ISIRI
13566
1st. Edition

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

استاندارد ملی ایران
۱۳۵۶۶
چاپ اول

فناوری نانو- ارزیابی اثر نانوذرات بر تشکیل کلنی‌های گرانولوسیت – ماکروفاژ موش - روش آزمون

Nanotechnology - Evaluation of the effect of nanoparticulate materials on the formation of mouse granulocyte-Macrophage colonies- Test method

ICS:07.100.10

به‌نام خدا

آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

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

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه* صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی(رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

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

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

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

---

* موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

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

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

" فناوری نانو- ارزیابی اثر نانوذرات بر تشکیل کلنی‌های گرانولوسیت - ماکروفاژ موش

روش آزمون"

رئیس:	**سمت و/ یا نمایندگی**
کوهی، محمد کاظم (دکترای سم شناسی)	عضو هیئت علمی دانشگاه تهران
دبیر:	
حجازی، مرضیه (دکترای عمومی دامپزشکی، دانشجوی دکترای سم شناسی)	عضو هیئت علمی دانشگاه تبریز
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اربابی، سپیده (دکترای سم شناسی)	عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی
پوی پوی، حسن (کارشناس ارشد شیمی)	کارشناس ستاد ویژه توسعه فناوری نانو ودبیرکمیته فنی متناظر فناوری نانو (ISIRI/TC229)
سیفی، مهوش (کارشناس ارشد مدیریت دولتی)	کارشناس استاندارد و نایب رئیس کمیته فنی متناظر فناوری نانو (ISIRI/TC229)
دکتر قاضی خوانساری (دکتری سم شناسی)	عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران
موسوی، ربابه (کارشناس ارشد شیمی)	کارشناس آزمایشگاه فناوری نانو وزارت بهداشت

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد	ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	د
پیش‌گفتار	و
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاحات و تعاریف	۲
۴ اصول آزمون	۳
۵ روش کار	۵
۶ روش آزمون	۸
۷ شمارش کلنی ها	۹
۸ محاسبه وتفسیر نتایج	۱۰
۹ گزارش	۱۱
۱۰ صحت و سوگیری در آزمون	۱۱

پیش‌گفتار

استاندارد " فناوری نانو- ارزیابی اثر نانوذرات بر تشکیل کلنی‌های گرانولوسیت - ماکروفاژ موش– روش آزمون" که پیش‌نویس آن درکمیسیون‌های مربوط توسط ستاد توسعه فناوری نانو مستقر در دفتر همکاری‌های فناوری ریاست جمهوری تهیه و تدوین شده و در دویست و هفتادوششمین اجلاس کمیتهٔ ملی میکروبیولوژی ، مورخ ۸۹/۱۲/۴ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

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

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

ASTM E 2525:2008, Standard test method for evaluation of the effect of nanoparticulate materials on the formation of mouse granulocyte - Macrophage colonies

فناوری نانو- ارزیابی اثر نانوذرات بر تشکیل کلنی‌های گرانولوسیت - ماکروفاژ موش

روش آزمون

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، ارائه روش آزمونی برای ارزیابی کمّی اثر مواد حاوی نانوذرات در محلول‌های فیزیولوژیک بر تشکیل کلنی های گرانولوسیت ـ ماکروفاژ[1] است.

در این روش آزمون از سلول‌های بنیادی خونساز مغز استخوان موش استفاده می‌شود. سلول‌های بنیادی خونساز، سلول‌های چند توانی[2] (دارای خاصیت تمایز به چندین نوع سلول) هستند. این سلول‌ها طی فرآیند تکثیر و تمایز دارای قابلیت تبدیل به رده‌های سلولی مجزا و یا کلنی‌های قابل شمارش هستند. سلول‌های بنیادی خونساز، ممکن است اختصاصاً نسبت به اثرات تحریک با مواد حاوی نانوذرات حساس باشند.

این روش آزمون بخشی از فرآیند توصیف و تعیین خصوصیات پیش بالینی نانوذرات در محیط برون تن[3] به منظور تجویز سیستمیک در مصارف پزشکی است.

تعیین اثر ذرات بر پاسخ‌های ماکروفاژ سابقه طولانی داشته و می‌تواند با روش استاندارد ASTM F1903 مورد ارزیابی قرار گیرد. با این روش آزمون می‌توان اثرات نانو ذرات بر سلول‌های بنیادی را که می‌توانند سلول‌های پیش ساز رده ماکروفاژ باشند ، مورد ارزیابی قرار داد.

