



中华人民共和国国家标准化指导性技术文件

GB/Z 16886.22—2022/ISO/TR 10993-22:2017

医疗器械生物学评价 第 22 部分：纳米材料指南

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

(ISO/TR 10993-22:2017, IDT)

2022-12-30 发布

2024-01-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	2
4 总体原则	4
4.1 总则	4
4.2 纳米材料的生物学评价	5
4.3 纳米材料的分类	5
4.4 纳米材料的等同性	6
5 纳米材料的表征	7
5.1 总则	7
5.2 表征参数和方法	8
5.3 参考材料的使用	11
6 样品制备	11
6.1 总则	11
6.2 纳米结构材料特殊注意事项	12
6.3 纳米物体特殊注意事项	12
6.4 储备纳米材料的特征、储存和稳定性	13
6.5 储备液和给予分散体的化学组成说明	13
6.6 储存分散体的表征	14
6.7 储存分散体制备的给予溶液的表征	14
6.8 剂量度量	14
6.9 附加事项	15
6.9.1 内毒素	15
6.9.2 灭菌	16
7 纳米物体从医疗器械中的释放	16
7.1 总则	16
7.2 降解产物	17
7.3 磨损释放的纳米物体	17
7.4 原位处理	17
8 毒代动力学	17
8.1 总则	17
8.2 毒代动力学的影响因素	18
8.2.1 理化性质	18
8.2.2 生物分子吸附	18

8.2.3	接触途径	19
8.2.4	剂量	19
8.2.5	物种和性别	20
8.2.6	测量技术	20
9	毒理学评价	20
9.1	总则	20
9.2	体外细胞毒性试验	21
9.2.1	总则	21
9.2.2	纳米材料对试验干扰的考虑	22
9.2.3	相关剂量和剂量度量的考虑	22
9.2.4	纳米物体动力学的考虑	22
9.3	遗传毒性、致癌性和生殖毒性	23
9.3.1	总则	23
9.3.2	体外遗传毒性试验	23
9.3.3	体内遗传毒性试验	24
9.3.4	致癌性	25
9.3.5	生殖毒性	25
9.4	免疫毒性、致敏和刺激	26
9.4.1	总则	26
9.4.2	免疫毒性	26
9.4.3	致敏	26
9.4.4	刺激	27
9.5	血液相容性	28
9.5.1	总则	28
9.5.2	补体系统激活	28
9.5.3	血液相容性试验的具体考虑	29
9.6	全身毒性	29
9.7	致热性	30
9.8	植入	30
10	表征和试验结果的描述	30
11	风险评估	31
11.1	总则	31
11.2	接触评估	32
11.3	生物学危险识别	33
11.4	风险估计	33
11.5	风险评价	34
12	生物学评价报告	34
	参考文献	35

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件为 GB/T(Z) 16886《医疗器械生物学评价》的第22部分。GB/T(Z) 16886 已经发布了以下部分：

- 第1部分：风险管理过程中的评价与试验；
- 第2部分：动物福利要求；
- 第3部分：遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验；
- 第4部分：与血液相互作用试验选择；
- 第5部分：体外细胞毒性试验；
- 第6部分：植入后局部反应试验；
- 第7部分：环氧乙烷灭菌残留量；
- 第9部分：潜在降解产物定性和定量构架；
- 第10部分：刺激与皮肤致敏试验；
- 第11部分：全身毒性试验；
- 第12部分：样品制备与参照材料；
- 第13部分：聚合物医疗器械降解产物的定性和定量；
- 第14部分：陶瓷降解产物定性与定量；
- 第15部分：金属与合金降解产物定性与定量；
- 第16部分：降解产物与可沥滤物毒代动力学研究设计；
- 第17部分：可沥滤物允许限量的建立；
- 第18部分：风险管理过程中医疗器械材料的化学表征；
- 第19部分：材料物理化学、形态学和表面特性表征；
- 第20部分：医疗器械免疫毒理学试验原则和方法；
- 第22部分：纳米材料指南。

本文件等同采用 ISO/TR 10993-22:2017《医疗器械生物学评价 第22部分：纳米材料指南》，文件类型由 ISO 的技术报告调整为我国的国家标准化指导性技术文件。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会(SAC/TC 248)归口。

本文件起草单位：山东省医疗器械和药品包装检验研究院、国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心、中国食品药品检定研究院、国家纳米科学中心。

本文件主要起草人：侯丽、刘成虎、陈宽、徐丽明、刘颖、孙晓霞、陈亮、谢黎明、邵安良、陈春英、张敏、刘万宗。

引言

本文件旨在为包含、产生或由纳米材料组成的医疗器械生物学评价提供指南。纳米材料术语有多种定义。本文件将使用 ISO 的定义：当一种材料的外部尺寸和内部尺寸在纳米尺度时，即当其尺寸或由长度在 1 nm~100 nm 之间的结构组成时，被认为是纳米材料(ISO/TS 80004-1:2015)。出于监管目的，建议检查是否适用于特定国家或地区的法规定义。其他特征(例如纳米特有的性质)也可以包括在这样的定义中。

在医疗器械表面形成的形态结构也可能具有纳米尺度尺寸。因此，这种结构对器械的生物反应的可能影响也需要被考虑。

在医疗器械的生命周期中可能会产生长度范围为 1 nm~100 nm 的纳米物体，因此，需要进行由于医疗器械在制备、使用、磨损或降解的任一环节产生纳米物体而可能引起的不良影响的评价。这适用于使用纳米材料制造的医疗器械，以及未使用纳米材料制造，但可能产生纳米尺度的磨损或降解颗粒的医疗器械。对于医疗器械生物学评价，了解从此类材料中潜在产生和/或释放纳米物体的知识是有必要的。

GB/T(Z) 16886 中描述的用于医疗器械生物学评价的程序可用于那些包含纳米物体的医疗器械，但这些纳米物体不会从器械中释放出来，因为它们是器械的组成部分。但是，当可能会释放纳米物体时，还需对释放的纳米物体进行安全性评价。除了对医疗器械评价外，还可以对纳米材料的成分或组成进行单独评价。

本文件为经过培训的专业人员提供了在医疗器械评价方面对纳米材料进行生物评价的通用方法，并讨论了如何在评价纳米材料时使用 GB/T(Z) 16886 的其他部分。GB/T(Z) 16886 中描述的各种测定方法可能并不总是适用于纳米材料的测试。纳米材料本身可以以粉末或胶体分散体的形式存在，但也可以作为纳米结构材料或材料和/或医疗器械表面结构，在与基质结合时存在于医疗器械中。通常，需要对纳米材料本身进行评价，而不是像对生物材料或医疗器械进行测试时通常使用的浸提液进行评价。纳米材料在进行通常用于医疗器械评价的试验体系和试验结果的解释时提出了特殊的挑战。

纳米技术、纳米材料的发展以及对此类材料的潜在毒性的评价是新兴领域，本文件仅代表撰写本文时的知识。尽管用于评价纳米材料适宜的工具和方法仍在研发中，但考虑到风险/受益分析，提供有关纳米材料的表征和生物学效应的数据，以解决其在医疗器械领域应用中的安全性问题。

本文件对如何在 GB/T(Z) 16886 所述的风险管理过程中对包含、产生或由纳米材料组成的医疗器械进行生物学评价提供了指导。

GB/T(Z) 16886《医疗器械生物学评价》拟由二十一个部分构成。

- 第 1 部分：风险管理过程中的评价与试验。目的是保护人类免于因使用医疗器械所产生的潜在生物学风险，并在风险管理过程中描述医疗器械生物学评价，将其作为医疗器械总体评价和开发过程的一个组成部分。
- 第 2 部分：动物福利要求。目的是最大限度利用科学合理的非动物试验，确保用于评价医疗器械所用材料的生物学性能动物试验符合认可的伦理和科学原则。
- 第 3 部分：遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验。目的是为已确定具有潜在的遗传毒性、致癌性或生殖毒性的医疗器械提供评价指南和方法。
- 第 4 部分：与血液相互作用试验选择。目的是为医疗器械与血液相互作用评价提供通用要求。
- 第 5 部分：体外细胞毒性试验。目的是为评估医疗器械体外细胞毒性提供试验方法。

- 第6部分：植入后局部反应试验。目的是为评估医疗器械所用生物材料植入后局部反应提供试验方法。
- 第7部分：环氧乙烷灭菌残留量。目的是为经环氧乙烷(EO)灭菌的单件医疗器械上EO及2-氯乙醇(ECH)残留物的允许限量、EO及ECH残留量提供检测步骤以及确定器械是否可以出厂提供检测方法。
- 第9部分：潜在降解产物的定性和定量框架。目的是为系统评价医疗器械潜在的和已观察到的生物降解以及生物降解研究的设计与实施提供基本原则。
- 第10部分：刺激与皮肤致敏试验。目的是为医疗器械及其组成材料潜在刺激和皮肤致敏提供评价步骤。
- 第11部分：全身毒性试验。目的是为评价医疗器械材料导致潜在不良全身反应时提供试验步骤指南。
- 第12部分：样品制备与参照材料。目的是为医疗器械生物学评价中样品制备方法和参照材料提供选择指南。
- 第13部分：聚合物医疗器械降解产物的定性和定量。目的是为用于临床的成品聚合物医疗器械模拟环境的降解产物定性与定量试验设计提供通用要求。
- 第14部分：陶瓷降解产物的定性与定量。目的是为从陶瓷材料获取降解产物定量用的溶液提供方法。
- 第15部分：金属与合金降解产物的定性与定量。目的是为金属医疗器械或可供临床使用的相应材料样品的降解产物提供定性与定量试验设计的通用要求。
- 第16部分：降解产物与可沥滤物毒代动力学研究设计。目的是提供与医疗器械相关的设计和毒代动力学研究的原则。
- 第17部分：可沥滤物允许限量的建立。目的是为医疗器械可沥滤物允许限量的建立提供方法。
- 第18部分：风险管理过程中医疗器械材料的化学表征。目的是为医疗器械成分的定性和定量(必要时)以识别生物危险以及估计和控制材料成分中的生物学风险提供框架。
- 第19部分：材料物理化学、形态学和表面特性表征。目的是识别与评价最终医疗器械材料的物理特性,如物理化学、形态学和表面特性(PMT)的各种参数和试验方法。
- 第20部分：医疗器械免疫毒理学试验原则和方法。目的是为医疗器械潜在免疫毒性方面提供免疫毒理学综述以及为检验不同类型医疗器械的免疫毒性提供方法指南。
- 第22部分：纳米材料指南。目的是为包含、产生或由纳米材料组成的医疗器械生物学评价提供指南。
- 第23部分：刺激试验。目的是为医疗器械及其组成材料潜在刺激提供评价步骤。

医疗器械生物学评价

第 22 部分：纳米材料指南

1 范围

本文件提供了由纳米材料组成或包含纳米材料的医疗器械的生物学评价的考虑因素,以及在医疗器械(或组件)生产过程中未使用纳米材料,但其降解、磨损或在机械处理过程中(如医疗器械原位研磨、抛光等)产生的纳米物体的评价等方面的指导。

本文件适用于以下内容:

- 纳米材料的表征;
- 用于纳米材料测试的样品制备;
- 医疗器械中纳米物体的释放;
- 纳米物体的毒代动力学;
- 纳米材料的生物学评价;
- 结果的描述;
- 医疗器械评价中纳米材料的风险评估;
- 生物学评价报告;
- 在设计、制造、加工过程中预期产生的医疗器械表面纳米结构。

本文件不适用于以下内容:

- 未经过设计、制造或加工应用于医疗器械中的天然和生物纳米材料;
- 块体材料内部的纳米结构;
- 在设计、制造、加工过程中非预期产生的医疗器械表面纳米结构。

注:医疗器械表面非预期产生的纳米结构的示例是挤压划线和机加工/工具标记。

本文件旨在提供一个通用框架,并重点介绍在评估由纳米物体组成、包含和/或产生纳米物体的医疗器械的安全性时需要考虑的重要方面。此外,本文件还指出了与块体材料或小分子化学物质相比,测试纳米材料时发现的几个常见的未预料到的困难和障碍。作为国家标准化指导性技术文件,本文件代表了与纳米材料相关的当前技术知识,没有列出或提供详细的试验方案。本文件能作为聚焦于包含纳米材料测试详细方案的未来文件的基础。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

ISO 10993(所有部分) 医疗器械生物学评价(Biological evaluation of medical devices)

注: GB/T(Z) 16886 医疗器械生物学评价(所有部分)[ISO 10993(所有部分)]

ISO/TR 13014 纳米技术 纳米材料毒理学评价前理化性质表征指南(Nanotechnologies—Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment)

注: GB/T 39261—2020 纳米技术 纳米材料毒理学评价前理化性质表征指南(ISO/TR 13014:2012, IDT)

ISO 14971 医疗器械 风险管理对医疗器械的应用(Medical devices—Application of risk management to medical devices)

注: YY/T 0316—2016 医疗器械 风险管理对医疗器械的应用(ISO 14971:2007, IDT)

3 术语和定义

ISO10993(所有部分)、ISO/TR 13014 和 ISO 14971 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

ISO 和 IEC 维护的用于标准化的术语数据库,地址如下:

——ISO 在线浏览平台:<http://www.iso.org/obp>;

——IEC 电子百科:<http://www.electropedia.org/>。

3.1

聚集体 aggregate

强束缚或融合在一起的颗粒构成的新颗粒,其外表面积显著小于其单个颗粒表面积的总和。

注 1: 支撑聚集体的力都是强作用力,如共价键或源于烧结或复杂的物理缠结。

注 2: 聚集体也被称为次级颗粒,而源颗粒被称为初级颗粒。

[来源:ISO/TS 80004-2:2015, 3.5, 有修改]

3.2

团聚体 agglomerate

弱束缚颗粒的堆积体、聚集体(3.1)或两者的混合物,其外表面积与单个颗粒的表面积的总和相近。

注 1: 支撑团聚体的作用力都是弱力,如范德华力或简单的物理缠结。

注 2: 团聚体也称为次级颗粒,而源颗粒被称为初级颗粒。

[来源:ISO/TS 80004-2:2015, 3.4]

3.3

工程化的纳米材料 engineered nanomaterial

为了特定目的或功能而设计的纳米材料(3.7)。

[来源:ISO/TS 80004-1:2015, 3.4]

3.4

伴生纳米材料 incidental nanomaterial

在某一过程中作为副产品而非特意产生的纳米材料(3.7)。

注 1: 过程包括制造、生物技术或其他过程。

注 2: 见 ISO/TR 27628:2007 的 2.21 中对“超细颗粒”的定义。

[来源:ISO/TS 80004-1:2015, 2.10]

3.5

人造纳米材料 manufactured nanomaterial

为了商业目的而制造的具有特定功能或特定组成的纳米材料(3.7)。

[来源:ISO/TS 80004-1:2015, 2.9]

3.6

纳米纤维 nanofibre

两个维度外部尺度相近且处于纳米尺度(3.12),另一个维度外部尺寸明显大于其他两个维度尺寸的纳米物体(3.8)。

注 1: 纳米纤维可以是柔性的,也可以是刚性的。

注 2: 尺寸相近的两个维度上的尺寸比小于 3 倍,而最长的外部尺寸比其他两个尺寸大 3 倍以上。

注 3: 最大的外部尺寸不一定是纳米尺度的。

[来源:ISO/TS 80004-6:2013, 2.6]

3.7

纳米材料 nanomaterial

任一外部维度、内部或表面结构处于纳米尺度(3.12)的材料。

注 1: 本通用术语包括纳米物体(3.8)和纳米结构材料(3.17)。

注 2: 另见 3.3~3.5。

注 3: 出于监管目的,建议检查特定的国家或地区监管定义是否适用。在本定义中可包括不同的尺寸范围或其他性质。

[来源:ISO/TS 80004-1:2015, 2.4,有修改]

3.8

纳米物体 nano-object

一维、二维或三维外部维度处于纳米尺度(3.12)的离散的物体。

注: 第二和第三外部维度与第一维度正交,并且彼此正交。

[来源:ISO/TS 80004-1:2015, 2.5]

3.9

纳米颗粒 nanoparticle

所有的外部维度均在纳米尺度(3.12)的纳米物体(3.8),其中纳米物体的最长和最短轴的长度没有显著差异。

注: 如果尺寸相差很大(通常超过 3 倍),术语“纳米纤维”或“纳米片”等可优于术语“纳米颗粒”。

[来源:ISO/TS 80004-2:2015, 4.4]

3.10

纳米片 nanoplate

一个维度外部尺寸为纳米尺度(3.12),而其他两个维度的外部尺寸明显大于纳米尺度的纳米物体(3.8)。

注 1: 最小的纳米尺寸指纳米片的厚度。

注 2: 两个明显较大的尺寸与纳米尺度的尺寸相比,大于 3 倍以上。

注 3: 较大的外部尺寸不一定是纳米尺度的。

[来源:ISO/TS 80004-6:2013, 2.4]

3.11

纳米棒 nanorod

固体纳米纤维(3.6)。

[来源:ISO/TS 80004-2:2015, 4.7]

3.12

纳米尺度 nanoscale

处于 1 nm~100 nm 之间的长度范围。

注 1: 那些不是由较大尺寸外推得到的特性主要存在于此长度范围内。

注 2: 影响生物相容性的特性也能发生在较大尺寸,如 100 nm~1 μm 。

[来源:ISO/TS 80004-1:2015, 2.1,有修改]

3.13

纳米尺度现象 nanoscale phenomenon

由于存在纳米物体(3.8)或纳米尺度(3.12)范围而产生的效应。

[来源:ISO/TS 80004-1:2015, 2.13]

3.14

纳米尺度性质 nanoscale property

纳米物体(3.8)或纳米尺度(3.12)范围所具有的特性。

[来源:ISO/TS 80004-1:2015, 2.14]

3.15

纳米科学 nanoscience

对与尺寸和结构相关的、主要在纳米尺度(3.12)的物质的性质和现象的研究、发现和理解,这些性质和现象与单个原子、分子或从相同材料制成的较大尺寸的材料外推得到的显著不同。

[来源:ISO/TS 80004-1:2015, 2.2]

3.16

纳米结构 nanostructure

一个或多个部分处于纳米尺度(3.12)区域的相互关联的组成部分。

注:区域由性质不连续的边界来界定。

[来源:ISO/TS 80004-1:2015, 2.6]

3.17

纳米结构材料 nanostructured material

内部或表面具有纳米结构(3.16)的材料。

注:本定义不排除纳米物体(3.8)具有内部或表面纳米结构的可能性。如果外部维度(一个或多个)处于纳米尺度(3.12),推荐用术语“纳米物体”。

[来源:ISO/TS 80004-1:2015, 2.7]

3.18

纳米技术 nanotechnology

应用科学知识操纵和控制主要在纳米尺度(3.12)的物质,以利用其与尺寸和结构相关的性质和现象,这些特性和现象与单个原子、分子或相同材料制成的较大尺寸的材料性质显著不同。

