настоящее время механизма взаимодействия наноматериалов с тест-системами и организмом человека. Совокупность доказательств и положения по допустимым значениям потребления, приведенные в ISO 10993-17, могут быть полезны в этом процессе.

В ISO 10993-17 приведены рекомендации по использованию факторов неопределенности и установлению допустимого значения для выщелачиваемых веществ. ISO 10993-17 может быть применен для наноматериалов, оказывающих системное воздействие в результате высвобождения, деструкции, износа или своего состава.

При анализе риска для здоровья, связанного с применением наноматериалов, учитывают всю имеющуюся информацию из различных источников, включая научную литературу, результаты биологической оценки, клинического применения и оценки степени воздействия. При этом следует учитывать достоверную информацию, приведенную в надежных источниках. Данные, используемые для расчета степени риска оценивают на надежность, основываясь:

- на подтверждении идентичности и физико-химических свойств исследуемого материала по отношению к оцениваемому материалу;
- были ли данные получены согласно принятому подходу исследования или измерения;
- был ли используемый подход принят для исследования наноматериалов.

Идентифицированные и охарактеризованные риски сравнивают с воздействием или возможностью опасности причинения ущерба. Риск появляется, если существует вероятность ущерба. Если невозможно определить степень воздействия (вероятность ущерба), то оценка риска после принятия худшего сценария воздействия может зависеть только от серьезности опасности. Тем не менее, так как риск является функцией воздействия, а частота и длительность являются факторами воздействия, вероятность ущерба возрастет с ростом любого из этих факторов.

### 11.5 Анализ риска

Анализ риска — процесс, в котором расчетные риски оценены по предопределенному критерию приемлемости для определения необходимости контроля риска. Анализ риска идентичен для всех МИ вне зависимости от того, содержат ли они наноматериалы. Если имеющихся данных для количествен-

ного анализа риска недостаточно, то выполняют качественный анализ риска. Следует учитывать, что уровень риска зависит не только от потенциальной серьезности опасности и вероятности вредного воздействия, но также и от конкретного применения изделия.

## 12 Отчет о биологической оценке

Отчет о биологической оценке должен содержать пункты, приведенные в ISO 10993-1, включая более конкретную информацию относительно применения наноматериалов. Эксперты, имеющие необходимые знания и опыт, должны определить и отразить документально:

a) стратегию и содержание программы для биологической оценки МИ, которое содержит, высвобождает или состоит из наноматериалов/нанообъектов;

b) критерий для определения приемлемости риска, связанного с наноматериалом/наноматериалами для предназначенной цели соответственно плану управления рисками;

c) адекватность проведенной характеристики МИ и наноматериалов;

d) обоснование выбора и/или отказа от исследований и степень неопределенности в интерпретации этих исследований;

e) интерпретацию соответствующих существующих данных и результаты исследований, относящихся к МИ;

f) любые дополнительные собранные данные для завершения биологической оценки;

g) общее заключение по биологической безопасности МИ и степень неопределенности сформулированных заключений.

**Приложение ДА**
**(справочное)**

## Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов и документов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

| Обозначение и наименование международного стандарта документа | Степень соответствия | Обозначение и наименование межгосударственного стандарта |
|---|---|---|
| ISO 10993 (all parts) | IDT | ГОСТ ISO 10993 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий» |
| ISO/TR 13014 | * | — |
| ISO 14971 | IDT | ГОСТ ISO 14971—2011 «Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям» |

* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного документа. Перевод данного международного документа находится в Федеральном информационном фонде стандартов.

Примечание — В настоящем стандарте использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты.