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

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن استاندارد به آنها ارجاع شده است . بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند . در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده

1 - Granulocyte-macrophage colonies
2- Pluripotential
3- In vitro

شده است، اصلاحیه ها وتجدید نظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی نیست. در مورد مـدارکی کـه بدون تاریخ انتشار به آن ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدید نظرها و اصلاحیه های بعدی آن هـا مورد نظر است.

۲-۱استاندارد ملی ایران شماره ۹۵۹۷:سال ۱۳۸۶ ، روش سترون سازی محیط‌های کشت و وسـایل آلـوده-آئین کار

2-2 ASTM F1903, Practice for testing for biological responses to particles *in vitro*

2-3 ANSI/ AAMI ST72, Bacterial endotoxins-test methodologies, routine monitoring, and alternatives to batch testing

۳ اختصارات (سرنام‌ها)

در این استاندارد، اختصارات زیر به کار می‌رود:

۳-۱ مغز استخوان [1] (BM)

۳-۲ واحد تشکیل دهنده کلنی گرانولوسیت و ماکروفاژ [2] (CFU-GM)

۳-۳ واحد تشکیل دهنده کلنی گرانولوسیت [3] (CFU-G)

۳-۴واحد تشکیل دهنده کلنی ماکروفاژ [4] (CFU-M)

4 اصول آزمون

۴-۱ کلیات

دراین آزمون اثر مواد حاوی نانوذرات بر تشکیل کلنی‌های گرانولوسیت و ماکروفاژ مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. سلول‌های مغز استخوان را از موش بگیرید و در محیط‌های محرک رشد کشت دهید. تعداد واحدهای کلنـی تشکیل شده پس از تماس با نانوذرات را شمارش کرده و با نمونه‌های کنترل مثبت و پایه مقایسه کنید. بـه

1- Bone Marrow
2- Colony forming unit of Granulocyte and Macrophage
3- Colony forming unit of Granulocyte
4- Colony forming unit of Macrophage

این ترتیب می‌توان تعیین کرد که مواد حاوی نانوذرات در محلول‌های فیزیولوژیک بر سلول‌های بنیادی مغز استخوان اثر تحریک کننده یا مهارکننده دارند. رعایت شرایط عاری از میکروب[1] در تمام مراحل ضروری است.

۴- ۲ مواد و / یاواکنشگرها:

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

۴-۲-۱ سرم جنین گاو[2](FBS)

۴-۲-۲ محیط کشت با پایه متیل سلولز[3]

۴-۲-۳ محیط کشت [4](IMDM) همراه با ۲ درصدسرم جنین گاوی

۴-۲-۴ فسفات بافر سالین دالبکو [5](DPBS)

۴-۲-۵ دی متیل سولفوکساید[6](DMSO)

۴-۲-۶ DPBS عاری از یون‌های Ca^{+2} و Mg^{+2} (کنترل منفی)

۴-۲-۷ لیپوپلی ساکارید[7](LPS)

۴-۲-۸ آب مقطر استریل

۴-۲-۹ سیس پلاتین (کنترل مثبت)

۴-۲-۱۰ محلول فیزیولوژیک ـ محلول ایزوتونیک با pH (۰/۲ ± ۷/۲)

۴-۲-۱۱ متیلن بلو حاوی اسید استیک ۳ درصد

۴-۳ وسایل

یادآوری- کلیه مراحل آزمون باید در شرایط استریل صورت پذیرد ودر بکارگیری تجهیزات استریل دقت کافی بعمل آید.

ازاستاندارد ملی ایران شماره ۹۵۹۷، روش سترون سازی محیط های کشت و وسایل آلوده- آئین کار برای سترون سازی محیط های کشت و وسایل می توان استفاده کرد.