注:操纵和控制包括材料合成。

[来源:ISO/TS 80004-1:2015, 2.3]

3.19

纳米管 nanotube

中空纳米纤维(3.6)。

[来源:ISO/TS 80004-2:2015, 4.8]

3.20

测试参考材料 representative test material; RTM

一种或几种特定性质足够均匀和稳定的材料,适用于目标量值测量和测试方法的开发,与其他特定性质相比,该目标量值还未进行均匀性和稳定性评估。

[来源:ISO/TS 16195:2013, 3.1, 有修改]

4 总体原则

4.1 总则

纳米材料的制造和使用是因为其具有特定的性能,这些性能与尺寸减小伴随的表面积增加有关。另外, $>100\text{ nm}$ 或 $<1\text{ }\mu\text{m}$ 尺寸范围的材料也能引起与宏观尺度($>1\text{ }\mu\text{m}$)的材料不同的特性。对这种类型的微粒材料,可以考虑按照类似于尺寸范围在 $1\text{ nm}\sim 100\text{ nm}$ 之间的纳米材料的评估进行。

根据 ISO 14971 和 ISO 10993-1 的规定,预期用于人体的任何材料或医疗器械的生物学评价,宜成

为风险管理过程中框架性生物学评价项目的组成部分。风险管理过程适用于包含或由纳米材料组成的器械。风险管理过程还适用于降解、磨损或从机械处理工艺(例如医疗器械原位研磨、抛光)过程中产生纳米材料的器械。同样,这类产品中纳米物体的释放对其安全性评价带来了特殊挑战。纳米材料的安全性评价和风险评估,需要特别关注由相同的化学物质组成的不同纳米材料,这些材料具有不同的毒理学风险,这取决于许多变量,包括纳米材料的尺寸、表面化学、物理化学性质以及预期用途。对于由纳米材料组成或包含纳米材料的医疗器械,安全评价程序宜专门解决与纳米材料安全性评价相关的问题。GB/T(Z) 16886、ISO/TR 13014、ISO 14971 和参考文献[5]、[14]、[15]、[16]、[21]、[23]、[24]、[28]、[46]、[47]和[49]中涉及了医疗器械和纳米材料各个方面的生物学评价。

纳米材料的尺寸与包括 DNA 在内的亚细胞水平的尺寸结构相似,因此(理论上)纳米材料能接触到这些结构并与之相互作用。同样,医疗器械利用具有纳米尺度内部结构,或利用具有涂层、功能化或其他纳米尺度的表面特性特征相关的纳米材料,其纳米结构旨在作为器械发挥功能的一部分,在生物学评价时可能需要涉及其特定且独特的特性。例如,已经表明纳米尺度表面特性能影响细胞排列、细胞形态、细胞信号传导、基因表达和细胞外基质。

鉴于能发生潜在的内部接触,纳米物体的释放和游离纳米材料的使用被认为具有最高潜在风险。

4.2 纳米材料的生物学评价

ISO 10993-1:2009 的附录 A 规定了宜根据器械的类型和与人体的接触时间来进行生物学风险评估程序发展的框架。该框架通常还适用于包含、产生或由纳米材料组成的器械。这些测试宜基于每个器械的特点。由于纳米材料的存在,本文件列出了适用于 GB/T(Z) 16886 系列试验的特殊原则。

ISO 10993-1 提供了风险管理过程的指南,包括危险识别、接触评估和风险估计。尽管纳米材料具有与传统材料不同的特性,但该风险管理过程通常足够稳定且灵活,可为纳米材料的评价提供基础。这个过程中,包括 ISO 10993-1 规定的纳米材料的生物学评价策略、项目内容和 ISO 10993-1 要求的纳米材料相关风险的可接受标准,宜通过知识渊博、经验丰富的专业人员来计划、执行以及出具报告。纳米材料的生物学评价的起始步骤要根据 ISO 10993-1 描述的一般方法来收集关于该特定纳米材料的现有信息。临床和非临床资料的文献综述宜根据 ISO 10993-1:2009 附录 C 的规定进行,以提供关于纳米材料及其预期用途的现有信息的严格和客观的总结。参考文献[55]中总结了寻找纳米材料有关信息的几种方式。按照 ISO 14971 和 ISO 10993-1 的规定,如果生物学安全性评估从现有的数据得到识别出的风险是可接受的结论,则不需要进一步的测试。否则,宜获取其他信息。为了利用现有的数据进行生物学评价,证明纳米材料的等同性是必要的(见 4.4)。

4.3 纳米材料的分类

接触评估和危险识别宜基于最终医疗器械的表征和预期用途。危险识别宜考虑纳米材料的物理化学和毒理学特性,包括添加剂和加工助剂。接触评估宜考虑纳米材料在医疗器械中的浓度、预期用途、接触途径、释放的速率和模式,以及对患者接触情况的估计。纳米材料与最终医疗器械的结合方式能显著改变其接触表征。表 1 是对不同类别的纳米材料和医疗器械的考虑因素。某些器械可能涉及多个类别,宜考虑适合于每个类别的评价。不属于下述类别的任何器械的评价宜遵循 ISO 10993-1 的一般性原则,以及本文件中所列的任何特别考虑因素。

表 1 对于包含、产生或由纳米材料组成的医疗器械进行生物学评价的考虑因素

类别 ^a	医疗器械中纳米材料的类型	按照 ISO 10993-1 进行生物学评价之外的考虑因素
1	表面纳米结构	——与表面纳米结构直接相互作用导致的潜在细胞或组织效应(有利或不利)的考虑; ——由表面释放(断裂)纳米结构物体可能性的考虑; ——由降解、磨损或机械处理过程产生纳米物体潜在可能性的考虑; ——纳米结构表征的考虑(见第 5 章)
2	纳米物体固定或结合在医疗器械内部,且预期不被释放	——与表面结合的纳米物体/纳米材料直接相互作用导致的潜在细胞或组织效应(有利或不利)的考虑; ——器械释放纳米物体潜在可能性的考虑; ——由降解、磨损或机械处理过程产生纳米物体潜在可能性的考虑; ——纳米物体的理化性质表征的考虑(见第 5 章)
3	医疗器械表面或内部的纳米物体/纳米结构,且有意或预期可被器械释放	——对于纳米物体的释放动力学(速率和数量)和医疗器械接触时间的考虑; ——与纳米物体/纳米材料直接相互作用导致的潜在细胞或组织效应(有利或不利)的考虑; ——被释放纳米物体理化性质表征的考虑(见第 5 章); ——纳米物体的毒代动力学和组织分布的考虑(见第 8 部分); ——纳米物体生物学评价的考虑(见第 9 章); ——由降解、磨损或机械处理过程产生纳米物体潜在可能性的考虑
4	纳米物体医疗器械	——纳米物体的理化性质表征的考虑(见第 5 章); ——纳米物体的毒代动力学和组织分布的考虑(见第 8 章); ——纳米物体生物学评价的考虑(见第 9 章)
5	作为医疗器械降解、磨损或机械处理 ^c 过程(如原位研磨或抛光)的产物从医疗器械释放的纳米物体 ^b	——纳米物体的理化性质表征的考虑(见第 5 章); ——第 7 章描述了通过磨损释放或通过原位处理而产生的纳米物体的其他方面的考虑; ——纳米物体的毒代动力学和组织分布的考虑(见第 8 章); ——纳米物体生物学评价的考虑(见第 9 章); ——释放动力学(速率和数量)和接触时间的考虑
^a 一种器械能涉及多个类别的纳米材料。 ^b 纳米物体能从不含纳米物体的医疗器械产生。 ^c 使用降解、磨损或机械处理包含纳米物体的医疗器械能产生新的或非预期的纳米物体。		

4.4 纳米材料的等同性

纳米材料的准确定性和表征是必不可少的。对于纳米材料,其等同性取决于多种因素。仅化学组成是不足以证明其等同性的,因为纳米材料特定的属性还能受到其他一些因素的影响,如其尺寸、形状和表面特性和/或这些纳米材料的来源(制造商)以及制造过程和储存条件。只有在随附资料正确说明以及证明合理的情况下,才能声称为等同性。

通常,使用应用/包含相似纳米材料的其他产品的现有数据,或来自相同物质的相应母体化合物的结果的外推是不适用的,尽管这些产品能指示可能的安全性问题。如果需试验,宜在实际产品和/或任

何能与患者接触的纳米材料上来进行。

5 纳米材料的表征

5.1 总则

了解纳米材料的理化特性对于理解其生物系统的行为至关重要。理化表征是进行特定纳米材料的定性所必要的。与器械结合的纳米材料/纳米物体和/或器械降解、磨损或加工处理过程中产生的纳米材料/纳米物体的理化表征是完成其生物学评价的重要一步。理化表征还能用于筛选潜在的新纳米材料,以使其适合用于拟应用的医疗器械。此外,在特定的介质和条件下,适当的表征对于建立或确认纳米材料的技术参数是必要的。

理化表征解决了下述三个有关纳米材料在医疗器械中使用或从医疗器械中释放的基本问题。

- 化学组成**:它是由什么制成的?
- 物理描述**:它外观如何?
- 外在特性**:它是如何与周围环境相互作用的?

与这些问题相关的理化特性包括了广泛的纳米物体表征。为了与医疗器械中传统材料的评价指南保持一致,纳米尺度材料的理化表征旨在表征器械生物学评价和预期用途(临床应用和接触时间)相关的特性。医疗器械所用材料的化学、理化、形态学和表面特性表征的一般原则均包括在 ISO 10993-18 和 ISO/TS 10993-19 中。医疗器械降解产物的定性和定量在 ISO 10993-9、ISO 10993-13、ISO 10993-14 和 ISO 10993-15 中有明确说明。针对纳米材料的理化表征的详细指南正在日趋完善。最近发布的指南包括 ISO/TR 13014 和 ISO/TR 14187 和欧洲食品、饲料、化妆品原料和医疗器械委员会发布的指南。

ISO/TR 13014 列出了以下毒理学试验中需要表征的工程化的纳米材料的特性:

- 化学组成;
- 纯度;
- 物体尺寸和尺寸分布;
- 聚集和团聚状态;
- 形状;
- 表面积;
- 表面化学;
- 表面电荷;
- 溶解度;
- 分散性。

这些性质宜被视为对器械中使用的纳米材料进行评价的起始点;附加属性的表征可以根据器械的设计、预期用途和磨损特性来确定。可根据具体情况考虑的其他物理化学特性的示例包括:

- 结晶度;
- 孔隙率;
- 氧化还原电位;
- (光)催化;
- 自由基的形成潜力;
- 辛醇/水分配系数(未必适用于固体材料)。

为获取如上所述的所需资料,毒理学家、理化学家、工程师和其他学科领域的专家在为包含特定纳米材料的器械研发相关且可靠的表征程序时,有必要进行多学科合作。

针对性的表征指导原则可适用于特定的纳米材料。例如,单壁或多壁碳纳米管(SWCNT,MWC-

NT)、纳米尺度碳酸钙粉、纳米尺度二氧化钛粉、纳米金颗粒、纳米银颗粒以及纳米黏土¹⁾。

除了上述理化特性的表征,表面结合纳米结构的器械需要从形态学上进行表征。继续探索纳米尺度下医疗器械表面结构的修饰,旨在调控器械与细胞和微生物之间的相互作用。对于表面结构的有效表征所需的测量参数取决于特定的应用。例如 Webb 等提出至少使用以下三个统计学参数作为标准,来描述在细菌黏附研究中界面的纵向和横向纳米结构。

——平均表面粗糙度(R_a):表面高度值与平均平面的平均偏差。

——表面面积差(R_{sa}):由粗糙度引起的表面积增加,即实际表面积和投影表面积之间的百分比差异。如果可以精确测量表面积,则可用本参数。

——峰值计数(R_{pc}):测量谱的峰的数目。

另外,峰高度以及峰间距也是有用的空间参数。

纳米多孔材料正被开发应用于器械,包括药物递送和组织支架。多孔材料的表征包括以下有用信息:

——孔隙或空隙的尺寸和结构;

——孔隙或空隙的密度;

——孔隙或空隙的分布。

纳米材料宜以被交付给最终用户,即最终医疗器械的形式进行表征。取自最终器械上有代表性的样品或与最终医疗器械同样方式加工的材料也可以被表征,以便直接评价纳米材料组件。此外,在进行毒理学研究和生物相容性试验时,可能需要对制造出的纳米材料进行表征。对于生物安全性评价,还需要在测试系统的生物学介质中进行以上纳米材料的理化表征。在测试系统中,这些介质和纳米材料之间的相互作用可以对纳米材料的效应产生巨大的影响。在试验过程和试验结果的评价时,这个因素宜予以考虑。

与体液接触可改变纳米材料的表面表征,从而其改变生物学行为,对纳米材料造成的危险产生影响(见 8.2.2)。

对医疗器械磨损产生的纳米物体的分离和表征仍然是一个挑战。体外模拟原位产生纳米材料/纳米物体时,宜具有临床应用的代表性。

5.2 表征参数和方法

表 2 汇总了用于医疗器械中纳米材料表征起始点的有用基本参数。ISO/TR 13014 提供了与这些生物学评价参数的相关详细信息。

基于 ISO/TR 13014 提供的信息,表 2 还提供了能为每个参数提供定量和/或定性数据的方法。随着对纳米材料的不断研究和探索,其表征方法也将不断改进优化,故该表宜需要动态编译。表中所列出的方法包括某些常规颗粒分析方法,以及专门为纳米尺度材料研发的其他方法。

通常可以使用多种方法来表征特定的理化参数。单一的表征方法可能无法对某个参数(例如粒度分布、表面组成)提供准确的评估。在这种情况下,适用时,可能需要补充方法来进行该属性表征的充分评估;有时可能需要两个独立的方法来进行表征。要注意的是,对使用不同方法所获得的特性结果可能不能直接比较,并且目前几乎没有协调一致的方法对纳米材料进行理化评价,以帮助制定可靠的试验方案。宜根据纳米材料的类型和形式以及器械的预期用途对选择用于表征的方法进行论证。例如,宜至少使用若干指南性文件中给出的一种显微镜技术[例如透射电子显微镜(TEM)、共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)]测定纳米物体尺寸。欧盟委员会联合研究中心(EU-JRC)发布了关于纳米物体尺寸测量的可能性和缺陷的报告。

由于纳米材料的表征往往存在科学和技术上的挑战,因此,宜考虑实验室质量保证程序和最优方

1) 详见 http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_tc_browse.htm?commid=381983。

案。纳米材料技术的选择、纳米材料的分析、特性的解释宜由经过培训且有经验的专业人员进行。在分析过程中,宜谨慎考虑样品制备以确保所获得的数据来自该器械中有代表性的材料。表征过程的各个环节宜仔细记录,以确保结果的透明性和可重复性。所用方法宜被证实能适用于纳米材料的研究。

表2 关键理化表征和测量方法的示例

表征	测量参数	测量方法示例	ISO 有关方法学的指南
化学组成和纯度	单一元素或分子(可表示为化学式)的数量与特性; 非预期成分(杂质)的水平或浓度	X 射线荧光 X 射线光电子能谱 俄歇电子能谱 傅里叶 X 射线衍射(XRD 变换红外光谱)(FTIR),拉曼和其他分子光谱 热重分析 紫外/可见光谱法 扫描电子显微镜+XRD 或能量色散 X 射线光谱仪(EDS) 核磁共振 (单颗粒)电感耦合等离子体质谱(spICP-MS)	ISO 22309 ISO 22489 ISO 24173 ISO 13084 ISO 18144
粒度和粒度分布	粒度: 显示规则几何形状的颗粒的等效球形直径; 颗粒几何形状的一个或几个特定方位的长度 粒度分布: 图形表示,例如直方图,和/或进行统计参数值,例如平均值、中位数和/或众数	动态光散射 小角度 X 射线散射 尺寸排阻色谱法 扫描电子显微镜(SEM)、透射电子显微镜(TEM)、或扫描探针显微镜(SPM)图像分析 微分迁移分析 离心液体沉淀 纳米颗粒跟踪分析 拉曼光谱 激光诱导白炽激光 共聚焦激光扫描显微镜(CLSM) spICP-MS 用于纳米材料分离的切向流过滤,然后进行适当的检测,如 ICP-MS(ISO 10993-14)	ISO 9276(所有部分) ISO 9277 ISO 13318(所有部分) ISO 13320 ISO 13321 ISO 13322(所有部分) ISO 14488 ISO 14887 ISO 15900 ISO 16700 ISO/TS 19590 ISO 20998-1 ISO 21501(所有部分) ISO 22412
聚集/团聚状态	粒度; 相比于初级颗粒的聚集/团聚颗粒总数; 聚集/团聚时的初级颗粒数; 每聚集/团聚时初级颗粒数的分布	冷冻扫描电镜(cryo-SEM)或冷冻透射电子显微镜(cryo-TEM)图像分析 不同的波长下角度依赖性散射 静态光散射 小角 X 射线散射 X 射线衍射(XRD) X 线吸收光谱(XAS) 小角中子散射 流变学方法 离心液体沉淀 激光衍射 纳米颗粒跟踪分析	见粒度的指南 ISO/TR 13097 ISO/TS 12025 ISO 13322-1

表 2 关键理化表征和测量方法的示例 (续)

表征	测量参数	测量方法示例	ISO 有关方法学的指南
形状	与尺寸无关的形状描述； 与尺寸无关的形状描述 的值分布	SEM、TEM、原子力显微镜 (AFM) 或 SPM 图像分析 散射技术 spICP-MS	ISO 16700 ISO 13322-1
表面积	体积和/或质量的比表 面积	根据气体或液体等温吸附的方法 (BET 理 论) 液体孔隙度测定法 图像分析 激光诱导白炽	ISO 15901-1 ISO 15901-2 ISO 15901-3 ISO 18757 ISO 13322-1 ISO 9277
表面纳米结构	尺寸和几何形状	干涉仪 反射计 扫描探针显微镜 (SPM) 及原子力显微镜 (AFM) 扫描隧道显微镜 (STM) 接触式轮廓测定法 非接触式轮廓测定法	ISO 25178
表面化学	元素和分子丰度； 反应性 (化学反应 率)	俄歇电子能谱 X 射线光电子能谱 (XPS) 二次离子质谱 (SIMS) 三维原子探针断层摄影术 能量色散 X 射线光谱仪 电子能量损失光谱法 (EELS) 低能离子能谱 拉曼和其他分子光谱	ISO/TR 14187 ISO 18115 系列标准 ISO 24236 ISO 15471 ISO 18118 ISO/TR 19319 ISO 17973
表面电荷	每单位颗粒表面正负电 荷的净值； Zeta 电位	等电点 电泳光散射 电泳 电渗 电声振幅 胶体振动电流	ISO 20998 系列标准 ISO 13099
溶解性/分散性	溶解性： 在指定的 (或标准) 温度 或压力下溶解在单位质 量或体积的溶剂中的溶 质的最大质量或浓度 分散性： 在指定的 (或标准) 温度 和压力下的分散相的浓 度存在于一个单位质量 的分散介质 (溶剂) 或单 位体积的分散体 (溶剂加 上分散相) 分散相的最大 质量或浓度	没有用于评估纳米物体溶解性的具体方法； 用于纳米材料分离的切向流过滤，然后进行 适当的检测，如 ICP-MS (ISO 10993-14)； 用于评估纳米物体分散性的方法基于粒度/ 粒度分布和聚集/团聚状态 (见上文粒度部 分)	ISO 20998 系列标准 ISO 13099

表 2 中的信息是基于 ISO/TR 13014 的原则。还有其他文件提供了有关纳米材料/纳米物体表征的建议(如 ISO/TS 17200)。

上述大部分的参数和方法是关于纳米颗粒的表征。宜注意的是,其他形式/形状的纳米材料亦能用于医疗器械的生产,如纳米纤维和纳米片。所列出的一些参数或方法可能不适用于其他形式/形状的纳米材料表征。

上述方法有其局限性,因此,宜证实所用的方法适用于要研究的纳米材料。

对特定的纳米材料(如纳米银、纳米尺度氧化锌),能发生溶解或离子脱落。使用切向流过滤法能评价纳米材料在不同生理环境中的溶解,该方法是将纳米材料与其溶解的对应物分离的一种方法。分离出的组分通过电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)定量测定。

5.3 参考材料的使用

纳米材料阳性和阴性对照样品的可用性对于纳米材料安全性测试的可重复性和可靠性至关重要。然而,目前缺少用于纳米材料的阳性和阴性对照样品。因此,已提出使用“测试参考材料”。ISO/TC 229 将“测试参考材料”定义为“一种或几种特定性质足够均匀和稳定的材料,适用于目标量值测量和测试方法的开发;与其他特定性质相比,该目标量值还未进行均匀性和稳定性评估”(ISO/TS 16195)。经济合作与发展组织(OECD)关于人造纳米材料工作组合作项目目前正在使用这种方法,该项目使用欧洲委员会联合研究中心代表纳米材料保存库中的材料进行纳米材料安全性测试。ISO/TS 16195 提供了有关测试参考材料通用要求的指南,以开发用于纳米颗粒和纳米纤维粉末的特性测试、性能测试和安全性测试的方法。

ISO 10993-12 提供了医疗器械的生物学评价中参考材料使用和制备的一般性指导原则。但是,除了纳米材料的尺寸,目前几乎没有任何关于其特性的参考材料。来自于国家和社会机构关于纳米材料颗粒大小评估的参考材料越来越多,包括美国国家标准与技术研究院(NIST,美国)、欧洲委员会联合研究中心(EU-JRC)和联邦材料研究与测试研究所(BAM,德国)。BAM 与 ISO/TC 229 合作维护了目前所有可用的纳米尺度参考材料的全球数据库,见 <http://www.nano-refmat.bam.de/en/>。目前可用的纳米尺度的参考材料包括二氧化钛、胶体二氧化硅、金和单壁碳纳米管。据报道,一些新的参考材料正在被这些组织以及商业组织研发。但是最初研发的重点是用于器械校准作用的纳米尺度参考材料,而不是研发用于测试基准生物学反应的参考材料。

宜注意仅在针对尺寸和形状度量的标准化方案的情况下,使用适当的标准参考材料(SRM)才有意义。方案宜适用于各种成像技术,并要求在最小的人为偏差的情况下具有很高的统计确定性。另外,参考材料也能用作内部和/或外部参考。例如,外部标准能用于校准成像工具的长度比例以用于后续成像,而内部标准则允许在未知范围内包含尺寸标准。

研发一套普遍接受的参考材料,包括对于适用于不同测试系统的适宜的阳性和阴性对照纳米颗粒的共识,已被认为是用于纳米材料风险评估的一个关键性需求。尽管已充分认识到对此类参考材料的需求,但由于实际困难,包括对所表征的材料和特性缺乏共识、重大技术挑战和经济因素,研发工作仍在缓慢进行中。

6 样品制备

6.1 总则

样品制备是对医疗器械及其制造过程中使用的材料进行表征和生物学试验时的关键过程。宜重点考虑对最终医疗器械形式包括器械的有代表性取样、产品浸提液的制备、制备的试验材料的储存和稳定性。ISO 10993-12 中提供了有关这些内容的一般指南。

对于包含或由纳米材料组成的医疗器械的样品制备,有必要考虑一些特殊注意事项(例如,使用纳

米物体分散体代替浸提液)。

注：ISO/TR 16196 中提供了有关纳米材料样品制备和给予方法的特定指南。

6.2 纳米结构材料特殊注意事项

ISO 10993-12 适用于具有内部纳米结构和/或表面纳米尺度结构的医疗器械。纳米结构表面增加了器械的总表面积。如果按照 ISO 10993-12 推荐的按外部尺寸测量表面积,则低估了纳米结构器械的实际表面积。虽然该方法可能被认为是用于样品制备的浸提过程的一种传统方法,但宜意识到患者会接触整个表面。

ISO 10993-12 规定了能根据标准表面积计算需要的浸提介质的体积,此表面积包括样品两面的总面积,而不包括不规则表面的面积。同样的方法适用于具有纳米结构表面的材料。

与 ISO 10993-12 一致,如果模拟临床使用条件或导致潜在危险的测定,则能使用纳米多孔材料的其他表面积和浸提介质体积比。

ISO 10993-12 中描述的浸提技术可能不会导致嵌入式纳米材料和/或固定在基质或表面的纳米材料的释放。只有当表面结合相对弱的纳米材料才能按预期浸提出来。

6.3 纳米物体特殊注意事项

ISO 10993-12 中描述的样品制备的一些要求可能不适用于纳米物体,可能需要考虑其他方面(如颗粒聚集/团聚)。例如,如果只评价残留物/污染物的影响,则可以使用浸提液。另外,纳米尺度允许将纳米材料分散在液体中,以进行纳米材料的生物学评价和风险评估所需的大多数测定。纳米物体可分散在液体中进行大多数生物学评价,从而可对纳米物体进行直接风险评估。按照 ISO 10993-12,通常考虑使用极性和非极性介质进行浸提。但是,宜基于介质的临床相关性和分散性选择纳米物体分散体。分散体经过优化,可在特定的测试系统中递送纳米物体,大多数纳米分散体是在极性溶液中制备和使用的。

与块体(非纳米尺度的)材料或化学物质的试验相比较,纳米物体的小尺寸和潜在的理化性质改变对样品制备提出了重大挑战。影响因素包括增加纳米物体反应性的表面特性,聚集或团聚体的形成,通过水合作用、部分溶解或其他过程导致的分散体中纳米物体转化,以及对纳米物体理化特性和毒理学特性具有潜在强大影响的低水平污染物。同样,培养液中递送至细胞的速率能够受到扩散和重力沉降的影响(见 9.2)。验证测试样品中使用的纳米物体的数量浓度非常重要。

样品制备方案应与度量方法结合起来研发(见表 2)。聚集和团聚限制了通过高通量自动化度量确定粒径分布的微小变化的能力。同时,大量颗粒或纤维的度量才能确定团聚和聚集的程度。了解这些问题对于研发用于纳米物体,包含纳米物体的器械、生成或释放纳米物体的器械的可靠的样品制备方案是必要的。与使用传统材料的器械相比,解决这些问题可能需要大量的精力来致力于样品制备和处理策略的研发。

纳米材料的样品制备时需要重点考虑的是在试验品或试验品组成部分中溶解性和分散性的区别。一些纳米颗粒是部分或缓慢溶解的。溶解性和分散性的区别是非常重要的,因为微粒材料的分散能引起一种不同于从化学组成预测的分子或元素的毒性反应。一种在生物介质中可溶或部分可溶/缓慢可溶的纳米物体可能以分子形式存在于试验体系中。微溶或难溶的纳米材料能以纳米物体的分散体存在于试验体系中。实际上需要仔细分析来确定一个特定的纳米物体在规定的试验条件下是否完全分散、部分溶解(如一些金属)或完全溶解。这些可溶性的纳米物体能出现与非纳米尺度可溶性材料相似的反应。如适用,除了溶解度本身外,还宜考虑溶解速率。

由于纳米物体独特的表面特性,它对样品制备技术非常敏感。纳米物体的分散受纳米物体之间的相互作用和纳米物体与其所处环境相互作用的影响。分散的纳米物体不一定仅以原形存在。除非通过表面电荷或空间效应稳定,否则在溶液、粉末和气溶胶形式中,纳米物体能形成聚集体(由强结合或熔合

的物体组成的物体)和团聚体(微弱结合的颗粒、聚集体或混合物)的次级物体。因此,样品中纳米物体的分散情况和尺寸分布能随时间发生改变。这种情况对浸提液制备和/或储备液和配制的分散体有重大影响,其中 pH 的轻微改变、离子强度或分子成分的存在能显著改变纳米物体的分散状态。因此,在生物学评价中试验样品稳定性的测定是获得有代表性和可重复性结果的一个关键因素。

纳米物体的样品制备可能包括成品或供应商提供的材料的表征、储备液以及制备用于动物或体外研究的给予溶液。制备的具体方法可能因给予途径和递送方法的不同而有差异。在试验样品制备和给予中常见的内容包括:

- 试验材料的特征、储存和稳定性,包括批与批次之间的差异性;
- 试验介质的化学组成;
- 适宜的剂量度量的选择;
- 在按剂量给予之前,对用储备分散体制备样品的表征。

下面列出了与本主题相关的其他信息。宜仔细记录样品制备方案和基本原理,以便在需要时能够重复测试样品。

6.4 储备纳米材料的特征、储存和稳定性

以下是纳米材料制剂的分散和储存宜考虑的一些因素。

- 宜根据最终产品中用于制备纳米材料的工艺来制备储备分散体。其他的制备技术可适合于制备用于生物学评价的分散体。储备分散体的理想特征是具有均匀的物体尺寸和可预测的多分散性。
- 用于分散纳米物体的方法是基于其应用,包括超声处理、搅拌、溶剂使用以及稳定剂(例如表面活性剂)。例如,将化学成分(基团)例如聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸盐或羧酸修饰在纳米物体上,以防止团聚/聚集或增加溶液中的分散性。将小链聚合物(例如聚乙二醇)与纳米物体结合,以防止被单核吞噬细胞系统(MPS)识别,从而增加体内循环时间。将蛋白质或碳水化合物添加到纳米物体中,以体内某些细胞或组织为靶向目标。人们宜认知附着在感兴趣的纳米材料上的化学物质/涂层,因为它们是识别生物效应的关键,并且也可能是污染源。
- 宜谨慎选择用于分散纳米物体的方案,因为它们有可能改变纳米物体的理化特性和毒性。改变毒性的可能机制包括通过研磨使纳米物体破碎和使用分散剂改变表面性质、表面涂层解吸附以及氧化态变化等。宜根据具体情况评价分散方法的效果。当有证据表明纳米材料和/或纳米物体制剂的毒性发生改变时,宜控制或量化在评价分散方法期间观察到的效果。
- 纳米材料宜按照适宜的明确的、受控的方案进行存储。通常考虑避免极端的温度、亮度和湿度。
- 储存和处理方案宜考虑到纳米材料的反应性。
- 宜对用于医疗器械的纳米材料中出现的污染物和杂质进行分析。低水平的污染物或杂质的存在能显著影响纳米材料制剂的理化和毒理学特性,可能干扰分析和试验测定,如细菌内毒素、表面活性剂、残留的溶剂、金属和催化剂等在纳米材料中发现的污染物。污染能发生在纳米材料制造、处理和分散过程中,因此纳米材料样品制备过程中可能需要分析不同制备阶段的污染物。
- 宜进行稳定性评价以确定:
 - 纳米材料的溶解、降解或转化是否随时间而变化(见第 7 章);和
 - 粒度分布或表面电荷是否随时间而变化。必要时宜重新配制储备溶液,并重新表征。

6.5 储备液和给予分散体的化学组成说明

用于生物学评价试验的纳米物体的分散体宜与生理条件一致。例如,用于体外哺乳动物细胞测定

的试验溶液宜为等渗溶液,调整 pH 至 7.4,并且在存在二价离子和蛋白质混合物的情况下使用。用于产生生理条件的化学组成能够对纳米材料的物理化学特性产生意想不到的影响,包括纳米物体的团聚和/或聚集程度。另外,纳米物体本身能够对使用的培养基有影响。表征和记录试验介质和给予溶液的组成是非常重要的,以确保试验条件的重现性。下列参数构成了描述体外试验和体内试验的介质和试验溶液表征的起始清单:

- 离子强度;
- 钙和镁的浓度以及作为来源的阴离子(如 MgSO_4 或 MgCl_2);
- pH 和 pH 缓冲体系的组成;
- 有机添加物(如血清、牛血清白蛋白、抗生素);
- 分散剂的特征和浓度。

6.6 储存分散体的表征

宜详细记录用于创建储存分散体的方法,以实现可重复性。下列参数构成了描述储存分散体表征的起始清单:

- 来自于制造商的信息;
- 在第 5 章中列出的理化特性的分析数据;
- 储存分散体中的质量浓度的测定;(也表示为表面积和计数浓度)
- 以金属为基础的纳米材料,测定可溶性金属离子的浓度;
- 杂质和污染物的特征和测定浓度(如可行);
- 制备的细节,包括形状、体积和用于储存分散体的容器的材料类型等;
- 储存分散体的稳定性(有效期)。

视具体情况可需要考虑其他参数的表征。

宜描述预防污染的步骤(如超纯水和试剂的应用)。当用超声处理制备悬液时,宜考虑探针尖端或容器表面磨损引起污染的可能性。还宜考虑其他来源的污染物。

ISO 10801 和 ISO 10808 提供了用于吸入毒性测试的纳米材料制备和表征的指南。

6.7 储存分散体制备的给予溶液的表征

制备给予分散体的方法宜被详细记录,以能够实现重现性,并帮助解释研究结果。以下参数构成了给予溶液在给予到动物试验或体外系统之前表征的起始清单:

- 6.5 和 6.6 中描述的储存分散体表征中推荐的参数;
- 用于制备给予/样品溶液的介质和制备体积的描述;
- 给予/样品溶液的 pH 和 pH 缓冲体系的描述;
- 应用的分散程序的描述包括超声/涡旋时间和/或能量输入等细节;
- 剂量/样品给予的细节,包括给予体积、混合程序(用于体外试验)和采用超声处理或搅拌样品分散体后的放置时间;
- 从储存液或样品/给予分散体中对子样品进行任何重新分析的详细信息,以在给予结束时或对给予溶液进行调整后验证其性质;

宜详细描述用于提高给予溶液的分散和/或可分散性的步骤并进行论证。

ISO/TR 16196 和参考文献[68]提供了制备用于口服、吸入和皮肤毒理学研究的给予纳米物体分散体的详细建议。

6.8 剂量度量

毒理学研究的剂量水平通常以质量浓度表示。但是,纳米材料的多种属性能影响其毒理学性质。

普遍认为,除了质量浓度外,宜使用其他参数(包括表面积和颗粒数浓度)来充分表征纳米材料的剂量。宜提供足够的表征细节,以使最终用户能够相互转换各种剂量度量,包括质量浓度、颗粒数量和表面积^[72]。然而,并非总是能够精确地测量表面积和/或数量浓度,尤其是在发生团聚时。另外,目前表面积测量限于粉末形式的纳米材料的测定,而液体纳米分散体的此类测量仍在研发中。除非能直接测量颗粒数浓度或表面积浓度,否则它们的不确定性可能会比质量浓度高。

质量浓度可能在某些情况下才适用于描述纳米材料的剂量。例如,当毒性是由纳米物体释放的离子介导的时候,最适宜的剂量度量可能是可溶的离子质量。此外,吸入接触(气溶胶)可能使用其他剂量度量。

纳米材料体外试验中毒理学相关剂量的确定宜考虑碎片沉积的可能性。小的纳米物体(如流体力学直径 $<40\text{ nm}$)与培养的细胞层接触主要通过扩散和对流力决定。因沉降力的额外影响,在细胞培养基中较大的纳米物体和形成的纳米物体聚集体沉降得更快。这些因素以及与培养基中的蛋白质和其他组分的相互作用能影响与培养细胞直接接触的纳米物体数量。

影响沉积机理的参数[例如密度和二元变量(长度和宽度)的大小分布]、到达细胞层表面的浓度(沉积剂量)以及细胞摄取的纳米材料的数量(细胞剂量)能提供更多信息以解释观察到的生物学反应^[72,76,118]。应指出的是,在实践中可能难以测量沉积和细胞摄取。

6.9 附加事项

6.9.1 内毒素

细菌内毒素或脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌的细胞壁组分,目前是致热原的主要类型。内毒素在环境中无处不在,已经被证实是纳米材料的常见污染物。

纳米材料中存在的内毒素污染物能干扰生物学评价试验,导致得出错误的生物相容性结论。因此,通常对储存液和/或材料来源阶段进行的内毒素污染评价是很重要的。

传统的内毒素定量试验可能不适用于纳米材料,因为它们的特性会干扰在此试验中用到的试剂和/或检测方法。如在通常使用的鲎试剂(LAL)试验中,纳米材料能干扰内毒素的反应性、LAL的反应性或反应产物的测定。这些干扰能导致高估或低估样品中的内毒素。另外,可以测定试验溶液中磷脂的存在和组成来排除内毒素的存在。

宜根据具体情况选择评价医疗器械内毒素污染的适当方法。更改后的 LAL 试验方案适用于纳米材料。已经有人提出了用决策树来帮助选择适用于特定纳米材料的 LAL 形式,它有助于了解不同类型的纳米材料试验相关的潜在问题。参考文献[82]和[83]中已经对替代方法及与 LAL 试验相比的优缺点进行了详细描述。

ISO 29701 描述了在基于细胞的体外生物测试系统中使用 LAL 试剂评价纳米材料的应用。这个试验适用于分散在亲水介质的纳米物体样品,这些介质如水、血浆或反应介质同纳米物体在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育适宜的时间。ISO 29701 仅限于用于体外系统的试验样品,但是这些方法也适用于通过非胃肠道途径接触动物的纳米物体。

另一种方法是单核细胞激活测试(MAT),这是一种经过验证的定量方法,它利用了自然的人类发热机制,能用于测试与纳米材料以及其他生物热原(例如酵母、寄生虫和病毒热原)相关的内毒素。

虽然有去除纳米材料内毒素的方法,但这些程序能导致团聚或其他不希望出现的改变。一种预防内毒素污染的推荐的方法是开发纳米材料制造过程中防止污染的规程。

大多数的灭菌方法不能灭活内毒素,注意到这一点非常重要。但是,通过在 $\geq 250\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下至少干热 30 min 能使其灭活(欧洲药典 8.0 的 2.6.14)。另外,欧洲药典 8.0 的 5.1.2 中指出,在高于 $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度下,干热法通常用于玻璃器皿的灭菌和去热原。在这种情况下,可以证明耐热细菌内毒素减少 $\geq 3\text{ log}$,能替代生物学指示剂。上面提到的内毒素灭活方法能改变或降解纳米材料。

6.9.2 灭菌

灭菌是医疗器械临床前生物学评价和成品使用的重要考虑因素。

——在试验时,在含有蛋白质和营养物的介质中添加非灭菌的纳米物体分散体可能导致污染的微生物如细菌、真菌和病毒的生长。微生物污染能干扰试验体系和混淆试验结果,因此纳米材料制备需要灭菌以防止微生物污染。

——终产品经常需要灭菌以消除潜在的微生物污染。

参考文献[87]和[88]综述了纳米材料灭菌的可用方法,包括:

- 高压蒸汽灭菌法;
- 过滤除菌;
- γ 辐照;
- 环氧乙烷。

高静水压已经被建议作为一个额外灭菌方法,但是这个方法还需要进一步改善以提高其消除细菌芽孢的能力。

上面列出的常用灭菌方法能够改变或降解纳米材料。灭菌产生的潜在影响是材料特异性的,可能包括:

- 分解;
- 尺寸和形状改变;
- 聚集状态;
- 杂质的类型和浓度;
- 降解特征;
- 稳定性;
- 材料的生物相容性特征;
- 和/或功能行为。

例如,玻璃转变温度和/或熔点低于 120 °C 的聚合物,通过高压蒸汽灭菌法的热灭菌能改变其机械性能。可用于热敏感材料的 γ 辐照或环氧乙烷灭菌方法能产生自由基,从而产生有毒的降解产物。灭菌后宜对纳米材料或含纳米材料的产品进行表征,以说明因灭菌过程而引起的任何改变。

无菌过滤是一种对热和化学敏感的纳米材料的替代方法^[87],包括通过孔径为 0.22 μm (220 nm)的膜过滤器进行过滤。因此,不适用于包含具有约 220 nm 或更大粒径片段的纳米材料。通常,无菌过滤不能用于高黏度悬浮液的灭菌。而且,纳米物体能吸收或黏附到过滤器的纤维上,从而降低纳米物体的浓度。

因为灭菌的影响有可能是材料特异性的,因此灭菌对纳米材料特性的影响需要具体情况具体分析。可能需要对特定的纳米材料进行几种方法的测试,以选择最理想的灭菌方式。

灭菌引起的纳米材料改变可能有长时间的影响。例如,用 γ 辐照或环氧乙烷灭菌时,自由基的形成是瞬时的,但也能启动级联反应而导致降解产物的形成和/或产品功能的改变。然而,已经证实自由基清除剂(如组氨酸或苯丙氨酸)的添加能保护以藻酸盐为基质的生物材料的降解。宜建立一个适用于检测灭菌纳米材料和/或终产品在有效期内变化的稳定性程序,以确定是否发生此类变化。

在某些情况下很难确定纳米材料适用的灭菌方法。在无菌条件下加工能解决这种情况。

7 纳米物体从医疗器械中的释放

7.1 总则

在类似于预期使用条件的生理条件下,可能需要对潜在释放的纳米物体进行全面的定性和表征。

宜在生物环境下对纳米物体的释放动力学、数量、迁移和生物蓄积进行评价。

7.2 降解产物

ISO 10993-9 提供了一个框架和起始点,以解决医疗器械潜在降解产物的定性和定量问题。根据 ISO 10993-9:2009 的附录 A,在以下情况下宜考虑进行降解研究:

- a) 器械被设计为可吸收的;
- b) 器械的预期植入时间超过 30 d;或
- c) 该材料(多个)系统的相关信息提示,与人体接触期间能释放出有毒物质。

ISO 10993-13、ISO 10993-14 和 ISO 10993-15 分别包含了聚合物、陶瓷、金属以及合金降解的一般性原则。

伴有离子释放的腐蚀也能导致纳米尺度颗粒的释放。对于某些纳米材料,已知能从释放的离子中形成新的纳米物体(例如纳米银)。

7.3 磨损释放的纳米物体

许多医疗器械可能在预期使用过程中随时间磨损并释放纳米物体(如颗粒、纤维、薄片、碎片)至周围环境。鉴于某些纳米物体具有纳米尺度尺寸、大比表面积和高反应活性,它们能高效地结合生物成分,具有生物持久性,因此这是一个特别值得关注的问题。因此,如果满足以下条件,宜妥善解决由于磨损而引起纳米物体释放的问题:

- a) 该器械是一种纳米材料;
- b) 该器械具有一种纳米材料涂层;
- c) 该器械在正常使用条件下会与生物组织产生摩擦,或在其组件之间或与黏合剂或复合材料之间发生摩擦;或
- d) 制造残留物可能包括伴生纳米材料。

ISO 17853 描述了关节置换植入物在人体和关节模拟器中产生的磨损颗粒的制样方式。它规定了从关节置换植入物周围取下的组织样本中分离和表征聚合物和金属磨损颗粒的设备、试剂和测试方法,这些样本是在修复手术、尸检以及关节模拟器测试液的样本中获得的。这些程序中的某些程序当然可以适用于从人类生物体液(例如滑液)中颗粒的分离和表征。

在本文件中宜注意的是,即使在医疗器械(例如植入物、牙科填充物)制造过程中没有使用纳米材料,也能由于磨损而产生纳米物体。

7.4 原位处理

不论原医疗器械是否含有纳米材料,某些医疗器械的原位机械处理(如抛光、研磨),例如在牙科手术时也可能产生纳米尺度材料。宜在风险评估中考虑这一情况。

8 毒代动力学

8.1 总则

与纳米材料相关的主要风险被认为与组成单个纳米材料的游离纳米物体、离子或组分的存在或释放有关。医疗器械中的纳米材料能以游离、固定或嵌入的方式存在,每一种方式都有释放纳米物体进入人体的潜力。

纳米物体的动力学特点能通过吸收、分布、代谢和排泄/清除(ADME)这些潜在的连续过程来描述。其毒代动力学研究需要被视为含有纳米材料的医疗器械的毒理学风险评估的一部分。只有当纳米材料具有从医疗器械中释放的潜力,并且可以被吸收、分布、代谢和/或排泄时,才需要进行毒代动力学

研究。ISO 10993-16 给出了关于如何开展毒代动力学研究的框架。总的来说,该标准适用于纳米材料,但可能要进行一些调整,如标记技术、动物模型、研究周期、剂量策略和分析技术。

据报道,给予途径、纳米物体的大小或其聚集/团聚、表面特性(化学和电荷)、动物种属、剂量和给予方法等因素都会影响动物模型的毒代动力学。当纳米材料用于测试系统时,应该意识到,一些需要确定的特性能够受到影响,而且在很大程度上是依赖于周围环境的(例如组织培养基、血液/血清、蛋白质)。与环境的这种相互作用能导致纳米材料本身的瞬时性演化,如通过获得/脱落的蛋白质涂层、纳米物体聚集体/团聚体的形成,以及纳米材料的其他变化。这样的变化能影响纳米材料的表征,从而影响其毒理学特征。

因此,如果风险评估的结论是需要进行毒代动力学研究,则宜说明影响该研究设计、研究进行和结果解释的因素。

8.2 毒代动力学的影响因素

8.2.1 理化性质

几项研究显示,尺寸和尺寸分布、形状、电荷、聚集和团聚、亲水性以及表面结构等纳米材料的特性可以影响 ADME 行为。例如,据报道较小的纳米颗粒(10 nm~15 nm)分布广泛,更大的纳米颗粒易于聚集在单核吞噬细胞系统(MPS)的器官中,尤其是肝和脾器官,这些器官在过滤血液中老化或破损红细胞(RBCs)和血液其他微粒的过程中起重要作用。研究表明,由于肝脏内皮细胞裂隙的尺寸(宽度为大约 200 nm),因此大于 200 nm 的纳米颗粒更易于在脾脏而非肝脏中蓄积。对尺寸范围为 1.4 nm~200 nm 的金纳米颗粒的研究发现了类似的结果,肝脏中纳米颗粒的积累随着其粒径的增大而增多。细胞水平的研究显示,大于 100 nm 的纳米颗粒能被细胞通过不同内吞途径摄取,如网格蛋白或细胞膜穴样内陷介导的内吞作用。较大的纳米颗粒不太可能具有皮肤穿透性,而较小的可进入较深的表皮、真皮和较底部的细胞层。

在决定纳米材料与生物分子^[99]和生物系统的相互作用中,纳米材料表面的理化性质起着至关重要的作用。已知诸如亲水性、疏水性和电荷之类的表面性质会影响蛋白质的吸附、吸附的稳定性和强度以及吸附的生物分子的性质(见 8.2.2)。所谓的封端剂能用于通过共价键或通过非共价化学相互作用与纳米物体表面结合来稳定纳米物体。这些封端剂旨在防止纳米物体聚集。封端剂的实例包括有机小分子、水溶性聚合物、多糖、脂质、蛋白质和表面活性剂。封端剂能影响结合稳定性和/或毒性。

研究发现一些理化性质可影响纳米材料的毒代动力学。10 nm 或更小的纳米颗粒有更快的尿路排泄速率和更广泛分布。亲水性涂层[例如聚乙二醇(PEG)]使血液循环时间延长。同样对于 20 nm 的硅纳米颗粒,其在肝脏和脾脏的蓄积量要高于 80 nm 的硅纳米颗粒。20 nm 和 80 nm 的硅纳米颗粒均由尿液排泄,而 80 nm 的硅纳米颗粒排泄速率要大于 20 nm 的。报道指出直径小于 12 nm 的物体可透过血-脑屏障。另外,表面电荷控制“冠”的形成(见 8.2.2)以及与细胞膜的相互作用也可以影响毒代动力学。然而到目前为止,哪一参数最显著影响 ADME 仍是一个悬而未决的问题。

8.2.2 生物分子吸附

生物环境中的纳米材料更倾向于在其表面快速吸附蛋白质,形成所谓的蛋白“冠”。据报道,该“冠”是由强结合蛋白内核和外层的快速交换分子组成的双层系统。值得注意的是,蛋白冠不是静态的,而是能根据纳米物体所处的直接环境而改变。此外,其他生物分子,例如脂质,也能黏附到纳米材料表面。血清蛋白冠的形成增强单核吞噬细胞系统的细胞对其识别和摄取。这通常导致纳米物体从血液中相当快速地清除,并通常进入肝脏和脾脏,这是单核吞噬细胞系统的关键器官。

蛋白冠的结构和组成取决于纳米材料的合成特征(即材料固有特性,例如尺寸、形状、组成、电荷和疏水性)、生理环境的性质(例如血液、间质液、细胞质)和接触的持续时间。

蛋白冠改变了纳米材料的尺寸和界面组成,赋予纳米材料不同于其合成特征的生物特性,导致所获得的生物特性影响了一些生物学效应,包括生物信号传输、动力学、输运、蓄积和毒性。要注意的是,生物体液的生化组成、离子强度和酸度依据组织和细胞的不同而存在显著差异。吸附在纳米物体上的蛋白质的性质和量以及周围的生物成分,决定了包括纳米物体细胞识别、内化(例如通过巨噬细胞)及相应结果在内的细胞反应的性质和程度。

而血浆和血清介质对识别吸附于特定纳米材料的蛋白质是有用的。与生物间室有关的模拟液的使用可以帮助评估生理条件下纳米物体的转归。模拟液能用于确定吸附于纳米材料表面的生物分子,并对生命周期内纳米材料的转换进行评价。OECD 赞助计划档案中也已经包括了使用模拟液的信息。例如,Osmond-McLeod 等采用生物模拟液(Gamble's 溶液)来评估不同类型碳纳米管的持久性。

由于纳米物体与环境的相互作用,介质(如分散液)能影响纳米物体的毒代动力学。一些介质通过改变纳米物体的尺寸分布影响了其团聚,而其他介质影响了物质与其表面的结合。宜最好与其他毒性试验采用相同的介质。简而言之,对纯纳米材料以及测试系统中使用的纳米材料进行适宜的表征是至关重要的。

纳米材料表面结构能影响纳米材料与蛋白质的相互作用/吸附、循环/分布,并最终影响其毒代动力学。纳米材料的表面化学组成和结构特点的重要性在于它们决定了其与生物系统主要的交互程度、性质和后续的级联结果。表面分子可以是纳米材料固有的天然结构或者旨在改变纳米材料的表面特性而预期添加的部分,从而赋予纳米材料特定功能。例如,表面涂层能用于改变纳米颗粒的表面特性,以防止聚集或团聚,促进优选蛋白质吸附或提高靶向特定组织或细胞的作用。

8.2.3 接触途径

接触途径能改变纳米材料/纳米颗粒的表面以及体内纳米物体的生物分布。基于使用部位,纳米材料表面的分子黏附作用能够影响被释放纳米材料的动力学。这些情况中,血清蛋白冠的形成可能增强单核吞噬细胞系统(MPS)细胞的识别和摄取。这通常导致纳米物体从血液中相当快速地清除,并通常进入肝脏和脾脏,这是 MPS 的主要器官。已经发现的表面处理技术,例如聚乙二醇化的纳米材料,会延迟静脉注射纳米材料后的血液清除。对于除了静脉以外的大多数接触途径,大部分的纳米物体停留在接触部位的附近组织或局部引流淋巴结。从局部释放的纳米物体能直接进入体循环,或经由淋巴引流间接进入体循环。

气管内使用后移位出现的金纳米颗粒(1.4 nm)显示了其器官分布模式,肾脏比肝脏摄取更高,而静脉给药后肝脏是主要的靶器官。因此,从医疗器械中释放的纳米物体能被不同的生物分子覆盖,这取决于接触途径(例如经静脉血管内导管和气管内插管)。当前数据表明,纳米物体通过皮肤的全身摄入是有限的。皮肤吸收取决于纳米颗粒的性质、部位解剖结构(皮肤厚度)和皮肤屏障的完整性。另外机械运动和化学物质能增强吸收。如果与肺接触,纳米材料在肺中的分布将取决于其特性,其中纳米物体的尺寸是一个重要因素。当啮齿类动物鼻腔接触纳米物体后,可以观察到纳米物体通过感觉神经输运至大脑。

几乎在所有类型的器官和组织中均已发现了纳米物体,这使得预测其靶器官变得很困难。在不同器官中发现的纳米材料的水平通常很低,这对纳米材料的定性和定量提出了挑战。

8.2.4 剂量

如果纳米物体的接触剂量大于其清除能力,则会在体内蓄积。沉积在肺泡中的纳米物体主要被肺泡巨噬细胞吞噬,最终被转运到黏液纤毛活动梯并通过气道机械清除。如果接触超过其清除,则导致清除过载/达到饱和和毒代动力学改变。在血液中,纳米物体主要通过 MPS 的器官中吞噬细胞的摄取而被清除。然而,高剂量或重复性接触的纳米材料进入血液,例如超出了肝和脾吞噬细胞的吞噬能力,在这种情况下,纳米颗粒将重新分布到其他器官。研究还发现血液中纳米物体的接触间隔时间能影响其

毒代动力学。

8.2.5 物种和性别

在物种和性别之间的生理学和解剖学有所不同,因此,不能排除这导致了纳米物体毒物动力学的改变。性别差异的毒代动力学研究结果表明,雌性大鼠比雄性大鼠更容易发生纳米银及其衍生物的肾脏蓄积。研究也发现了在不同物种之间存在毒代动力学的差异。当小鼠、大鼠和仓鼠以吸入方式与二氧化钛的纳米物体接触时,观察到纳米物体在小鼠和大鼠肺中清除受到干扰。因此,在小鼠和大鼠肺脏的纳米物体负载要高于仓鼠。Brown 等人通过对比大鼠和人类之间的肺脏颗粒物质的清除率,发现大鼠具有比人更快的清除率。即使具有相同的靶器官,纳米物体在器官内的定位也可能是不同的。研究毒代动力学的物种和性别支持全身毒性研究,因此在选择物种和性别时宜考虑毒代动力学和全身毒性研究的一致性。鉴于性别方面的信息有限,宜进一步研究该问题。

8.2.6 测量技术

为了测量组织和器官中的纳米材料,纳米材料或其元素组成须在生物背景下被检测到。据此,纳米材料既能通过放射性、荧光标记方法来测定,也能替代地通过其元素组成,如使用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)分析方法进行检测。依赖于元素组成分析的缺点是无法告知用户纳米材料的性质(即它是否以纳米物体的形式还是降解为元素的形式存在)。单颗粒的 ICP-MS(spICP-MS)可克服该限制。spICP-MS 是一个相对较新的技术,对于表征和定性纳米颗粒是非常有用的,能够提供关于元素的化学组成、尺寸、尺寸分布和数量浓度的相关信息和分析。此外,spICP-MS 能够通过区分具有不同毒性的元素离子和纳米颗粒,提供关键信息来评估包含或沥滤出纳米物体的器械的风险水平。

标记技术也有缺点,如标记物能从纳米材料中释放,和/或它能改变纳米材料与环境间的相互作用,从而影响其毒代动力学行为。选择标记技术时,宜考虑标记物与纳米物体之间结合的稳定性及其检出限。具有低检出限的方法可能不能检测未经重新处理的组织和器官中极低水平的纳米材料。对一些分析技术(如 ICP-MS),有必要对测试样品进行额外的处理过程,以便于增加该技术的灵敏度。如果通过增加剂量或重复给予来保证在组织/器官中纳米材料的可检测性,则会使 MPS 系统的纳米物体达到饱和,从而改变纳米材料的毒代动力学(见 8.2.4 中的讨论)。

9 毒理学评价

9.1 总则

因为已知纳米材料显示出与其块体形式不同的理化特性(例如机械、化学、磁、光或电),因此预期纳米尺寸材料会影响发生于细胞、亚细胞和生物分子水平(例如基因和蛋白质)的不同生物学效应(包括细胞摄取)的生物学行为是合乎逻辑的。因此,在接触纳米材料之后,能够预期产生与传统材料所诱导的不同的毒理学效应。

纳米物体具有在人体中全身移位并被给予部位下游的组织吸收(见第 8 章毒代动力学)的潜力。它们不仅有跨越细胞膜的潜力,还有透过细胞核和线粒体膜以干扰或阻断 DNA 合成和影响细胞其他功能的潜力。

当与生物环境接触时,纳米材料与定量和定性水平的蛋白质相互作用,这是由生理环境(例如血液、血浆、细胞质等)的性质和纳米材料的特性所决定的。同样地,当纳米材料接触试验介质时,根据其固有性质和接触条件,纳米材料预期会干扰和/或影响环境;然后纳米材料能表现出与相应块体材料不同的行为。因此有必要对器械生物学评价试验方法进行专门的验证。与医疗器械类似,试验终点的选择将取决于接触的时间和部位。然而,实际试验方法的选择还取决于纳米材料的特性,因为这些特性能干扰各种测试方法。

宜避免纳米材料毒性试验中已知的几个缺陷(见 9.2~9.8 的具体试验)。此外,未来随着毒理学和纳米材料转归方面的认知增长,更多试验方法的缺陷会显现出来。因此,保持纳米材料测试的最新技术水平至关重要。

潜在生物相互作用不直接依赖于分子的浓度或数量,而依赖于纳米材料/纳米物体本身。纳米毒理学的剂量-反应关系可能不是传统的质量或浓度单位,而是纳米物体数量或纳米材料/纳米物体的总表面积。

除表征外,宜记录试验条件的详细描述,包括下列内容:

- 对于试验中使用的纳米物体的剂量描述中,宜至少记录三个参数:质量、颗粒数量和表面积,允许各种剂量度量间的切换或计算(ISO/TR 13121);
- 混悬/重悬介质;
- 试验介质(例如特定百分比的血清);
- 介质的特性(pH、盐、表面活性剂等);
- 宜列出任何介质添加剂和其对纳米物体的影响,如分散、聚集等;
- 宜表征在特定介质中的离子释放;
- 宜记录在重悬/混悬介质和测试介质中的悬浮状态;
- 容器材料。

宜认识到,在一些领域正在研发替代的试验方法来代替、减少和优化体内动物试验。只要可能,经验证后,也宜考虑这些试验以评价医疗器械中使用或释放的纳米材料。

ISO/TR 16197 描述了人造纳米材料的毒理学筛查方法。

9.2 体外细胞毒性试验

9.2.1 总则

通常,细胞毒性被认为是细胞功能的损伤,包括但不限于质膜完整性破坏、细胞器功能的干扰和细胞骨架破坏。损伤取决于这些物质的浓度。与医疗器械中使用的纳米材料有关的细胞毒性的评价,包括将培养的细胞与器械和/或器械的浸提液直接(直接接触)或通过扩散(间接接触)孵育。体外试验旨在确定哺乳动物细胞的生物学反应,以及医疗器械和材料在其成分中的潜在细胞毒性作用。纳米物体的细胞毒性选择性依赖于毒物的细胞敏感性、特定受体的存在或摄入机制。因此,在评估纳米材料细胞毒性时,宜特别注意体外试验的选择。除了选择相关的细胞培养模型外,还宜考虑纳米物体特有的参数。

ISO 10993-5 描述了评估医疗器械体外细胞毒性可接受的标准试验方法。这些方法包括中性红摄取、集落形成、MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide]和 XTT{2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide} 试验,它们评估以下内容作为细胞毒性指征:

- 细胞摄取;
- 细胞裂解;
- 细胞生长抑制;
- 细胞集落形成;
- 代谢活性;和
- 对细胞的其他影响(例如形态学、膜损伤等)。

虽然这些方法仅被接受用于传统材料的器械,但在考虑到纳米材料的物理化学性质,这些方法能够并已经应用于纳米材料。两种体外测试都提出了测试策略,包括评价现有数据与预期接触场景的相关性。

在体外研究中纳米物体一般会被细胞摄取。一旦进入细胞内,纳米物体能与生物组分相互作用并扰乱细胞功能。纳米物体在细胞内的定位将取决于其物理化学性质、尺寸和剂量。由于纳米物体在体内主要趋向于最终在 MPS 细胞中,考虑在吞噬性细胞系(如 RAW264,7 鼠巨噬细胞、THP-1 人类已分化巨噬细胞)和非吞噬性细胞系(如 3T3 鼠成纤维细胞、L929 鼠成纤维细胞、HaCaT 人角质细胞)进行体外细胞毒性试验(ISO 10993-5、ISO 19007 附录 A)。

据报道,一种与细胞毒性有关的机制是氧化应激,氧化应激会触发对氧化还原电位敏感的信号通路的激活,最终将导致参与促炎反应的细胞因子和趋化因子的产生。特别是当纳米材料通过活性氧(ROS)诱导细胞毒性时,纳米物体不一定进入细胞。对于通过离子释放诱导细胞毒性的纳米材料能够存在类似情况,例如氧化锌和银纳米物体。

一些参数在进行体外细胞毒性试验时被认为是至关重要的。下面给出了示例。

9.2.2 纳米材料对试验干扰的考虑

在评价纳米材料毒性时宜考虑几个已知的缺陷。当评价纳米材料体外细胞毒性时可能存在很多干扰。由于电荷和光学性质,纳米材料能够干扰依赖于比色测定和/或荧光剂的试验方案。与营养物质的相互作用,例如吸附,可能是细胞毒性测定假阳性结果的另一个原因。

具体地,已知纳米物体与测定中使用的染料,如 MTT、XTT、乳酸脱氢酶(LDH)和二氯荧光素(DCF)等会发生相互作用。而且,一些纳米物体本身能分散/吸收光线从而干扰比色法中的测量。当采用比色法时需要考虑这些方面。除直接干扰以外,宜注意纳米物体能直接结合/吸附生物介质导致测量值的变化。在测定读数前,结合适宜的对照以及通过离心除去纳米物体,能降低同一纳米物体产生的数据变异性。一个科学合理的解释可能需要确认不同方法的几种测试结果。

9.2.3 相关剂量和剂量度量的考虑

当使用体外试验方法时,对于细胞毒性评价,待测试的纳米物体的剂量在一个较宽的范围内是非常重要的(ISO 19007)。除此之外,意识到不同剂量度量的存在和使用相关剂量度量表示任何剂量反应关系也是重要的。确定纳米物体适宜的剂量度量对于在细胞培养模型中进行细胞毒性评价来说是一个挑战性的问题。纳米颗粒的质量、表面积和数量均已被建议为重要的剂量度量,并被 OECD 层面的组织考虑到。

9.2.4 纳米物体动力学的考虑

在体外细胞培养模型中,可溶性化合物通过扩散到达细胞,而纳米物体能通过沉积[聚集的纳米颗粒(NPS)]和扩散(单颗粒)与细胞接触。有报告称这些过程主要是尺寸依赖性的。聚集不但受纳米物体的物理化学特性(决定它们与其环境的相互作用)的影响,也受培养基和培养条件的影响。

颗粒在细胞培养系统中的有效尺寸和密度是它们团聚/聚集状态、填充密度和形状共同作用的结果。这些性质能够对在培养中通过扩散和重力沉降传递至细胞的速率产生重要的影响。另一方面,据报道,团聚状态在体外会影响氧化应激介导的剂量-反应曲线。

由于相对低的沉降力,以质量小为特征的纳米物体能保持悬浮状态,这限制了它们与细胞的接触,以及在培养模型中,传递纳米物体的细胞黏附于培养皿底面的剂量。因此,宜考虑纳米物体在溶液中受介质密度和黏度、粒径、形状、电荷和密度等影响的独特动力学。

取决于这些因素,纳米物体能够通过扩散、沉淀或团聚而影响其接触和转运到细胞的水平。所以,根据所使用的系统/模型,纳米物体的标称剂量和有效剂量(即影响细胞的颗粒的质量、数量或表面积剂量)之间有很大的差异,这导致了所评估的效应与实际效应之间的差异。这些问题能够通过应用计算机模拟,如体外沉降、扩散和剂量测定(ISDD)与多路径颗粒剂量测定(MPPD)模型,以生成沉积的纳米材料的剂量曲线。

9.3 遗传毒性、致癌性和生殖毒性

9.3.1 总则

ISO 10993-3 说明了以下生物学方面的医疗器械危险识别和试验策略：遗传毒性、致癌性和生殖发育毒性。ISO 10993-3 一般适用于已识别或未知的可能有遗传毒性、致癌性和生殖毒性的医疗器械或其组件的评价。与相应的块体材料相比，纳米材料具有不同的遗传毒性、致癌性或生殖毒性特征。在下面的段落中讨论了对纳米材料特殊的考虑。有两种主要类型的遗传毒性损害：致突变性和诱裂性，这两种损害都宜进行评估。

纳米材料的遗传毒性试验的具体策略已有描述。鉴于部分纳米材料遗传毒性结果报道存在矛盾之处，故评价纳米颗粒遗传毒性的作用宜基于具体问题具体分析的原则。然而，当一些研究显示了一个阳性的遗传毒性结果而其他研究没有显示时，对于风险评估来说，此纳米颗粒宜被认为有潜在的遗传毒性。一些研究结果为阴性但并没有相关性，因为未证明有 DNA 暴露（例如 Ames 试验结果阴性）。

某些纳米物体能穿过细胞膜、进入细胞核并与核 DNA 和蛋白相互作用。另外，在细胞分裂期间核膜消失时，纳米物体和 DNA 之间也能直接接触。由于其反应性，金属纳米物体的遗传毒性和致癌性似乎受到高度关注。一些金属纳米颗粒如银纳米颗粒、金纳米颗粒和镍纳米颗粒的遗传毒性已被证明。然而，也有遗传毒性阴性结果的报道。Hansen 等人对大鼠的研究显示，具有纳米尺寸和细微尺寸（微米尺度）的金属镍颗粒肌肉植入后发展为横纹肌肉瘤。

纳米物体在与同等尺寸的细胞成分相互作用后能够产生自由基，还能够诱导 DNA 损伤或影响有丝分裂过程的染色体分离，从而导致对细胞分裂的干扰和细胞转运混乱。相反，也有报道说单壁碳纳米管(SWCNT)能减轻超声波诱导的 DNA 损伤。

纳米材料的遗传毒性作用也是间接机制的结果，包括促氧化作用或 DNA 修复抑制。

引起炎症反应的氧化应激和细胞异常凋亡被认为是由纳米物体引起的一些非遗传毒性事件。这些事件易导致细胞发生癌变。这些在体外和体内模型中细胞应答的评价能作为引发间接 DNA 损伤可能性的指标。已观察到两种 TiO_2 （锐钛矿和金红石）不同应答与活性氧(ROS)的产生有关。最具比较性的结果是在人上皮细胞和肺成纤维细胞中产生 ROS。参考文献[174]中的结果表明，基于晶体结构（锐钛型或金红石型）与非晶体 TiO_2 的组成（尺寸大于 $10\ \mu\text{m}$ ），不同的 TiO_2 颗粒的反应性存在差异。

在 Park 等的研究报告中，研究者表示由锌、银及铝构成的纳米颗粒在人肺泡细胞中表现出相似的毒性。另外，人类流行病学的研究表明，通过吸入接触的金属纳米颗粒和霍奇金淋巴瘤发病之间存在关系。除慢性炎症和肺超负荷引发的肿瘤的情况（见 9.3.4）外，纳米颗粒致癌作用的数据很少。

总之，遗传毒性试验的阴性结果不得不谨慎考虑。为排除直接遗传毒性作用，一个重要的问题是细胞靶区（核）潜在接触于组织的体外研究和/或体内研究。然而，宜注意间接作用（如因 ROS 的诱导）也是遗传毒性的原因。

9.3.2 体外遗传毒性试验

由于纳米物体摄取和 DNA 接触的不确定性，用于遗传毒性试验的细菌回复突变试验(ISO 10993-3)可能不适用于纳米材料的致突变性检测。然而，研究显示在 Ames 细菌回复突变试验中，几个纳米物体进入了鼠伤寒沙门氏菌。在可见光辐照聚乙烯吡咯烷酮试验中，C60 造成了沙门氏菌菌株 TA102、TA104 和 YG3003 的弱基因突变。当在细菌回复突变试验得到阴性结果时，如何解释（和给出结论）是一个问题。

对于纳米物体的遗传毒性试验，推荐哺乳动物细胞系统，因为它们有摄取纳米物体的可能。下列试验通常用于评估纳米材料的体外遗传毒性。

——哺乳动物细胞体外基因突变试验（小鼠淋巴瘤 tk 试验，MLA），或次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸

(HPRT)基因突变试验。MLA 试验能同时检测基因突变和染色体损伤(形成大集落和小集落)。

- 检测细胞遗传损伤的体外微核试验与基因突变试验(如 HPRT),或检测小规模序列改变的小鼠淋巴瘤试验(点突变)。
- 彗星(单细胞凝胶电泳测定)试验。根据试验条件检测多种类型的 DNA 损伤(例如单链 DNA 或双链 DNA 断裂,氧化碱基和 DNA 交联),如双链断裂是中性彗星;单链断裂是碱性彗星;氧化损伤取决于添加的酶。

对于体外遗传毒性试验,可能存在与 9.2 中描述的相似的缺陷。此外,还有一些需要考虑的具体问题。

加入肝代谢成分 S9 的价值取决于纳米材料的基材、涂层和其他添加剂。虽然无机颗粒可不会被代谢活化,但其他材料可被活化。对于一些无机纳米物体(例如金属氧化物纳米物体)的检测,加入肝代谢成分 S9 可能是无用的,因为纳米材料的化学组分可不被代谢。然而,对于含有有机成分或化学实体(例如基于聚合物的碳纳米材料)的纳米材料,可能会发生代谢转化。另外,S9 或其他蛋白,例如血清,能覆盖纳米物体的表面从而影响它们的摄取和反应性。因此,宜考虑是否加入肝代谢成分 S9。

微核试验能用于纳米材料的测试。当方案需要使用细胞松弛素 B(cyt-B)识别已分裂细胞时,宜确定纳米材料的胞吞作用和/或胞吐作用是否不受 cyt-B 影响,或进行在接触期和可能摄取后加入 cyt-B 的一系列试验。已知 cyt-B 能影响纳米物体的细胞摄取。

9.3.3 体内遗传毒性试验

当考虑进行体内试验时,宜采用适当的方法确认纳米物体到达靶器官。如果不能证实,可能需要在能被证明纳米物体被其摄取的不同靶器官进行第二个体内试验,以证明不存在体内遗传毒性。体内亚急性和/或亚慢性毒性研究能被用来确定该纳米物体的分布。组织内的分布信息能用来指导体内遗传毒性试验的选择,以保证被测试的器官与纳米材料的分布和积累相关。靶器官未接触所研究的纳米物体是体内遗传毒性试验的一个缺陷。

相关文献已描述了将遗传毒性试验与其他体内试验相结合的建议。

对于每种研究方案,宜考虑预期人群的接触途径,并证明靶器官的接触情况。毒代动力学研究的结果能用于证明接触的器官。

下列试验通常用于评估体内遗传毒性:

- 啮齿类动物红细胞或骨髓微核试验;
- 啮齿类动物骨髓染色体分析;
- DNA 链断裂分析(体内彗星试验)。

宜论证和记录如何选择合适的测试系统。

当采用其他体内试验系统获取遗传毒性额外信息时,该决定宜是合理的,并使用基于证据的理由进行记录。

对于如单细胞凝胶测定(彗星试验)等任何体内遗传毒性试验,建议基于毒代动力学试验和/或亚慢性体内试验以识别靶器官。

几个转基因动物模型可用于测定体内接触后的 DNA 损伤(OECD TG 488,2013)。这些模型之一是 Lac-Z 模型转基因小鼠模型,其已被用来评价二氧化钛纳米物体的体内遗传毒性。该模型由 pUR288 质粒(含有 LacZ 报告基因)同型结合地插入染色体 3 和 4 头-尾序列的 C57Bl/6 小鼠制成。该小鼠模型可用于评估多个器官的致突变性,使其成为研究接触化学试剂后遗传毒性作用和修复机制的宝贵体内模型。

在 OECD TG488 提到了其他转基因模型,已有充足的数据支持这些转基因模型在该 TG 中使用的

有 lacZ 噬菌体鼠(Muta™小鼠²⁾), lacZ 质粒小鼠, gpt delta(gpt and Spi-) 小鼠和大鼠, lacI 小鼠和大鼠(Big Blue®³⁾)。c II 阳性选择试验能用于评价 Big Blue®和 Muta™小鼠模型中的突变。通常将转基因啮齿动物模型中的诱变评价为突变频率。但是, 如果需要, 对突变进行分子分析能提供更多信息(OECD 488)。

9.3.4 致癌性

人类基因组不断暴露于 DNA 损伤剂如活性氧、紫外线和有遗传毒性的化学物质。很多体外和体内研究已发现纳米材料诱导 DNA 损伤和突变。遗传毒性和癌症之间的联系是公认的, 所以这些研究结果对于预测纳米材料的致癌性是有用的。然而, 棒状纳米物体引起的慢性炎症可能发挥关键作用, 因为它可能导致氧化物质水平升高。尽管可获得大量有关遗传毒性的信息(见 9.3.1), 包括许多纳米材料的矛盾结果, 但对纳米材料致癌性的理解水平是有限的。

众所周知遗传毒性和慢性炎症能导致致癌性。还有报道称生物持久性和慢性炎症诱导诱发了肺肿瘤。这些作用可由指定的“超负荷”剂量导致。生物持久性主要由纳米物体的尺寸和形状(例如纤维)的化学组成决定。研究表明一些纳米材料诸如纳米二氧化钛和碳纳米管(CNTs)与动物模型中肿瘤发生有关。可能的机制包括 DNA 损伤和炎症过程中 ROS 的产生。

若人类存在高剂量或慢性接触的情况, 宜考虑评价致癌风险。最常见的评价化学物致癌性的体内试验是 EC B.32 及 OECD 451 中描述的致癌性试验和 EC B.33 及 OECD 453 描述的慢性毒性/致癌性联合试验。对于医疗器械, ISO 10993-3 描述了致癌试验。另外, 与两年致癌性研究相比, 转基因动物如 rasH2 鼠模型可用作短期替代试验。

但是宜注意, 此类试验的使用宜根据具体情况进行评价, 因为尚未证明其适用于纳米物体。

9.3.5 生殖毒性

虽然纳米材料的生殖毒性数据很少, 但探索其对生殖器官、生殖细胞系、胚胎发育和子代的潜在影响越来越引起人们的兴趣。因为纳米颗粒能够穿透生物屏障, 所以它们有穿越生殖系统屏障(例如血-睾屏障和胎盘屏障)影响精子的活力和功能以及胚胎发育的可能性。已显示一些纳米物体依靠其类型及试验条件/模型穿过生殖组织屏障, 如血-睾丸屏障和胎盘屏障。在最近的综述中得出的结论是, 纳米颗粒可从呼吸道转移到胎盘和胎儿, 但这样的不良反应也能继发于母亲的炎症反应。与 DNA 分子相互作用导致的遗传物质损害也能导致突变和影响下一代的生殖和发育。

根据风险评估中医疗器械的接触和使用决定是否需要生殖毒性试验。如果基于医疗器械的风险评估, 需要对所用纳米材料进行生殖毒性评估, 宜按照 ISO 10993-3 的要求进行。

当足够及充分的证据表明纳米材料或其代谢物不会到达生殖系统器官, 则无需进行生殖毒性试验。这方面的证据可基于吸收、分布、代谢和排泄(ADME)的研究数据。

当没有证据排除其接触生殖系统器官时, 宜考虑进行试验, 尤其是在下列情况时:

- a) 可能直接接触到生殖组织、胚胎或胎儿的长期或持久接触的医疗器械;
- b) 储能医疗器械;
- c) 可吸收或含有可沥滤纳米材料/纳米颗粒的器械, 且尚未证实可完全清除的。

宜注意有些接触方法是不推荐使用的, 因为它们能干扰胎儿发育。例如, 腹膜内接触能导致受试纳米物体直接注射到子宫或穿过子宫壁, 从而直接影响到发育中的胚胎/胎儿。而且, 仅经“鼻子”吸入接

2) Muta™小鼠是由 HRP Inc.提供的产品的商标。给出这一信息是为了方便本文件使用者, 并不表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果, 那么可使用这些等效产品。

3) Big Blue®是 Stratagene 的商标。给出这一信息是为了方便本文件使用者, 并不表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果, 那么可使用这些等效产品。

触可能不适用于怀孕雌性动物,因为动物始终保持在应激状态且无法摄食和进水。

除了 ISO 10993-3, OECD 421 也能用于收集纳米材料可能的生殖毒性的初始信息。该试验的结果也能用于初始风险评估,并且有助于决定是否需要进行额外试验。如果认为有必要进行额外试验,根据筛选试验的结果,宜视情况按照 OECD 414、OECD 415、OECD 416 或 OECD 422 进行。

9.4 免疫毒性、致敏和刺激

9.4.1 总则

ISO/TS 10993-20 中提供了免疫毒理学的概述,尤其是提到了医疗器械的潜在免疫毒性。

ISO 10993-10 描述了医疗器械及其组成材料潜在刺激和皮肤致敏的评估步骤。该文件包括:

- 刺激试验前的考虑,包括皮肤接触方面的生物模拟试验和体外方法;
- 详细的体内(刺激和致敏)试验步骤;
- 结果解释的关键因素。

免疫系统接触纳米物体能导致炎症和过敏性/自身免疫反应。其程度和反应类型取决于纳米物体的抗原特性、佐剂效能、炎性作用以及其激活补体系统的能力。然后免疫应答能够被激发或抑制。

9.4.2 免疫毒性

迄今为止,大多数研究的纳米材料都是纳米物体,它们一旦进入体循环后最终会进入在免疫系统中起关键作用的 MPS 细胞(例如巨噬细胞、树突状细胞或朗格汉斯细胞)中。因此,需要特殊考虑纳米材料的潜在免疫毒性。通常,通过重复接触毒性试验(例如 28 d 或 90 d)评价免疫毒性,通过此试验能检测到的免疫抑制和/或免疫刺激的第一指征。ISO/TS 10993-20 给出了免疫毒性试验的通则。对于医疗器械,免疫毒性研究通常包括长期植入研究(ISO 10993-6 和 ISO 10993-11)。对于纳米物体,需考虑可替代的接触途径如全身接触的静脉途径,例如,文献已报道其用于纳米银。

由于免疫系统的复杂性,体外模型提供了可靠的、更好的研究免疫细胞功能的方法。纳米材料对免疫细胞功能的影响能够通过评价特定免疫细胞系中的信号通路,如核因子 kappa B 通路来研究。美国国家癌症研究所纳米技术表征实验室已发表大量体外测试方法,特别适用于纳米颗粒及其对免疫细胞影响的研究(<http://ncl.cancer.gov/working-assay-cascade.asp>)。除很多其他终点外,这些试验预期评估如吞噬作用、趋化性和巨噬细胞一氧化氮产生等指标。

已有一些纳米材料对免疫系统作用的综述。纳米物体已被用作半抗原或半抗原载体,这表明它们能够发挥影响免疫系统的佐剂活性。对纳米银颗粒,发现静脉内接触 28 d 后其对免疫系统的影响是全身毒性最敏感的指标。

2007 年发布的一个方法专门用于评价化学物质免疫毒性的动物模型。世界卫生组织(WHO)已在化学安全国际计划(ICPS)发布 3 个环境健康准则文件以应对免疫毒性(EHC 180)、致敏性(EHC 212)和自身免疫性(EHC 236)。纳米材料免疫毒性的 EHC 文件正在准备中。

9.4.3 致敏

纳米物体和纳米材料可能会导致致敏,然而,致敏的可能性是相对未知的。此外,纳米物体与蛋白质相互作用导致纳米物体/蛋白质复合物形成,其作为一种继发效应能导致致敏。另外,需考虑针对作为纳米物体/蛋白质复合物一部分的蛋白质的可能免疫反应。关于蛋白质冠的形成见 8.2.2。

到目前为止,这已被记录为纳米材料唯一类型的(超)过敏性反应是基于补体激活的假性过敏反应[C 补体活化关联性类过敏反应(CARPA),见 9.5.2]。

现有文献描述的主要是纳米颗粒缺乏致敏能力。在 ISO 10993-10 中描述了包括 Buehler 试验(BT)、豚鼠最大化试验(GPMT)、局部淋巴结试验(LLNA)、人体斑贴试验(HPT)和改良 GPMT(表面应用 GPMT)的各种试验。包括在这些试验中的是金纳米壳(150 nm)、银纳米颗粒(10 nm)、氧化锌纳

米颗粒(20 nm)、二氧化钛纳米颗粒(20 nm~100 nm)、聚苯乙烯胶乳珠(50 nm)、C60 富勒烯(1 nm)、二氧化硅纳米颗粒(7 nm~10 nm)和碳纳米管(1.8 nm~60 nm)。

由于皮肤的屏障功能,BT、LLNA、HPT 和改良 GPMT 致敏试验可能对许多纳米材料无效。纳米物体可能无法到达致敏的靶细胞和器官、皮肤树突细胞和引流淋巴结。因此,阴性结果不能被解释为纳米材料无致敏特性,这种阴性结果是由于纳米材料不能穿透皮肤表面导致的。在改良 GPMT 试验中,试验物质未与完全弗氏佐剂(FCA)同时注入,而是局部应用于 FCA 注射的(炎性)点。需要更多的研究来探讨这个问题。如果得到证实,那么可能需要研发新的纳米材料特异性的致敏试验。

为响应欧洲禁止对化妆品成分进行动物试验的禁令,以及欧盟《关于化学品注册、评估、许可和限制的法规》(REACH 法规)专门针对非动物测试方法的法规,多种体外致敏测定法被研发出来。其中已被最广泛应用的是直接肽反应性测定法(DPRA)、人细胞系激活试验(H-CLAT)、KeratiNoSens⁴⁾和 SenCeeTox⁵⁾。目前,还不清楚这些体外测定法是否能够评估工程化的纳米材料的致敏潜力。

9.4.4 刺激

根据 ISO 10993-1,宜考虑在一种适宜模型的相应部位(例如皮肤、眼和黏膜)上进行刺激试验以确定医疗器械、材料和/或其浸提液的潜在刺激作用。此要求也适用于纳米材料。进行的试验宜按照 ISO 10993-10 并与使用或接触的途径(例如皮肤、眼、黏膜)和时间相适应。

纳米物体在与皮肤、眼睛或黏膜接触后,其各种性质能影响其摄取;这些性质包括(但不限于)尺寸、形状、表面积、表面电荷、表面能/活性、溶解性、聚集状态、多分散性和离子溶解动力学。较大的纳米物体不太可能有皮肤渗透性,而较小的纳米物体能到达更深的表皮、真皮和较底部的细胞层。此外,还宜考虑功能化纳米物体的有效尺寸(即流体动力学半径),因为这将决定它们与角质细胞的相互作用,影响接触后的渗透。形状也能影响皮肤渗透性,球形纳米材料显示出比细长纳米材料更高的渗透性。

纳米材料的主要化学组成也能影响纳米材料引起的潜在刺激性。一些研究表明,金纳米物体渗透到皮肤深层,而银和二氧化钛纳米颗粒留在角质层。有证据表明,特定纳米物体(例如基于碳的树枝状聚合物)能够在一定程度上穿透皮肤。然而,当分别按照 OECD 404 和 OECD 405 进行体内试验后,单壁碳纳米管被发现具有最小皮肤和眼刺激性。纳米物体的表面组成对皮肤渗透性的潜能也是重要的。例如,已报道表面电荷影响量子点渗透和细胞因子释放。实际上,纳米物体涂层的表面功能化或衍生化是产生毒性的原因,而不是纳米物体本身。因此,在设计试验方法和解释试验结果时宜格外慎重。

大部分发表的数据表明完整甚至晒伤的皮肤是阻碍纳米材料渗透的良好屏障,跨越表皮层的皮肤渗透不会发生。然而,毛囊、汗腺和由于机械损伤(例如割伤、擦伤)、皮肤病(例如皮炎、银屑病、湿疹)、病理学状态(例如感染、炎症)和光损伤(例如晒伤)而受损的表面更容易通过皮肤摄取纳米材料。另外,使用某些化妆品成分能增加皮肤渗透性。

对于与患者非完整皮肤接触的材料和器械,宜考虑皮内反应试验评估纳米材料局部组织反应。皮内反应试验可用于不适宜于用皮肤或黏膜试验测定刺激的医疗器械(如植入或与血液接触的医疗器械)。由于经过皮内导入绕过了角质层,因此,与皮肤接触途径相比,该途径纳米物体可具有更高的刺激纤维细胞的潜能。该试验对疏水性纳米材料也可能是有用的(见 ISO 10993-10)。对于其他临床接触途径,可能通过纳米材料局部应用评估刺激。

在当前的 ISO 10993-10 的方案中,附录 B 列出了作为特殊刺激性试验的黏膜刺激试验。需根据材料和器械的具体使用条件和接触途径合理选择这些试验方法。对一些纳米物体的研究显示,在检测这

4) KeratiNoSens 是 Cyprotex 的商标。给出这一信息是为了方便本文件使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果,那么可使用这些等效产品。

5) SenCeeTox 是 Cyprotex 的商标。给出这一信息是为了方便本文件使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果,那么可使用这些等效产品。

些材料引起的潜在有害影响时,与皮肤刺激试验相比,眼刺激试验具有相当的或更强的敏感性。发表文献中使用其他黏膜刺激方法检测纳米物体的信息很少。

已经进行了各种尝试来评价和验证体外皮肤刺激模型,作为测试纳米材料的替代方法。然而,在选择模型和研究设计时,应该考虑到许多因素。虽然一些研究显示与体外和皮肤刺激模型等同的结果,但其他研究报道了由于纳米物体与检测试剂或白细胞介素相互反应的干扰导致的可能假象。关于比较不同类型皮肤模型在评估纳米材料中的有效性的研究也比较缺乏。

牛眼角膜浑浊和渗透性试验(BCOP)和 EpiOcular^{TM(6)} 眼刺激试验(EIT)被用于评价一些纳米材料的眼刺激能力。在 EpiOcularTM 眼刺激试验(EIT)中仅对纳米银观察到了刺激性,而在 BCOP 中观察到了不同的结果。一些干粉纳米材料[金属氧化物(ZnO、TiO₂、CeO₂)、无定形物 SiO₂ 和 MWCNTs]、三个有机染料、石英和滑石粉在两个试验中的结果均是阴性的。

9.5 血液相容性

9.5.1 总则

宜对直接或间接接触血液的包含纳米材料的医疗器械进行血液相容性评价。此外,即使是预期非血液接触的器械,如果毒代动力学研究显示来自医疗器械的游离纳米颗粒可能易位到全身血液循环中,那么也宜考虑血液相容性。

ISO 10993-4 提供了评价医疗器械与血液相互作用的通用要求。它描述了:

- a) 按照 ISO 10993-1 规定的预期用途和接触时间对接触血液的医疗器械进行分类;
- b) 器械与血液相互作用基本评价原则;
- c) 根据具体器械分类,结合试验基本原理和科学依据选择组合相应试验的原则。

根据初始过程或待测系统将血液相互作用分为几类:血液学、溶血、血栓形成、凝血、血小板激活和补体系统激活。

这些参数连同下面讨论的具体考虑也应用于纳米材料的血液相容性评估。由于它们的尺寸,纳米物体可能迁移并到达血液循环系统,在那里它们能引发血栓效应和血小板激活。因此宜考虑评估纳米结构材料、含纳米材料器械和从与循环血液直接或间接接触的器械释放的纳米物体的血液相容性。

许多在血液中可能发生的医疗器械的反应都和器械与血液接触的面积有关。因此,器械表面积与全血(WB)接触体积的比率(cm^2/mL)是血液相容性评估的重要因素。其他影响与血液相互作用的因素包括几何结构和表面化学。宜考虑采用适宜的体外和体内模型对纳米材料进行剂量反应试验,以判断上述适宜的血液相互作用类别的安全性。另见 ISO 10993-4。

9.5.2 补体系统激活

补体系统通过材料的调理作用,参与针对非自我实体的先天性免疫防御,从而令巨噬细胞对材料进行识别和摄取。据报道,纳米物体和补体系统之间的相互作用受尺寸、形态和表面等几个因素的调节。血液中纳米尺度的材料导致的补体系统激活异常增强能诱发显著炎症反应。因此,补体激活宜作为纳米材料的生物风险评估的一部分,特别是如果它们预期与循环血液直接接触,或游离纳米尺寸颗粒有可能迁移至全身血液循环。

补体激活能够导致急性超敏反应。这种特定类型的超敏综合征被称为 C 补体活化关联性类过敏反应(CARPA)。已有大量关于这种被聚乙二醇(PEG)化的脂质体和其他纳米尺度的物体诱导的补体级联激活的报告。像 CARPA 这样的诱导物包括以下种类:脂质体药物、胶束溶剂、放射造影剂、碳纳米管、基于脂质体和聚合物的纳米药物、PEG 涂层囊泡,以及其他基于脂质和磷脂甲氧-PEG 共轭稳定化

6) EpiOcularTM是由 MatTek Corporation 提供的产品的商标。给出这一信息是为了方便本文件使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果,那么可使用这些等效产品。

制剂。

9.5.3 血液相容性试验的具体考虑

血液相容性是对接触血液的纳米材料的关键考虑。这是因为血液中的蛋白被立即吸附在纳米物体表面,导致级联反应,最终导致医疗器械的成功或失败。根据不同的尺寸/表面积和其他固有的或获得的表面特性,纳米材料能够导致不同的血液相容性结果。实际上,已有报道称尺寸和表面粗糙度在血液血清蛋白吸附程度、血小板黏附和激活、全血凝固动力学方面均起重要作用。另见 8.2.2。

尽管使用 ISO 10993-4 中描述的常规方法能合理地直接评价表面具有纳米结构的材料,但游离纳米物体的血液相容性评价更有挑战性。由于它们的表面积/体积比要比块体材料高,因此,一旦异物进入体循环,大量的血清蛋白可轻易吸附到游离的纳米物体上,从而破坏随后血液中发生的一系列级联反应。而且,游离纳米物体一旦与血液接触,其聚集/团聚潜力可能会改变血小板、凝血因子和血管内皮细胞的相互作用。鉴于这些体外试验的潜在干扰因素,在得出关于游离纳米物体血液相容性任何结论前,宜特别注意所使用方法的重现性、可靠性和灵敏度。值得注意的是,美国试验和材料协会发布了一个用于分析纳米颗粒溶血性的标准试验方法(ASTM E 2524),该方法改编自通常用以评价块体材料溶血性质的 ASTM F 756。

宜注意纳米颗粒能引起内皮细胞释放促炎和促凝因子(如 TNF- α 、IL-6、IL-8、MCP-1 和组织因子)。可在内皮细胞和单核细胞共培养模型中检测纳米颗粒的促炎和促凝潜能。所以,建议除血液相容性基本筛选外,也宜检测内皮细胞和/或单核细胞激活及纳米颗粒与内皮细胞和单核细胞相互作用(例如,通过评价细胞黏附分子标志物如 CD54/CD106/CD62E、促炎细胞因子如 TNF- α 、IL-6、IL-8、MCP-1 和促凝因子)。

9.6 全身毒性

纳米材料的全身毒性不能通过相应块体材料的全身毒性进行预测。这主要是因为它们具有在体内移位和到达传统材料难以到达的器官的能力。纳米物体被描述为可能穿越所有的保护屏障包括核膜、血-脑和胎盘屏障。因此宜考虑纳米物体的全身毒性。

当要了解纳米材料全身毒性的可能性时,其溶解度是需要考虑的一个关键参数。与医疗器械中可溶性块体材料一样,可溶性的纳米材料在接触组织或体液时会溶解。然而,对于难溶解的纳米材料,很快超过人体的清除能力和防御机制的负荷,导致长期全身蓄积,从而引起不良反应。不溶性纳米材料的生物持久性可能导致溶酶体通透性和酶活性的变化以及巨噬细胞凋亡。根据其临床使用和纳米材料的固有性质,评价其潜在的全身毒性宜考虑多个接触时间(见 ISO 10993-11)。

因为纳米物体可能分布于全身,宜在具体问题具体分析的基础上考虑选择预期用于组织病理学分析的组织/器官(ISO 10993-11),特别注意 MPS(例如特别是肝、脾)、肾、脑、骨髓等,同时也取决于接触途径和预期临床用途。

宜特别注意给予剂量。通常适用于块体材料的质量或浓度的剂量度量不适合于纳米材料,其全身毒性反应主要取决于颗粒自身与生物系统的相互作用。给予的颗粒数量和/或接触患者的表面积可能是描述剂量反应关系的更好参数。

然而,质量是一个方便的给予剂量时的剂量度量。当所有度量参数已知时,能够容易地将质量剂量换算为单位颗粒数量剂量和/或单位表面积剂量。

另外,剂量大小和接触频率能影响全身毒性试验结果。接触纳米物体后能在器官中达到饱和或刺激器官摄取纳米物体,尤其是 MPS 器官。碳和聚(丙交酯-共-乙交酯)纳米物体静脉注射于啮齿动物的研究表明,肝和脾中的吞噬细胞是能被饱和的,导致纳米物体再分布到其他器官。Biozzi 等将碳纳米物体注入到大鼠的血液,他们观察到重复给予增强了肝脏的摄取。他们指出行为方面的变化与 MPS 对新条件特别是血液中纳米物体水平的适应相关。在其他研究中,纳米物体如碳胶体,以一定剂量静脉注