## Библиография


| | | |
|---|---|---|
| [1] | ISO 9276 (all parts) | Representation of results of particle size analysis (Гранулометрический анализ. Представление результатов) |
| [2] | ISO 9277 | Determination of the specific surface area of solids by gas adsorption — BET method [Определение удельной площади поверхности твердых тел по адсорбции газа с применением метода Брункера, Эммета и Теллера (BET-метод)] |
| [3] | ISO 10801 | Nanotechnologies — Generation of metal nanoparticles for inhalation toxicity testing using the evaporation/condensation method (Нанотехнологии. Генерирование металлических наночастиц для испытаний токсичности ингаляции методом испарения/конденсации) |
| [4] | ISO 10808 | Nanotechnologies — Characterization of nanoparticles in inhalation exposure chambers for inhalation toxicity testing (Нанотехнологии. Определение параметров наночастиц в ингаляционной камере для испытаний токсичности ингаляции) |
| [5] | ISO 11360 | Nanotechnologies — Methodology for the classification and categorization of nanomaterials (Нанотехнологии. Методология классификации и категоризации наноматериалов) |
| [6] | ISO/TS 12025 | Nanomaterials — Quantification of nano-object release from powders by generation of aerosols (Наноматериалы. Количественное определение выхода нанообъектов из порошков путем создания аэрозолей) |
| [7] | ISO 13084 | Surface chemical analysis — Secondary ion mass spectrometry — Calibration of the mass scale for a time-of-flight secondary ion mass spectrometer (Химический анализ поверхности. Вторично-ионная масс-спектрометрия. Калибровка шкалы массы для времяпролетного масс-спектрометра на вторичных ионах) |
| [8] | ISO/TR 13097 | Guidelines for the characterization of dispersion stability (Руководящие указания по определению характеристики дисперсионной стабильности) |
| [9] | ISO 13099 (all parts) | Colloidal systems (Коллоидные системы) |
| [10] | ISO 13121 | Nanotechnologies — Nanomaterial risk evaluation (Нанотехнологии. Оценка рисков для наноматериалов) |
| [11] | ISO 13318 (all parts) | Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods (Определение гранулометрического состава методами центробежного осаждения в жидкости) |
| [12] | ISO 13320 | Particle size analysis — Laser diffraction methods (Гранулометрический анализ. Методы лазерной дифракции) |
| [13] | ISO 13322 (all parts) | Particle size analysis — Image analysis methods (Анализ размеров частиц. Методы анализа изображений) |
| [14] | ISO/TR 14187 | Surface chemical analysis — Characterization of nanostructured materials (Химический анализ поверхности. Описание характеристик наноструктурных материалов) |
| [15] | ISO 14488 | Particulate materials — Sampling and sample splitting for the determination of particulate properties (Материалы на основе твердых частиц. Отбор и деление проб для определени характеристик частиц) |
| [16] | ISO 14887 | Sample preparation — Dispersing procedures for powders in liquids (Подготовка образца. Процедуры диспергирования порошков в жидкостях) |
| [17] | ISO 15471 | Surface chemical analysis — Auger electron spectroscopy — Description of selected instrumental performance parameters (Химический анализ поверхности. Электронная оже-спектроскопия. Описание отдельных рабочих параметров прибора) |