1- Aseptic
2- Fetal Bovine Serum
3- Methyl Cellulose Based Medium (MCBM)
4- Iscoves's Modified Dulbecco's Medium
5- Dulbecco's Phosphate Buffered saline
6- Demethyle Sulfoxide
7- Lipopolysaccaride

۴-۳-۱ پیپت در محدوده حجمی ۰/۰۵ میلی‌لیتر تا ۱۰ میلی‌لیتر

۴-۳-۲ ظروف کشت ۳۵ میلی‌متری برای رشد و تمایز سلول‌های بنیادی

۴-۳-۳ سوزن ته کند اندازه ۱۶

۴-۳-۴ ظروف پتری با قطر ۱۰۰ میلی‌متر

۴-۳-۵ بشرهای پلاستیکی

۴-۳-۶ لوله‌های پلی پروپیلنی ۱۵ و ۵۰ میلی‌لیتری

۴-۳-۷ سانتریفیوژ (یخچالدار)

۴-۳-۸ یخچال، ۲ تا ۸ درجه سلسیوس

۴-۳-۹ فریزر، ۲۰– درجه سلسیوس

۴-۳-۱۰ انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس برای کشت سلولی با دی اکسید کربن ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد

۴-۳-۱۱ جعبه دی اکسید کربن جهت کشتن حیوانات آزمایشگاهی مطابق اصول اخلاقی

۴-۳-۱۲ قیچی جهت برش بافت‌ها

۴-۳-۱۳ پنس

۴-۳-۱۴ هود بیولوژیک[1] تائید شده به منظورکار با مواد زیستی در سطح II استاندارد

۴-۳-۱۵ میکروسکوپ معکوس[2]

۴-۳-۱۶ مخلوط‌کن ورتکس[3]

۴-۳-۱۷ لام شمارش سلول‌های خونی[4]

۴-۴ حیوانات

موش‌های نر و ماده سویه C56BL/6 باسنین ۸ تا ۱۲ هفته‌ای مورد استفاده قرار گیرند. در این آزمون استفاده از مخلوطی از سلول‌های حداقل ۲ موش ضروری است.

1- Biohazand safety cabinet
2- Inverted Microscope
3- Vortex
4- Hemocytometer
5- Aliquots

۵ روش کار

کار باید در شرایط عاری از میکروب انجام شود.

۵-۱ آماده سازی معرف‌ها و کنترل

محیط کشت با پایه متیل سلولز را بر اساس توصیه و دستورالعمل‌های کارخانه سازنده آماده کنید.

با کمک یک سوزن ته گرد با اندازه ۱۶ هر ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت را در لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری استریل توزیع نمایید.

لوله‌های حاوی محیط‌های کشت تقسیم شده در اندازه‌های کوچکتر[1] را در فریزری با دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری کنید. قبل از انجام آزمون تعدادی از لوله‌های مورد نیاز حاوی محیط کشت را برای حدود ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری کنید و تا زمان استفاده در مجاورت یخ قرار دهید. از انجماد و ذوب مکرر محیط کشت جداً خودداری کنید.

۵-۲ روش تهیه سیس پلاتین با غلظت ۵۰ میلی مولار(کنترل مثبت)

محلول ذخیره‌ای[2] سیس پلاتین با غلظت ۵۰ mM را با افزودن DMSO به لیوفیلیزه سیس پلاتین آماده کنید. این محلول را به قسمت‌های کوچکتر تقسیم کرده و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری نمایید. قبل از استفاده در آزمون، یکی از قسمت‌های محلول ذخیره‌ای را در دمای اتاق از حالت انجماد خارج کنید و آن را با IMDM حاوی سرم جنین گاوی 2 درصدرقیق کنید تا غلظت سیس پلاتین به ۲ mM برسد.

سپس ۱۵۰ میکرولیتر از این محلول واسطه‌ای را به ۳ میلی‌لیتر محیط کشت با پایه متیل سلولز بیفزایید تا غلظت نهایی سیس پلاتین در نمونه کنترل مثبت به ۱۰۰ میکرومول برسد.

۵- ۳ آماده سازی نمونه های مورد مطالعه

1- Stock Solution

۵- ۳- ۱ این آزمون در مجموع به ۱۲۰۰ میکرولیتر از نانوذرات (دو نمونه ۱۵۰ میکرولیتری برای هر یک از ۴ غلظت) نیازمنداست.

مشخصات نانوذراتی که در محیط آزمون‌های زیستی مطرح می‌شوند باید به خوبی تعیین شود تا تفسیر مناسب اطلاعات و امکان پیشگویی پاسخ های زیستی فراهم آید. به عنوان مثال تغییرات در اندازه و سطح ذرات می‌تواند باعث ایجاد نتایج مختلف در آزمون شود.

برای این آزمون، ذرات باید در محلول فیزیولوژیک ایزوتونیک با pH (۰/۲ ± ۷/۲) تهیه شوند و این محلول باید مشخص باشد. آماده‌سازی محلول باید در شرایط استریل انجام گیرد و میزان LPS با روش‌های ارزیابی آزمایشگاهی تعیین شود(برای اندازه گیری می توانید از ANSI/AAMI ST72 استفاده کنید). به تعداد ذرات در یک میلی‌لیتر و وزن ذرات در یک میلی لیتر باید اشاره شود.

۵- ۳- ۲ نمونه‌های مورد آزمون باید در بیشترین غلظت ممکن و در سه رقت پشت سر هم (۵ : ۱) تهیه شوند. بیشترین غلظت ممکن، غلظتی است که در آن به نظر می‌رسد ذرات به طور یکنواخت در مایع پراکنده شده باشند. بر مبنای بیشترین غلظت مورد نظر، سه رقت دیگر با نسبت ذکر شده تهیه کنید.

۵-۴ جداسازی و شمارش سلول‌های مغز استخوان

۵- ۴- ۱ موش کشته شده را به پشت بخوابانید و سطح شکمی بدن حیوان را با الکل ٪۷۰ بشویید.

۵- ۴- ۲ زیر قفسه دنده شکافی روی پوست ایجاد کنید، بدون اینکه پرده صفاق برش داده شود و یا آسیب ببیند.

۵- ۴- ۳ از محل شکاف ایجاد شده، پوست را گرفته و آن را از سطح بدن جدا کنید تا پاها نمایان شوند.

۵- ۴- ۴ با استفاده از یک قیچی تشریح استریل تیز مفصل زانو را از مرکز قطع کنید. تمام لیگامان‌ها و بافت‌های اضافی را ببرید.

۵- ۴- ۵ استخوان ران را با پنس گرفته و آن را از نزدیک مفصل ران قطع کنید.

۵- ۴- ۶ استخوان درشت نی را از نزدیک مفصل قوزک پا قطع و آزاد کنید.

۵- ۴- ۷ انتهای استخوان‌های بلند را بچینید تا بدنه داخلی مغز استخوان در معرض دید قرار گیرد. استخوان‌ها را در یک ظرف پتری استریل و یا داخل محیط کشت باپایه متیل سلولز استریل گذاشته و آن را بر روی یخ قرار دهید. استخوان‌ها باید از چندین حیوان جمع آوری شوند.

۵- ۴- ۸ با استفاده از یک سرنگ ۳ میلی‌لیتری با انداز سوزن ۲۱ یا ۲۲، ۱ تا ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت سرد IMDM حاوی 2 درصد سرم جنین گاوی را بکشید.

۵- ۴- ۹ نوک سوزن را در بدنه مغز استخوان قرار دهید و مغز استخوان را با محیط کشت شستشو داده و محتویات آن را در لوله ۱۵ میلی لیتری بریزید. این کار را برای تمامی استخوان‌ها تکرار کنید. از همین محیط کشت می‌توان برای جداسازی مغز استخوان ۱ تا ۳ حیوان استفاده کرد. بعد از تخلیه و شستشوی مغز استخوان، کانال مغز استخوان باید سفید دیده شود.

۵- ۴- ۱۰ نوک سوزن سرنگ ۳ میلی‌لیتری با اندازه۲۱ را در زیر سطح محیط کشت نگه دارید و به آرامی ۳ تا ۴ بار سوسپانسیون سلولی را بالا و پایین بکشید تایک سوسپانسیون تک سلولی بدون حباب هوا تشکیل شود.

۵- ۴- ۱۱ سلول‌ها را تا زمان استفاده در محیط کشت بر روی یخ نگه دارید.

۵- ۴- ۱۲ سلول‌های هسته دار را شمارش نمایید. برای شمارش به ترتیب زیر عمل کنید:

یک بخش از نمونه سلولی را با متیلن بلو حاوی ٪۳ اسید استیک به نسبت ۵۰ : 1 (۲۰1 میکرولیتر سلول+۹۸۰ میکرولیتر متیلن بلو حاوی اسید استیک ٪۳) و یا به نسبت ۱۰۰ : ۱ (۱۰ میکرولیتر سلول + ۹۹۰ میکرولیتر متیلن بلو حاوی ٪۳ اسیداستیک)رقیق کنید. سپس از لام هماسیتومتر یا شمارشگر خودکار سلول[۱] (که سلولهای زنده هسته دار را شمارش می کند) برای تعیین تعداد سلول‌های زنده هسته دار استفاده کنید. متوسط سلول‌های شمارش شده مورد انتظار هر موش $۱۰^{۷}$ ×۲–۱ برای استخوان ران و $۱۰^{۷}$ × ۱–۰/۶ برای استخوان درشت نی می باشد.

۵- ۴- ۱۳ اگر تعداد سلول‌های زنده حداقل $۱۰^{۶}$ سلول زنده بود، وارد مرحله بعدی شوید.

---

۱. Automatic cell counter

۶ روش آزمون

۶-۱ لبهٔ در ظرف ۳۵ میلی‌متری کشت را با استفاده از یک ماژیک نوک نازک علامت گذاری نمایید. برای هر نمونه مورد آزمون و کنترل، دو ظرف کشت ۳۵ میلی‌متری در نظر بگیرید.

۶-۲ لوله‌های تقسیم شده حاوی محیط کشت با پایه متیل سلولز را به منظور ذوب شدن در دمای اتاق یا در طول شب در یخچال قرار دهید.

۶-۳ لوله ها را ورتکس نمایید تا از مخلوط شدن کامل تمام اجزاء مطمئن شوید.

۶-۴ سلول‌های مغز استخوان جدا شده برطبق روش کار شرح داده شده در بخش قبل را با محیط کشت IMDM حاوی ٪۲ سرم جنین گاوی رقیق نمایید تا به غلظت ۴×۱۰^{۵} سلول در هر میلی لیتر برسد.

۶-۵ مقدار ۱۵۰میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی و ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت IMDM حاوی سرم جنین گاوی ٪۲ (پایه)را همراه با، PBS (کنترل منفی)، سیس پلاتین (کنترل مثبت) و یا نانوذرات (نمونه مورد آزمایش)، به ۳ میلی‌لیتر محیط کشت با پایه متیل سلولز بیفزایید.

۶-۶ لوله‌ها را ورتکس نمایید تا اطمینان یابید سلول‌ها و اجزای محیط کشت کاملاً با هم مخلوط شده اند.

۶- ۷ لوله‌ها را به مدت ۵ دقیقه به حالت ساکن قرار دهید تا حباب های هوا محو شوند.

۶-۸ برای هر نمونه۲ ظرف پتری ۳۵ میلی‌متری را علامت‌گذاری نمایید: پایه، کنترل منفی، کنترل مثبت و ماده مورد آزمایش. بنابراین هر نمونه دو بار مورد آزمایش قرار می‌گیرد.

۶-۹ سوزن ته گرد با سایز ۱۶ را به یک سرنگ ۳ سی سی متصل کنید. سوزن را زیر سطح محلول آماده شده طبق بند ۶-۵ قرار دهید. حدود ۱ میلی‌لیتر از محلول را بکشید، سپس به آرامی پیستون را فشار دهید و محیط کشت را داخل لوله برگردانید. این مرحله را تا زمانی که حباب هوا دیده نشود، تکرار نمایید.

۶-۱۰ با این سرنگ و سوزن محلول را کشیده و ۱/۱ میلی‌لیتر محلول را در هر یک از دو ظرف ۳۵ میلی‌متری توزیع نمایید. سوسپانسیون سلولی را با برگرداندن آرام و چرخاندن هر ظرف به صورت یکنواخت پخش کنید. ظروف ۳۵ میلی‌متری را بپوشانید و دو تکرار از هر نمونه را در یک ظرف پتری ۱۰۰ میلی‌متری قرار دهید. ظرف ۳۵ میلی‌متری سومی را داخل ظرف پتری ۱۰۰ میلی‌متری

قرار دهید و آن را با ۳ میلی‌مترآب سترون پرکرده و روی آن را نپوشانید. با این کار یک محفظه مرطوب خواهیدداشت. سرپوشی بر روی ظرف پتری ۱۰۰ میلی‌متری قرار دهید.

۶-۱۱ مرحله قبل را برای تمامی نمونه ها تکرار کرده و محیط های کشت را در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس، ٪۵ دی اکسید کربن و ٪۹۵ رطوبت قرار دهید.

۶-۱۲ محیط‌های کشت را به مدت ۱۲ روز گرمخانه گذاری کنید. در روز دوازدهم ظروف را از گرمخانه خارج کنید و به طوریکه که در زیر شرح داده شده است، کلنی ها را تشخیص داده و بشمارید.

محدوده مقادیر شاخص CFU – GM برای موش C56BL/6 در ۸ تا ۱۲ هفتگی عمر ۱۶ ± ۶۴ است.

۷ شمارش کلنی های CFU - GM

۷-۱ این شمارش شامل CFU-G، CFU-M و CFU-GM است. کلنی‌های حاوی حداقل ۳۰ -CFU CFU-M،G و یا دو نوع سلول CFU-GM را شمارش نمایید. کلنی های CFU – GM اغلب حاوی خوشه‌های متعدد بوده و به صورت هسته‌های متراکم احاطه شده با سلول‌ها دیده می‌شوند. سلول-های دودمان مونوسیتی [1] سلول‌های بزرگ به شکل بیضی تا گردهستند و به نظر میرسد که یک مرکز دانه دانه و یا خاکستری داشته باشند. سلول‌های دودمان گرانولوسیتی گرد و درخشان هستند و سایز کوچک و یکنواخت تری نسبت به ماکروفاژها دارند.

دیدن سلول‌های منفرد یک کلنی CFU- GM به خصوص در اطراف کلنی آسان است.

۷-۲ شکل ۱ را برای کلنی‌های مورد مثال زیر ببینید. کلنی‌های تصاویر (الف) و (ب) نمونه‌ای از CFU-GM هستند. کلنی‌های تصاویر (پ) و (ت) نمونه‌ای از CFU-M هستند. تصویر (ث) نمونه‌ای از کلنی منفرد CFU - G را نشان می دهد. تعداد اندکی از کلنی‌های CFU - G که با هم رشد کرده‌اند در تصویر (ج) نشان داده شده است.

1- Monocytic lineage cells

۸ محاسبه

۸-۱ میانگین، انحراف معیار و درصد ضریب تغییرات را برای نمونه های کنترل و آزمون بر طبق فرمول زیر تعیین کنید:

(۱) درصد ضریب تغییرات (CV%) = انحراف معیار (SD) / میانگین (Mean) × ۱۰۰

۸-۲ درصد مهار تشکیل واحدهای تشکیل دهنده کلنی مطابق فرمول زیر محاسبه می شود.

(۲) درصد مهار CFU = (CFU – GM مورد آزمایش _ CFU – GM پایه) / CFU – GM پایه ×100 %

۹ گزارش

۹-۱ درصد ضریب تغییرات برای هر یک از نمونه‌های کنترل و آزمون باید کمتر از ٪۳۰ باشد.

۹-۲ اگر کنترل‌های منفی و مثبت، معیار قابل قبول بند 9-1 را بدست نیاوردند، آزمون باید دوباره تکرار شود.

۹-۳ اگر آزمون معیار قابل قبول را بدست آورد،ولی نمونه مورد آزمایش معیار قابل قبول بند 9-1 را بدست نیاورد، همان نمونه دوباره آنالیز شود.

۹-۴ اگر اختلاف نتایج دو تکرار از یک نمونه مورد آزمایش بیش از ٪۲۰ باشد، آزمون باید دوباره انجام شود.

۹- ۵ تفاوت نتایج نمونه‌های مورد آزمایش از محیط کنترل را تعیین کنید و نشان دهید نمونه مورد آزمایش تحریکی یا مهاری است.

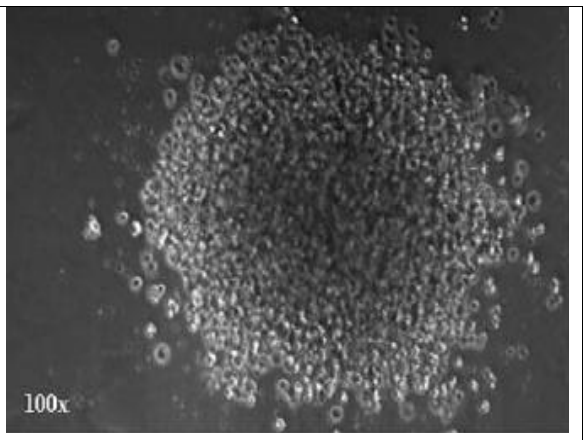
۹-۶ تعیین کنید که آیا یک رابطه دوز - پاسخ[1] وجود دارد.