射的方式阻碍了肝脏对颗粒的摄取,在3 d~6 d后,肝脏的吞噬活性恢复正常。

9.7 致热性

当纳米材料特别是在非无菌或在水的条件下生产时,像任何材料表面一样,纳米材料表面覆有细菌内毒素或脂多糖(LPS)。纳米材料表面出现的内毒素可以干扰纳米材料与生物系统之间的相互作用并影响评估结果(如产生非特异性炎症)。宜注意的是,最终灭菌(干热、湿热、环氧乙烷、 γ 和电子束辐射)不能灭活细菌内毒素。美国药典推荐采用足够的时间和温度处理材料以达到内毒素活性降低 $\geq 3 \log$ (通常为在至少250 °C下持续至少30 min)(美国药典1995)(见6.9.1)。

ISO 29701中描述了在基于细胞的体外生物系统对纳米材料样品进行内毒素检测的鲎试剂测定试验(LAL)。另外一个方法是单核细胞激活试验(MAT),它是一个利用人自然发热机制的已验证的定量试验,能用于与纳米材料相关的内毒素和其他生物热原检测(例如酵母、寄生虫和病毒热原)。6.9.1和ISO 10993-11也有检测纳米材料内毒素的相关信息。其他可能有帮助的信息包括USP 85、USP 151和ANSI/AAMI ST72。根据ISO 10993-11,除内毒素介导的致热性外,纳米材料介导的致热性宜考虑作为纳米材料生物学评价的一部分。

9.8 植入

ISO 10993-6中描述了医疗器械植入试验。根据医疗器械类型考虑不同的植入部位(例如皮下、肌肉、颅内等)。对于游离纳米物体,宜考虑直接注射至适宜组织。

对于纳米物体可能从医疗器械中释放的情况,宜特别注意纳米物体向局部引流淋巴结的迁移。

当采用植入试验评价潜在的全身毒性时,宜同时考虑ISO 10993-6和ISO 10993-11的要求。

宜认识到在植入试验中通常使用对照材料。一些经过认证的标准参照材料可用于尺寸测量。另外,被称为“测试参考”纳米材料现在已经有了广泛使用的商业纳米材料,见5.3。

10 表征和试验结果的描述

试验报告宜包括纳米材料的表征和生物学作用相关的数据,如适用,宜包括但不限于以下信息:

- a) 器械和纳米材料的描述,以及以下列出的使用合适的理化表征的详细描述:
 - 1) 纳米材料的定性,包括化学组成和结构;
 - 2) 尺寸;
 - 3) 形态;
 - 4) 团聚和聚集率/状态;
 - 5) 溶解度;
 - 6) 表面电荷、表面积和表面化学;
 - 7) 预期用途、生物学接触/相互作用的性质和持续时间的描述;
 - 8) 如适用,最终器械中纳米材料纯度的证明和任何可沥滤物和/或化学残留物的定性和定量;
 - 9) 支持纳米材料稳定性的分析数据(如,对纳米物体可能包括使用储备样品和不同试验中使用的不同剂量的溶液的聚集率/状态)。
- b) 样品制备(例如浸提液、直接接触)和试验条件(纳米材料浓度、介质和容器材料),包括应用的标准程序的确认;
- c) 标准的分析方法,如适用;
- d) 分析检验方法的描述,包括定量限;
- e) 评估医疗器械材料降解和潜在纳米物体的释放,包括能充分支持器械的预期使用环境与试验

环境相适应的论据；

- f) 医疗器械材料降解和潜在纳米物体释放的试验方法、试验条件、试验材料和步骤,包括对照的描述；
- g) 降解产物的定性和定量(例如降解产物的形式和状态、稳定性和所使用的对照)；
- h) 试验验证的证据,包括适当的对照和支持性论证的使用,如适用；
- i) 结果概述；
- j) 结果的解释和讨论、结论；
- k) 遵守良好实验室规范和/或实验室质量管理体系(例如 ISO/IEC 17025)的声明。

在研发和验证新方法时,所进行的试验宜包括符合 ISO/TR 13014 要求的信息。

11 风险评估

11.1 总则

尽管化学品风险评估的基本原则被认为适用于纳米材料,但纳米材料出现了一些特殊的挑战,包括独特的理化特性、较大的组成不确定性、在生物系统中不断变化的特性、接触测量的困难性和决定适当的剂量度量在内可能需要特殊的指南。因此,风险评估过程中的透明度是很重要的,在该过程中数据的纳入和排除、假设、变异性和不确定性都宜被讨论。在缺少必要的信息时,风险评估者将不能完成风险评估。因此,当确定最终的风险评估时,从评估中宜清楚地看出信息是如何被考虑在内的。宜注意的是对纳米材料的生物学风险评估宜包括纳米材料的可溶性和不溶性两部分的评估。宜意识到,由于经常缺乏对纳米材料进行风险评估所需要的关键信息,从而导致显著的不确定性。随着从纳米材料的测试和研究中获得相关的新数据,预计这些不确定性将会减少。随着新信息的获得,宜考虑对与使用纳米材料有关的风险进行定期重新评估。

相对于化学品风险评估,纳米材料的潜在生物持久性/生物蓄积对风险评估提出了具体挑战。多种情况下,人体可能不能代谢或主动分解这些纳米材料,从而导致纳米材料在组织和细胞中潜在的持续的持续存留。已经证实不同类型的纳米材料在组织或细胞中持续存留,包括银、氧化锌、二氧化钛和金纳米颗粒和碳纳米管。关于 TiO_2 纳米物体长时间的持续存留也有报道。与这种持续存留相关的特定生物学效应还不明确,但有些证据表明这种现象能导致持续的炎症状态,并最终导致癌变。另外,宜考虑非纳米材料制造的医疗器械因磨损/老化/使用而引起的纳米物体释放。

医疗器械生物学评价的风险管理过程在 ISO 10993-1:2009 附录 B 中有描述,但是 ISO 10993-1 没有定义诸如风险评估、风险分析和风险评价等术语,而是遵照 ISO 14971 和 ISO/TR 15499。然而,在 ISO 10993-1:2009 附录 B 中对风险分析进行了扩展,也包括了风险评价和风险控制。与 ISO 10993-1 相比,ISO/TR 15449 在开展风险管理过程中的生物学风险评价方面提供了更详细的建议。图 1 中的流程图给出了风险管理过程的概述,但本文件的适用范围限于风险评估,包括风险分析和风险评价。ISO 14971 描述的风险是两个独立因素的协同作用:伤害的可能性和伤害的严重程度。

纳米材料的风险评估过程正在不断发展,并且正在开发许多工具来协助评价纳米材料风险,例如计算机技术中的纳米信息学、量化纳米颗粒活性关系(QNAR)、接触模型、基于生理的药代动力学(PBPK)模型、系统性毒理学试验和高通量筛选,见 ISO/TR 16197。目前,这些工具不经常用于支持纳米材料的注册申报,但是它们的重要性可在将来得以提升。证据权重是在纳米材料风险评估文档中经常提到的另一个术语,可能会很有用。OECD 提供了纳米材料风险评估中要考虑的重要问题的概述,同样也适用于医疗器械。

图 1 提供了基于 ISO 10993-1 的整个风险管理过程的概述,但是本文件的范围仅限于图 1 中阴影区域之上所示的风险评估。图 1 中的阴影区域表示风险控制是风险管理的一部分。

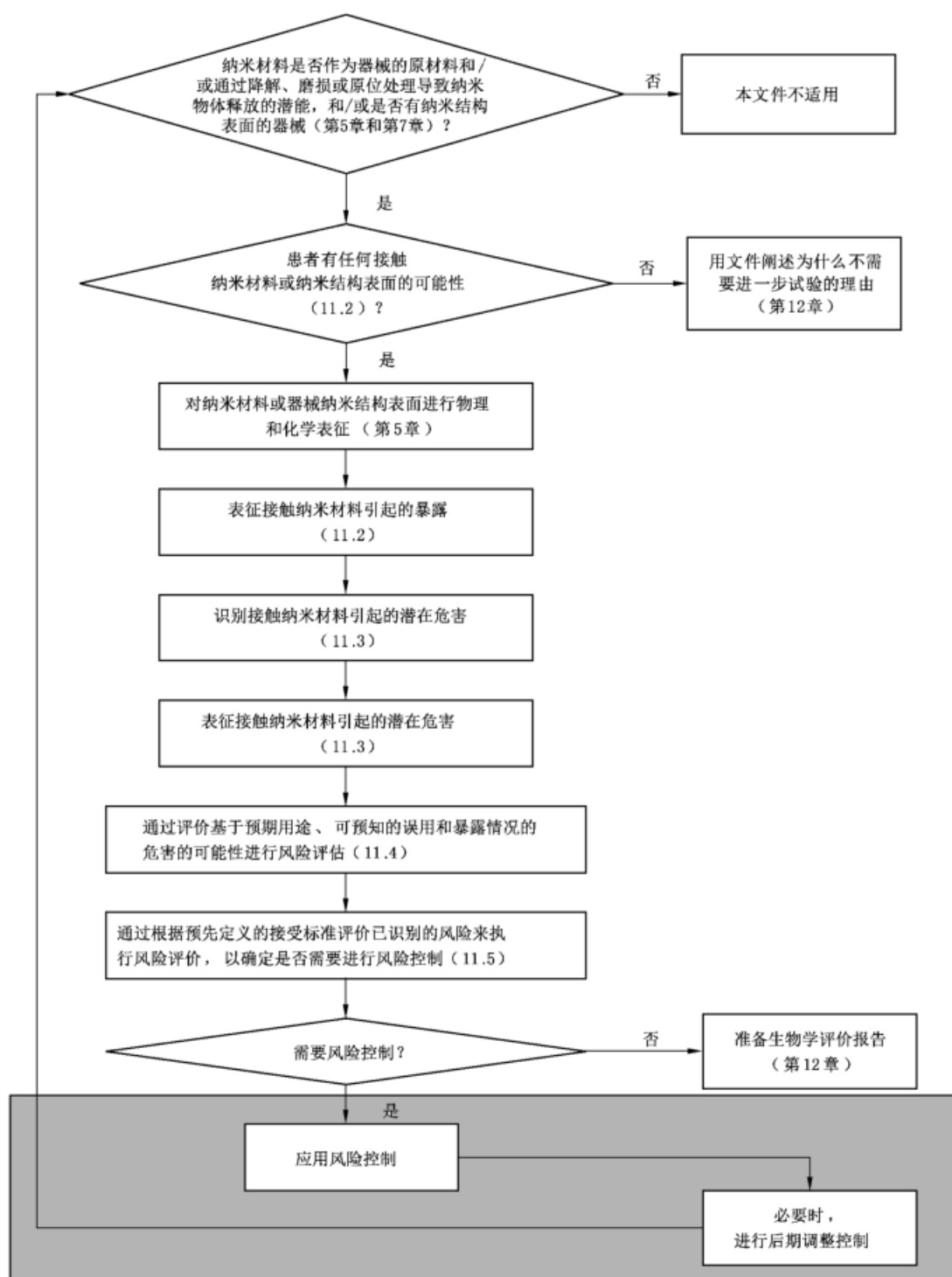


图1 风险管理过程概述

11.2 接触评估

伤害的可能性通常由接触评估、临床经验或与相似应用的比较来表征。对于用于医疗器械的纳米材料来说,伤害与器械中纳米物体的潜在释放和形成有关。接触评估的目的是确认患者接触了多少纳米材料,这些接触是否使纳米物体参与局部组织反应和/或全身接触。因此,通过选择精确的试验方法来

描述接触场景和确认纳米物体从医疗器械的释放、迁移和形成变得很重要。接触评估宜包括以下考虑：

- 接触强度、频率和持续时间；
- 接触途径(如组织/血液、皮肤、经口或吸入)；
- 摄入量或摄取率；
- 生物利用度。

首先,重点是通过模拟接触、测定实际接触或进行假设接触来估计纳米物体进入人体的吸收/分布的可能性和程度。然而,不同的接触条件、接触途径、患者的健康状况和生物利用度,其全身摄入量可能有所不同。通常来说,通过吸入、静脉注射或植入组织的接触比经口或皮肤接触受到更多关注。

纳米材料的表征是接触评估过程中面临的一个挑战。由于可用的分析方法的有限以及浓度低,在体内尤其是在组织和体液中表征可能存在困难。另一个限制是化学分析并不总是提供有关纳米材料的颗粒性质的信息。因此,表征可能不得不确认纳米材料是否为固体、可溶的、可降解的形式。已经表明,某些纳米材料(例如纳米银)可以溶解或释放金属离子,这可能会沉淀成具有不同化学组成的新纳米材料。分析方法宜进行描述并论证。选择的接触评估宜考虑以下方面：

- 适用性；
- 灵敏性；
- 稳健性；
- 准确性；
- 检出限；
- 材料形式(固体、可溶的或可降解的)；
- 变异性和不确定性的来源。

11.3 生物学危险识别

危险是伤害的潜在来源。宜在正常和可以合理解释的故障条件下,识别与纳米材料有关的所有已知和可合理预见的危险。然而,通常一系列危险情况的发生会造成伤害。当进行风险估计时,对这些事件的识别和表征是很重要的。

当风险评估者进行危险识别/表征步骤时,宜考虑以下情况：

- 文献综述的结果；
- 材料表征的结果；
- 样品制备；
- 剂量选择和剂量描述；
- 试验方法；
- 毒代动力学；
- 危险描述,包括剂量反应和作用方式。

对于某些类型的生物学反应,不可能得到一个典型的毒理学剂量-反应关系。在这些情况下,宜使用其他方法表征危险并对伤害的严重程度进行分类。此时,宜特别关注危险情况是如何引起的和其结果的性质。这些生物学反应的实例包括对植入的纳米材料的异物反应和纳米材料表面结构及设计引起的血液凝固。为了确保透明度和可追溯性,有必要对这些其他类型的生物学反应进行适当的记录。

11.4 风险估计

风险估计的原则被认为适用于纳米材料,但可能更加复杂,这是由于目前对纳米材料如何与试验系统和人体相互作用的认识有限。在此过程中,关于如何得出 ISO 10993-17 中所述的可耐受摄入量值的证据方法和原则的权重可能会有用。ISO 10993-17 提供了有关如何使用不确定性因素并为可沥滤物设置可耐受摄入量值的指南,并且还可以用于由于释放、降解、磨损或其结构而可能引起全身接触的纳

米材料。

来自文献综述、生物学评价、临床应用和接触评估的所有可用和适当信息都应用于估计纳米材料带来的健康风险。此外,还宜考虑信息的质量、可靠性和相关性。用于风险估计的数据宜基于以下条件进行可靠性评价:

- 确认被测试材料与被评价材料相关的特征和理化特性;
- 数据是否已根据公认的测试或测量方法生成;
- 该应用方法是否可用于测试纳米材料。

将已识别和表征的风险与接触或危害造成伤害的可能性进行比较。如存在伤害的可能性,则出现风险。如果无法确定接触(伤害的可能性),则在假设最坏情况下的接触情况后,风险评估可能仅取决于危险的严重性。但是,由于风险是一个接触的函数,并且使用的频率和持续时间都是接触因素,因此当这两个因素中的任何一个增加时,伤害的可能性就会增加。

11.5 风险评价

风险评价是根据预先定义的可接受标准对估计的风险进行评价,以确定是否需要进行风险控制的过程。无论是否含有纳米材料,这一过程对所有医疗器械都是相同的。就所有器械来说,当可获得的数据不足以进行定量风险评价时,定性的风险评价可能是必需的。风险水平不仅依赖于潜在危险的严重程度和伤害接触的可能性,也依赖于器械的预期用途。

12 生物学评价报告

生物学评价报告宜包含 ISO 10993-1 中描述的项目,包括有关纳米材料使用的更具体信息。宜由具备必要知识和经验的评估专家确认并记录:

- a) 包含、产生或由纳米材料/纳米物体组成的医疗器械生物学评价的策略和程序内容;
- b) 根据风险管理计划确定与纳米材料预期目的相关风险可接受性的标准;
- c) 医疗器械和纳米材料的材料表征的充分性;
- d) 选择和/或放弃测试的理由以及对这些测试的解释的不确定程度;
- e) 相关现有数据的解释和与医疗器械相关的测试结果;
- f) 为完成生物学评价而收集的任何其他数据;
- g) 医疗器械的总体生物安全性结论以及得出这些结论的任何不确定度。

参 考 文 献

- [1] ISO 9276 (all parts) Representation of results of particle size analysis
- [2] ISO 9277 Determination of the specific surface area of solids by gas adsorption—BET method
- [3] ISO 10801 Nanotechnologies—Generation of metal nanoparticles for inhalation toxicity testing using the evaporation/condensation method
- [4] ISO 10808 Nanotechnologies—Characterization of nanoparticles in inhalation exposure chambers for inhalation toxicity testing
- [5] ISO 11360 Nanotechnologies—Methodology for the classification and categorization of nanomaterials
- [6] ISO/TS 12025 Nanomaterials—Quantification of nano-object release from powders by generation of aerosols
- [7] ISO 13084 Surface chemical analysis—Secondary-ion mass spectrometry—Calibration of the mass scale for a time-of-flight secondary-ion mass spectrometer
- [8] ISO/TR 13097 Guidelines for the characterization of dispersion stability
- [9] ISO 13099 (all parts) Colloidal systems
- [10] ISO 13121 Nanotechnologies—Nanomaterial risk evaluation
- [11] ISO 13318 (all parts) Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods
- [12] ISO 13320 Particle size analysis—Laser diffraction
- [13] ISO 13322 (all parts) Particle size analysis—Image analysis methods
- [14] ISO/TR 14187 Surface chemical analysis—Characterization of nanostructured materials
- [15] ISO 14488 Particulate materials—Sampling and sample splitting for the determination of particulate properties
- [16] ISO 14887 Sample preparation—Dispersing procedures for powders in liquids
- [17] ISO 15471 Surface chemical analysis—Auger electron spectroscopy—Description of selected instrumental performance parameters
- [18] ISO/TR 15499 Biological evaluation of medical devices—Guidance on the conduct of biological evaluation within a risk management process
- [19] ISO/TR 15900 Biological evaluation of medical devices—Part 33: Guidance on tests to evaluate genotoxicity—Supplement to ISO 10993-3
- [20] ISO/TR 15901 (all parts) Nanotechnologies—Methodology for the classification and categorization of nanomaterials
- [21] ISO/TS 16195:2013 Nanotechnologies—Guidance for developing representative test materials consisting of nano-objects in dry powder form
- [22] ISO/TR 16196 Nanotechnologies—Compilation and description of sample preparation and dosing methods for engineered and manufactured nanomaterials
- [23] ISO/TR 16197 Nanotechnologies—Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials
- [24] ISO/TS 16550 Nanotechnologies—Determination of silver nanoparticles potency by release of muramic acid from *Staphylococcus aureus*

- [25] ISO 16700 Microbeam analysis—Scanning electron microscopy—Guidelines for calibrating image magnification
- [26] ISO/IEC 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- [27] ISO/TS 17200 Nanotechnology—Nanoparticles in powder form—Characteristics and measurements
- [28] ISO 17853 Wear of implant materials—Polymer and metal wear particles—Isolation and characterization
- [29] ISO 17973 Surface chemical analysis—Medium-resolution Auger electron spectrometers—Calibration of energy scales for elemental analysis
- [30] ISO 18115 (all parts) Surface chemical analysis—Vocabulary
- [31] ISO 18118 Surface chemical analysis—Auger electron spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy—Guide to the use of experimentally determined relative sensitivity factors for the quantitative analysis of homogeneous materials
- [32] ISO 18144 Environmental tobacco smoke—Estimation of its contribution to respirable suspended particles—Method based on solanesol
- [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
- [34] ISO 19007 Nanotechnologies—In vitro MTS assay for measuring the cytotoxic effect of nanoparticles
- [35] ISO/TR 19319 Surface chemical analysis—Fundamental approaches to determination of lateral resolution and sharpness in beam-based methods
- [36] ISO/TS 19590 Nanotechnologies—Size distribution and concentration of inorganic nanoparticles in aqueous media via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry
- [37] ISO 20998 (all parts) Measurement and characterization of particles by acoustic methods
- [38] ISO 21501 (all parts) Determination of particle size distribution—Single particle light interaction methods
- [39] ISO 22309 Microbeam analysis—Quantitative analysis using energy-dispersive spectrometry (EDS) for elements with an atomic number of 11 (Na) or above
- [40] ISO 22412 Particle size analysis—Dynamic light scattering (DLS)
- [41] ISO 22489 Microbeam analysis—Electron probe microanalysis—Quantitative point analysis for bulk specimens using wavelength dispersive X-ray spectroscopy
- [42] ISO 24173 Microbeam analysis—Guidelines for orientation measurement using electron backscatter diffraction
- [43] ISO 24236 Surface chemical analysis—Auger electron spectroscopy—Repeatability and constancy of intensity scale
- [44] ISO 25178 Geometrical product specifications (GPS)—Surface texture: Areal
- [45] ISO 27628 Workplace atmospheres—Ultrafine, nanoparticle and nano-structured aerosols—Inhalation exposure characterization and assessment
- [46] ISO 29701 Nanotechnologies—Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems—Limulus amoebocyte lysate (LAL) test
- [47] ISO/TS 80004-1:2015 Nanotechnologies—Vocabulary—Part 1: Core terms
- [48] ISO/TS 80004-2:2015 Nanotechnologies—Vocabulary—Part 2: Nano-objects

- [49] ISO/TS 80004-6:2013 Nanotechnologies—Vocabulary—Part 6: Nano-object characterization
- [50] AAMI/ST 72 Bacterial endotoxins—Test methods, routine monitoring, and alternatives to batch testing
- [51] ASTM E2524 Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles
- [52] Curtis A.S.G., Dalby M.J., Gadegaard N. Cell signaling arising from nanotopography: implications for nanomedical devices. *Nanomed.* 2006, 1 pp. 67-72
- [53] Ker E.D., Nain A.S., Weiss L.E., Wang J., Suhan J., Amon C.H. Bioprinting of growth factors onto aligned sub-micron fibrous scaffolds for simultaneous control of cell differentiation and alignment. *Biomaterials.* 2011, 32 pp. 8097-8107
- [54] De Peppo G.M., Agheli H., Karlsson C., Ekström K., Brisby H., Lennerås M. Osteogenic response of human mesenchymal stem cells to well-defined nanoscale topography in vitro. *Int. J. Nanomedicine.* 2014, 9 pp. 2499-2515
- [55] Hristozov D.R., Gottardo S., Critto A., Marcomini A. Risk assessment of engineered nanomaterials; a review of available data and approaches from a regulatory perspective. *Nanotoxicology.* 2012, 6 pp. 880-898
- [56] Hansen S.F., Larsen B.H., Olsen S.I. Baun 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/sccss005.pdf
- [59] SCENIHR. Guidance on the Determination of Potential Health Effects of Nanomaterials Used in Medical Devices. European Commission, Brussels, Belgium 2014. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihro04.pdf
- [60] Crawford R.J., & Webb H.K. Surface topographical factors influencing bacterial attachment. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2012, 179-182 pp. 142-149
- [61] Webb H.K., & Truong V.K. Roughness parameters for standard description of surface nanoarchitecture. *Scanning.* 2012, 34 pp. 257-263
- [62] Linsinger T.P.J., Roebben G., Solans C., Ramsch R. Reference materials for measuring the size of nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2011, 30 pp. 18-27
- [63] Maurer E.I., Sharma M., Schlager J.J., Hussain S.M. Systematic analysis of silver nanoparticle ionic dissolution by tangential flow filtration; toxicological implications. *Nanotoxicology.* 2014, 8 pp. 718-727
- [64] Elder A., Lynch I., Grieger K. Human health risks of engineered nanomaterials; critical knowledge gaps in nanomaterials risk assessment. In: *Nanomaterials: Risks and Benefits*, (Linkov I., & Steevens J. eds.), Springer, Dordrecht, 2009, pp. 3-29.
- [65] Roebben G., Rasmussen K., Kestens V., Linsinger T.P.J., Rauscher H., Emons H. Reference materials and representative test materials; the nanotechnology case. *J. Nanopart. Res.* 2013, 15 pp. 1-13
- [66] Stefaniak A. B., Hackley V. A., Roebben G., Ehara K., Hankin S., Postek M. T.

Nanoscale reference materials for environmental, health and safety measurements; needs, gaps and opportunities. *Nanotoxicology*. 2013, 7 pp. 1325-1337

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

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

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

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

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

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

[73] Petersen E.J., Diamond S.A., Kennedy A.J., Goss G.G., Ho K., Lead J.A 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. Common pitfalls in nanotechnology; lessons learned from NCI's Nanotechnology Characterization Laboratory. *Integr. Biol*. 2013, 5 pp. 66-73

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

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

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

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

- [82] Dobrovolskaia M.A., & McNeil S.E. Endotoxin and Engineered Nanomaterials. Pages 77-110 in Dobrovolskaia MA, McNeil SE. (Eds). Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials. World Scientific Publishing Co, Singapore. 2013
- [83] Giannakou C., Geertsma R.E., De Jong W.H., Van Loveren H., Vandebriel R.J., Park M.V.D.Z. Immunotoxicity testing of nanomedicinal products: possible pitfalls in endotoxin determination. *Current Bionanotechnology*. 2016, 2 pp. 95 -102
- [84] Dobrovolskaia M.A., Neun B.W., Clogston J.D., Grossman J.H., McNeil S.E. Choice of method for endotoxin detection depends on nanoformulation. *Nanomedicine (Lond.)*. 2014, 9 pp. 1847-1856
- [85] Hartung T., & Sabbioni E. Alternative in vitro assays in nanomaterial toxicology. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2011, 3 pp. 545-573
- [86] Schindler S., von Aulock S., Daneshian M., Hartung T. Development, validation and applications of the monocyte activation test for pyrogens based on human whole blood. *ALTEX*. 2009, 26 pp. 265-277
- [87] Vauthier C., & Bouchemal K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm. Res.* 2009, 26 pp. 1025-1058
- [88] Subbarao N. Impact of Nanoparticle Sterilization on Analytical Characterization. Pages 53-71 in Dobrovolskaia MA, McNeil SE. (Eds). Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials. World Scientific Publishing Co, Singapore. 2013
- [89] Ulset A.S., Mori H., Dalheim M.Ø., Hara M., Christensen B.E. Influence of amino acids, buffers, and pH on the γ -irradiation-induced degradation of alginates. *Biomacromolecules*. 2014, 15 pp. 4590-4597
- [90] Van Der Zande M., Vandebriel R.J., Van Doren E., Kramer E., Herrera Rivera Z., Serano-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 sizedependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011, 77 pp. 407-416
- [96] Sonavane G., Tomoda K., Sano A., Ohshima H., Terada H., Makino K. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2008, 65 pp. 1-10

- [97] Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 2001, 53 pp. 283-318
- [98] Hillaireau H., & Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009, 66 pp. 2873-2896
- [99] Nel A.E., Madler L., Velegol D., Xia T., Hoek E. M/V., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M., Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* 2009, 8 pp. 543-557
- [100] Tang S., Chen M., Zheng N. Sub-10-nm Pd Nanosheets with Renal Clearance for Efficient Near-Infrared Photothermal Cancer Therapy. *Small.* 2014, 15 pp. 3139-3144
- [101] Xie G., Sun J., Zhong G., Shi L., Zhang D. Biodistribution and toxicity of intravenously administered silica nanoparticles in mice. *Arch. Toxicol.* 2010, 84 pp. 183-190
- [102] Xie G.P., Sun J., Zhong G.R. Tissue Localization and Excretion of Intravenously Administered Silica Nanoparticles of Different Sizes. *J. Nanopart. Res.* 2012, 14 pp. 671-680
- [103] Alkilany A.M., & Murphy C.J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J. Nanopart. Res.* 2010, 12 pp. 2313-2333
- [104] Lynch I., Cedervall T., Lundqvist M., Cabaleiro—Lago C., Linse S., Dawson K.A. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2007, 134-135 pp. 167-174
- [105] Lynch I., Salvati A., Dawson K.A. Protein-nanoparticle interactions: What does the cell see? *Nat. Nanotechnol.* 2008, 4 pp. 546-547
- [106] Lankveld D.P., Oomen A.G., Krystek P., Neigh A., Troost-de Jong A., Noorlander C. W. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials.* 2010, 31 pp. 8350-8361
- [107] Demoy M., Gibaud S., Andreux J.P., Weingarten C., Gouritin B., Couvreur P. Splenic trapping of nanoparticles: complementary approaches for in situ studies. *Pharm. Res.* 1997, 14 pp. 463-468
- [108] Gibaud S., Demoy M., Andreux J.P., Weingarten C., Gouritin B., Couvreur P. Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs. *J. Pharm. Sci.* 1996, 85 pp. 944-950
- [109] Lenaerts V., Nagelkerke J.F., Van Berkel T.J., Couvreur P., Grislain L., Roland M. In vivo uptake of polyisobutyl cyanoacrylate nanoparticles by rat liver Kupffer, endothelial, and parenchymal cells. *J. Pharm. Sci.* 1984, 73 pp. 980-982
- [110] Sadauskas E., Wallin H., Stoltenberg M., Vogel U., Doering P., Larsen A. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part. Fibre Toxicol.* 2007, 4 p. 10
- [111] Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Lynch I., Cedervall T., Dawson K.A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008, 105 pp. 14265-14270
- [112] Walkey C.D., & Chan W.C. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41 pp. 2780-2799
- [113] Monopoli M.P., Aberg C., Salvati A., Dawson K.A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* 2012, 12 pp. 779-786
- [114] Mwilu S.K., El Badawy A.M., Bradham K., Nelson C., Thomas D., Scheckel K.G. Changes in silver nanoparticles exposed to human synthetic stomach fluid: effects of particle size and surface chemistry. *Sci. Total Environ.* 2013, 447 pp. 90-98

- [115] Pal T., Sau T.K., Jana N.R. Reversible Formation and Dissolution of Silver Nanoparticles in Aqueous Surfactant Media. *Langmuir*. 1997, 13 pp. 1481-1485
- [116] Rogers K. R., Bradham K., Tolaymat T., Thomas D. J., Hartmann T., Ma L. Alterations in physical state of silver nanoparticles exposed to synthetic human stomach fluid. *Sci. Total Environ*. 2012, 420 pp. 334-339
- [117] Osmond-McLeod M.J., Poland C.A., Murphy F., Waddington L., Morris H., Hawkins S.C. Durability and inflammogenic impact of carbon nanotubes compared with asbestos fibres. Part. *Fibre Toxicol*. 2011, 8 p. 15
- [118] Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanoparticles; elements of a screening strategy. Part. *Fibre Toxicol*. 2005, 2 p. 8
- [119] Fu C., Liu T., Li L., Liu H., Chen D., Tang F. The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes. *Biomaterials*. 2013, 34 pp. 2565-2575
- [120] Li C.H., Shen C.C., Cheng Y.W., Huang S.H., Wu C.C., Kao C.C. Organ biodistribution, clearance, and genotoxicity of orally administered zinc oxide nanoparticles in mice. *Nanotoxicology*. 2012, 6 pp. 746-756
- [121] Huang X., Zhang F., Zhu L., Choi K.Y., Guo N., Guo J. Effect of injection routes on the biodistribution, clearance, and tumor uptake of carbon dots. *ACS Nano*. 2013, 23 pp. 5684-5693
- [122] Semmler-Behnke M., Kreyling W.G., 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 granulopoietic 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 granulopoietic activity of the reticulo-endothelial system. II. A study of the kinetics of the R. E. S. in relation to the dose of carbon injected; relationship between the weight of the organs and their activity. *Br. J. Exp. Pathol.* 1953, 34 pp. 441-457
- [133] Kim Y.S., Song M.Y., Park J.D., Song K.S., Ryu H.R., Chung Y.H. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* 2010, 7 p. 20
- [134] Sung J.H., Ji J.H., Park J.D., Yoon J.U., Kim D.S., Jeon K.S. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 2009, 108 pp. 452-461
- [135] Bermudez E., Mangum J.B., Wong B.A., Asgharian B., Hext P.M., Warheit D.B. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol. Sci.* 2004, 77 pp. 347-357
- [136] Brown J.S., Wilson W.E., Grant L.D. Dosimetric comparisons of particle deposition and retention in rats and humans. *Inhal. Toxicol.* 2005, 17 pp. 355-385
- [137] Demoy M., Andreux J.P., Weingarten C., Gouritin B., Guilloux V., Couvreur P. Spleen capture of nanoparticles; influence of animal species and surface characteristics. *Pharm. Res.* 1999, 16 pp. 37-41
- [138] Peters R.J., Rivera Z.H., van Bommel 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., Kovoichich M., Nel A. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in mediating particulate matter injury. *Clin. Occup. Environ. Med.* 2006, 5 pp. 817-836
- [143] Zhang H., Ji Z., Xia T., Meng H., Low-Kam C., Liu R. Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. *ACS Nano.* 2012, 22 pp. 4349-4368
- [144] Monteiller C., Tran L., MacNee W., Faux S., Jones A., Miller B. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: The role of surface area. *Occup. Environ. Med.* 2007, 64 pp. 609-615
- [145] Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 2005, 113 pp. 823-839
- [146] Delmaar C.J., Peijnenburg W.J., Oomen A.G., Chen J., de Jong W.H., Sips A.J. A practical approach to determine dose metrics for nanomaterials. *Environ. Toxicol. Chem.* 2015, 34 pp. 1015-1022
- [147] Kong B., Seog J.H., Graham L.M., Lee S.B. Experimental considerations on the cyto-

toxicity of nanoparticles. *Nanomedicine (Lond.)*. 2011, 6 pp. 929-941

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[158] Val S., Hussain S., Boland S., Hamel R., Baeza-Squiban A., Marano F. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells; need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts. *Inhal. Toxicol.* 2009, (21) pp. 115-122

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

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

[161] AshaRani. P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P., and Valiyaveetil, 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; cor-

relating 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. Cytotoxicity and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol. Lett.* 2012, 215 pp. 119-125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[180] FDA. 2012. "International Conference on Harmonisation; guidance on S2(R1) Genotox-

icity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; availability. Notice." Fed Regist 77(110): 33748-33749

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

pp. 912-922

[197] Hougaard K.S., Campagnolo L., Chavatte-Palmer P., Tarrade A., Rousseau-Ralliard D., Valentino S. A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. *Reprod. Toxicol.* 2015, 56 pp. 118-140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

health/scientific committees/ consumer safety/ docs/ sccs o 103.pdf

[214] SCCS. 2013. Opinion on Titanium Dioxide (Nano form). Colipa No. S75. Scientific Committee on Consumer Safety. European Commission. SCCS/1516/13. Luxembourg. pp. 31-33. Available at: http://ec.europa.eu/health/scientificcommittees/consumersafety/docs/sccs_o136.pdf

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

[216] Ema M., Matsuda A., Kobayashi N., Naya M., Nakanishi J. Evaluation of dermal and eye irritation and skin sensitization due to carbon nanotubes. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2011, 61pp. 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, 32pp. 128-134

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

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

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

[221] Hoet P.H., Bröske-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., Bonaughd R.L., Raghavan S. R. Structural analysis of “flexible” liposome formulations: new insights into the skin-penetrating ability of soft nanostructures. *Soft Matter*. 2012, 40 pp. 10226-10232

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

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

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

[229] Lee H.A., Imran M., Monteiro-Riviere N.A., Colvin V.L., Yu W.W., Riviere J.E. Bio-distribution of quantum dot nanoparticles in perfused skin: Evidence of coating dependency and perio-

dicity 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, 123pp. 264-280

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Rev. 2012, 64 pp. 1363-1384

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[259] Geraets L, 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 different titanium dioxide nanoparticles in rats. *Part. Fibre Toxicol*. 2014, 11 p. 30

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

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

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

- [263] Xia X.R., Monteiro-Riviere N.A., Riviere J.E. An index for characterization of nanomaterials in biological systems. *Nat. Nanotechnol.* 2010, 5 pp. 671-675
- [264] Winkler D.A., Mombelli E., Pietroiusti A., Tran L., Worth A., Fadeel B. Applying quantitative structure-activity relationship approaches to nanotoxicology: current status and future potential. *Toxicology*. 2013, 313 pp. 15-23
- [265] ICRP (International Committee on Radiological Protection). Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. ICRP Publication 66. *Ann. ICRP*. 1994, 24 (1-3). Available at: <http://www.icrp.org/publication.asp?id=ICRP%20Publication%2066>
- [266] Hofmann W. Modelling particle deposition in human lungs: modelling concepts and comparison with experimental data. *Biomarkers*. 2009 (14) pp. 59-62
- [267] Li M., Al-Jamal K.T., Kostarelos K., Reineke J. Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles. *ACS Nano*. 2010, 4 pp. 6303-6317
- [268] Carlander U., Li D., Jolliet O., Emond C., Johanson G. Toward a general 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 21st Century: Use of a Predictive Toxicological Approach and High-Throughput Screening. *Acc. Chem. Res.* 2012, 46 pp. 607-621
- [270] Zuin S., Micheletti C., Critto A., Pojana G., Johnston H., Stone V. Weight of evidence approach for the relative hazard ranking of nanomaterials. *Nanotoxicology*. 2011, 5 pp. 445-458
- [271] Hristozov D.R., Zabeo A., Foran C., Isigonis P., Critto A., Marcomini A. A weight of evidence approach for hazard screening of engineered nanomaterials. *Nanotoxicology*. 2012, 6 pp. 880-898
- [272] Tseng M.T., Fu Q., Lor K., Fernandez-Botran G.R., Deng Z.B., Graham U. Persistent Hepatic Structural Alterations Following Nanoceria Vascular Infusion in the Rat. *Toxicol. Pathol.* 2014, 42 pp. 984-996
-