| | | |
|---|---|---|
| [18] | ISO/TR 15499 | Biological evaluation of medical devices — Guidance on the conduct of biological evaluation within a risk management process (Биологическая оценка медицинских изделий. Руководство по проведению биологической оценки в рамках процесса менеджмента риска) |
| [19] | ISO/TR 15900 | Biological evaluation of medical devices — Part 33: Guidance on tests to evaluate genotoxicity — Supplement to ISO 10993-3 (Биологическая оценка медицинских изделий. Часть 33. Руководство по испытаниям для оценки генотоксичности. Дополнение к ISO 10993-3) |
| [20] | ISO/TR 15901 (all parts) | Nanotechnologies — Methodology for the classification and categorization of nanomaterials (Нанотехнологии. Методология классификации и категориии наноматериалов) |
| [21] | ISO/TS 16195:2013 | Nanotechnologies — Specification for developing representative test materials consisting of nano-objects in dry powder form (Нанотехнологии. Требования к разработке репрезентативных испытуемых материалов, содержащих нанообъекты в виде сухого порошка) |
| [22] | ISO/TR 16196 | Nanotechnologies — Compilation and description of sample preparation and dosing methods for engineered and manufactured nanomaterials (Нанотехнологии. Обобщение и описание методов подготовки образцов и определения дозы наноматериалов, разработанных и полученных на наноразмерном уровне) |
| [23] | ISO/TR 16197 | Nanotechnologies — Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials (Нанотехнологии. Сбор и описание токсикологических методов скрининга для искусственных наноматериалов) |
| [24] | ISO/TS 16550 | Nanotechnologies — Determination of silver nanoparticles potency by release of muramic acid from Staphylococcus aureus (Нанотехнологии. Определение активности серебряных наночастиц путем выделения мурамовой кислоты из Staphylococcusaureus) |
| [25] | ISO 16700 | Microbeam analysis — Scanning electron microscopy — Guidelines for calibrating image magnification (Анализ с использованием микропучка. Сканирующая электронная микроскопия. Руководящие указания для калибровки увеличения изображения) |
| [26] | ISO/IEC 17025 | General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий) |
| [27] | ISO/TS 17200 | Nanotechnology — Nanoparticles in powder form — Characteristics and measurements (Нанотехнологии. Наночастицы в виде порошка. Характеристики и измерения) |
| [28] | ISO 17853 | Wear of implant materials — Polymer and metal wear particles — Isolation and characterization (Имплантаты для хирургии. Износ имплантируемых материалов. Полимерные и металлические частицы износа. Выделение и характеристика) |
| [29] | ISO 17973 | Surface chemical analysis — Medium-resolution Auger electron spectrometers — Calibration of energy scales for elemental analysis (Химический анализ поверхности. Электронные оже-спектрометры среднего разрешения. Калибровка энергетических шкал для элементарного анализа) |
| [30] | ISO 18115 (all parts) | Surface chemical analysis — Vocabulary (Химический анализ поверхности. Словарь) |
| [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 (Химический анализ поверхности. Электронная спектроскопия Оже и рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия. Руководство по использованию определенной экспериментальным путем относительной чувствительности прибора для качественного анализа однородных материалов) |
| [32] | ISO 18144 | Environmental tobacco smoke — Estimation of its contribution to respirable suspended particles — Method based on solanesol (Табачный дым в окружающей среде. Оценка его доли в объеме вдыхаемых взвешенных частиц. Метод, основанный на solanesol) |

[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 [Керамика тонкая (высококачественная керамика, высококачественная техническая керамика). Определение удельной поверхности керамических порошков по адсорбции газа методом БЭТ]

[34] ISO 19007 Nanotechnologies — In vitro MTS assay for measuring the cytotoxic effect of nanoparticles [Нанотехнологии. Анализ пролиферации клеток (MTS) in vitro для измерения цитотоксического эффекта наночастиц]

[35] ISO/TR 19319 Surface chemical analysis — Fundamental approaches to determination of lateral resolution and sharpness in beam-based methods (Химический анализ поверхности. Фундаментальные подходы к определению поперечного разрешения и резкости при использовании методов на базе пучка)

[36] ISO 19590 Nanotechnologies — Size distribution and concentration of inorganic nanoparticles in aqueous media via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (Нанотехнологии. Распределение по размерам и концентрация неорганических наночастиц в водной среде с помощью масс-спектрометрии одиночных частиц с индуктивно связанной плазмой)

[37] ISO 20998 (all parts) Measurement and characterization of particles by acoustic methods (Измерение и определение характеристик частиц акустическими методами)

[38] ISO 21501 (all parts) Determination of particle size distribution — Single particle light interaction methods (Получение распределения частиц по размерам. Оптические методы оценки отдельных частиц)

[39] ISO 22309 Microbeam analysis — Quantitative analysis using energy-dispersive spectrometry (EDS) for elements with an atomic number of 11 (Na) or above [Анализ с использованием микропучка. Количественный анализ с использованием энергодисперсионной спектрометрии для элементов с атомным числом 11 (Na) или выше]

[40] ISO 22412 Particle size analysis — Dynamic light scattering (Гранулометрический анализ. Динамическое рассеяние света)