۱۰ سوگیری و صحت در آزمون:

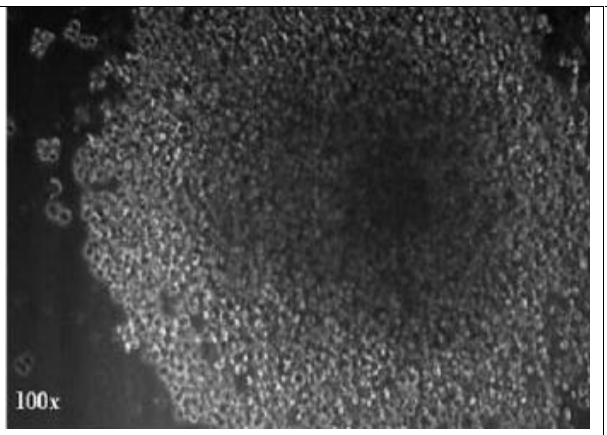
سوگیری[2] و صحت برای این روش آزمون تعیین نشده است.

1- Dose - response
2 - Bias

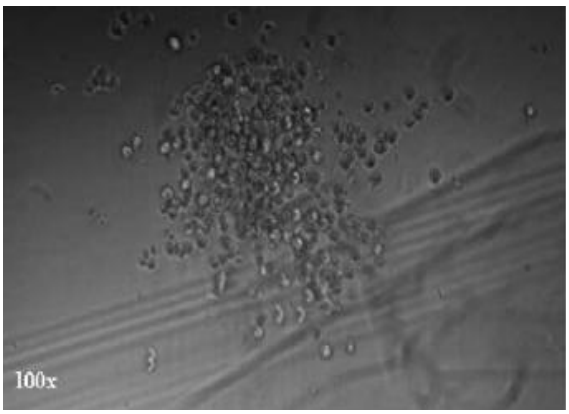
(الف)



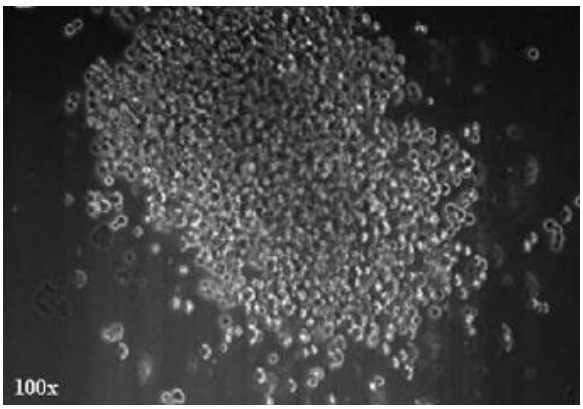
(ب)



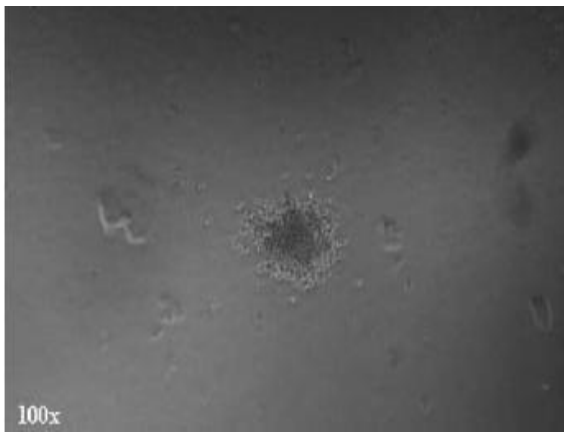
(پ)



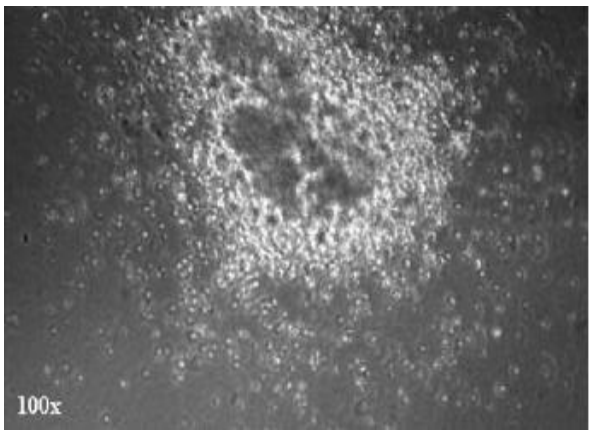
(ت)



(ث)



(ج)



شکل ۱- نمونه‌ای از کلنی های مشاهده شده در روز ۱۲ محیط کشت CFU-GM