[41] ISO 22489 Microbeam analysis — Electron probe microanalysis — Quantitative point analysis for bulk specimens using wavelength dispersive X-ray spectroscopy (Микрозондовый анализ. Электронный микроанализ пробы. Количественный точечный анализ массовой пробы методом рентгеновской спектроскопии с дисперсией по длине волны)

[42] ISO 24173 Microbeam analysis — Guidelines for orientation measurement using electron backscatter diffraction (Микропучковый анализ. Руководящие указания по измерению ориентации с использованием дифракции при обратном рассеянии электронов)

[43] ISO 24236 Surface chemical analysis — Auger electron spectroscopy — Repeatability and constancy of intensity scale (Поверхностный химический анализ. Оже-электронная спектроскопия. Повторяемость и постоянство шкалы интенсивности)

[44] ISO 25178 Geometrical product specifications (GPS) — Surface texture: Areal (Геометрические характеристики изделий (GPS). Структура поверхности. Ареал)

[45] ISO 27628 Workplace atmospheres — Ultrafine, nanoparticle and nano-structured aerosols — Inhalation exposure characterization and assessment (Атмосферы на рабочем месте. Очень мелкие аэрозоли, аэрозоли с наночастицами и наноструктурой. Определение характеристик и оценка воздействия при вдыхании)

[46] ISO 29701 Nanotechnologies — Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems — Limulus amebocyte lysate (LAL) test [Нанотехнологии. Наноматериалы для испытаний в тест-системах in vitro. Метод определения содержания эндотоксинов с использованием лизата амебоцитов Limulus (ЛАЛ-тест)]

[47] ISO/TS 80004-1:2015 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms (Нанотехнологии. Словарь. Часть 1. Основные термины)

[48] ISO/TS 80004-2:2015 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 2: Nano-objects (Нанотехнологии. Словарь. Часть 2. Нанообъекты)

[49] ISO/TS 80004-6:2013 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 6: Nano-object characterization (Нанотехнологии. Словарь. Часть 6. Определение характеристик нанообъектов)

[50] AAMI/ST 72 Bacterial endotoxins — Test methods, routine monitoring, and alternatives tobatch 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 submicron 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 A Categorization 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. scenihr_o_045.pdf
gost.e-ecolog.ru
[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. WileyInterdiscip. 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, Mc Neil 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., Serrano-Rojero 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 size-dependent 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 Near-Infrared Photothermal Cancer Therapy. Small. 2014, 15 pp. 3139—3144

[101] Xie G., Sun J., Z hong 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, andparenchymal 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. FibreToxicol. 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 thebiodistribution, 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 ofthereticulo-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-inflammatoryeffects of low-toxicity low solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cellsin *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 withassay 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., BriedeJ. 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 bloodmononuclear 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., J enkins 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-$TiO_2$ 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 nanoobject 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 approachto 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., D onehower L.A., Gulezian D., Mitsumori K., Recio L. IWGTWorking 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. BenthemJv, 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] 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

[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. gost.e-ecolog.ru 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: gost.e-ecolog.ru 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 $TiO_2$ 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 Material Science AG, et al. Available at: gost.e-ecolog.ru

[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 determinecytotoxicity 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., De Louise 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 $TiO_2$ particles as a component of nanoparticle risk management. Toxicol. Lett. 2007, 171 pp. 99—110

[241] 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. FibreToxicol. 2016, 13 p. 18

[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., FeldheimD.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. O Omen 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 differrent 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 TractModel for Radiological Protection. ICRP Publication 66. Ann. ICRP. 1994, 24 (1-3). Available at: gost.e-ecolog.ru = 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 physiologically-based 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 21$^{st}$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

УДК 615.46:006.354 МКС 11.100.20 IDT

Ключевые слова: оценка биологического действия медицинских изделий, наноматериалы, наночастицы

БЗ 11—2020/230

Редактор *Н.В. Таланова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 20.10.2020. Подписано в печать 30.10.2020. Формат 60×84¼. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 6,98. Уч.-изд. л. 6,32.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru