

Nanoteknologi — Kompilasi dan deskripsi metode skrining toksikologi untuk material nano yang dimanufaktur

Nanotechnologies — Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials

(ISO/TR 16197:2014, IDT)

Pengguna dari RSNI ini diminta untuk menginformasikan adanya hak paten dalam dokumen ini, bila diketahui, serta memberikan informasi pendukung lainnya (pemilik paten, bagian yang terkena paten, alamat pemberi paten dan lain-lain)

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata.....	ii
Pendahuluan.....	iii
1 Ruang lingkup.....	2
2 Acuan normatif.....	2
3 Istilah dan definisi.....	2
4 Lambang (dan istilah singkatan)	6
5 Latar belakang.....	8
5.1 Peran dan relevansi skrining toksikologi untuk evaluasi keselamatan material nano yang dimanufaktur.....	8
5.2 Skrining toksikologi sebagai bagian dari pendekatan berjenjang untuk penilaian toksikologi dari material nano yang dimanufaktur.....	10
5.3 Diskusi tentang dosis yang relevan untuk skrining toksikologi.....	12
5.4 Diskusi mengenai hubungan antara Standar ini dengan ISO/DTR 16196, Kompilasi dan deskripsi persiapan sampel dan metode pemberian dosis untuk material nano yang dimanufaktur.....	14
5.5 Diskusi mengenai hubungan antara Standar ini dengan ISO/TR 13014, Nanoteknologi - Panduan karakterisasi fisiko-kimia material berskala nano yang direkayasa untuk penilaian toksikologi.....	14
5.6 Tinjauan atas kegiatan internasional yang relevan dan dokumen yang dipublikasikan	14
6 Metode untuk skrining toksikologi yang berkaitan dengan kesehatan manusia .	18
6.1 Umum	18
6.2 Kontrol positif dan negatif untuk pengujian toksisitas material nano.....	18
6.3 Metode yang relevan untuk skrining toksikologi <i>in vitro</i> dari material nano yang dimanufaktur	20
6.4 Metode yang relevan <i>untuk</i> skrining toksikologi <i>in vivo</i> dari material nano yang dimanufaktur	48
7 Metode skrining toksikologi terkait lingkungan	50
7.1 Pendahuluan.....	50
7.2 Keadaan dan distribusi lingkungan	52
7.3 Degradasi dan transformasi lingkungan	54
7.4 Biopersistensi dan bioakumulasi lingkungan	54
Bibliografi	55

Prakata

SNI ISO/TR 16197:2014, *Nanoteknologi — Kompilasi dan deskripsi metode skrining toksikologi untuk material nano yang dimanufaktur*, merupakan standar yang disusun dengan jalur adopsi tingkat keselarasan identik dari ISO/TR 16197:2014, *Nanotechnologies — Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials*, dengan metode adopsi terjemahan dua bahasa dan ditetapkan oleh BSN Tahun 202X.

Dalam Standar ini istilah “*this Technical Report*” pada standar ISO/TR 16197:2014 yang diadopsi diganti dengan “*this Standard*” dan diterjemahkan menjadi “Standar ini”.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 07-03, Nanoteknologi. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 6 Juni 2024 secara daring, yang dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholder*) terkait, yaitu perwakilan dari pemerintah, pelaku usaha, konsumen, dan pakar. Standar ini telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal XX XXXX 2024 sampai dengan XX XXXX 2024, dengan hasil akhir disetujui menjadi SNI.

Terdapat standar yang dijadikan sebagai acuan normatif dalam Standar ini telah diadopsi menjadi SNI, yaitu ISO/TS 80004-1, *Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms*, yang telah diadopsi secara identik menjadi SNI ISO 80004-1:2023, *Nanoteknologi — Kosakata — Bagian 1: Istilah utama*.

Apabila pengguna menemukan keraguan dalam Standar ini, maka disarankan untuk melihat standar aslinya yaitu ISO/TR 16197:2014, dan/atau dokumen terkait lain yang menyertainya.

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari Standar ini dapat berupa hak kekayaan intelektual (HAKI). Namun selama proses perumusan SNI, Badan Standardisasi Nasional telah memperhatikan penyelesaian terhadap kemungkinan adanya HAKI terkait substansi SNI. Apabila setelah penetapan SNI masih terdapat permasalahan terkait HAKI, Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggung jawab mengenai bukti, validitas, dan ruang lingkup dari HAKI tersebut.

Pendahuluan

Standar ini menyediakan kompilasi metode yang dimaksudkan untuk membantu proses skrining toksikologi material nano yang direkayasa dan dimanufaktur sebelum pengujian toksikologi skala penuh, analisis, dan penilaian risiko. Metode skrining toksikologi berfokus pada penyediaan informasi dan alat yang dapat digunakan dalam proses pengambilan keputusan. Sebagai contoh, Standar ini memberikan informasi mengenai metode yang dapat digunakan untuk menskrining material nano guna menentukan kelanjutan pengembangan material nano itu sendiri dan/atau produk yang mengandung material nano; menentukan pembiayaan untuk melaksanakan tahapan selanjutnya dalam strategi pengujian berjenjang yang lengkap; atau menentukan ketersediaan kontrol yang tepat untuk melanjutkan penelitian material nano di laboratorium.

Standar ini dimaksudkan tidak untuk menggantikan atau bersaing dengan persyaratan peraturan yang ada terkait pengujian, penggunaan, dan pembuangan material nano, dan juga tidak menyediakan daftar pengujian yang telah divalidasi untuk tujuan ini.

Informasi yang diberikan konsisten dengan Standar Internasional lainnya. Sebagai contoh, dokumen kembarannya 'Kompilasi dan Deskripsi Metode Penyiapan dan Pemberian Dosis Sampel untuk Material Nano yang Dimanufaktur' dikembangkan bersama dan membahas metode yang digunakan untuk menyiapkan sampel di berbagai media yang relevan untuk studi toksikologi. ISO 10993-18^[1] secara khusus membahas evaluasi karakterisasi kimiawi dari material yang digunakan dalam perangkat medis, ISO 14971^[2] menunjukkan bahwa analisis risiko toksikologi sebaiknya mempertimbangkan sifat kimiawi dari material, dan ISO/TR 13014^[3] membahas isu-isu yang berkaitan dengan material itu sendiri. ISO/TR 13121^[4] menjelaskan proses untuk mengidentifikasi, mengevaluasi, dan mengomunikasikan potensi risiko material nano yang dimanufaktur dan memberikan panduan tentang pengujian toksisitas material nano berjenjang.

Introduction

This Technical Report provides a compilation of methods intended to aid the process of toxicological screening of engineered and manufactured nanomaterials prior to full-scale toxicological testing, analysis, and risk assessment. Toxicological screening methods focus on providing information and tools that can be used in decision-making processes. For instance, this Technical Report provides information on methods that can be used to screen nanomaterials in order to determine whether to continue development of a nanomaterial itself and/or a product containing a nanomaterial; determine whether to take on the cost of performing the remaining tiers within a complete tiered-testing strategy; or determine whether appropriate controls are in place to continue nanomaterial research in the laboratory.

This Technical Report is not intended to supplant or compete with any existing regulatory requirements regarding nanomaterial testing, use, and disposal, nor does it provide a list of validated tests for this purpose.

The information provided is consistent with other International Standards. For example, its sister document 'Compilation and Description of Sample Preparation and Dosing Methods for Manufactured NMs' is developed in concert and discusses methods used to prepare samples in various relevant media for toxicological studies. ISO 10993-18^[1] specifically addresses the evaluation of the chemical characterization of materials used in medical devices, ISO 14971^[2] points out that a toxicological risk analysis should take into account the chemical nature of the materials, and ISO/TR 13014^[3] addresses issues pertaining to the materials themselves. ISO/TR 13121^[4] describes a process for identifying, evaluating, and communicating the potential risks of manufactured nanomaterials and provides guidance on tiered nanomaterial toxicity testing.

Halaman ini sengaja dikosongkan untuk memastikan bahwa penyajian SNI dengan metode dua bahasa dapat menampilkan bahasa Indonesia pada halaman genap dan bahasa Inggris pada halaman ganjil.

Nanoteknologi — Kompilasi dan deskripsi metode skrining toksikologi untuk material nano yang dimanufaktur

1 Ruang lingkup

Standar ini memberikan kompilasi dan deskripsi metode *in vitro* dan *in vivo* yang dapat berguna untuk uji toksikologi, termasuk skrining ekotoksikologi terhadap material nano yang direkayasa dan dimanufaktur. Uji skrining toksikologi yang tercakup dalam standar ini dapat digunakan untuk tujuan-tujuan seperti pengambilan keputusan awal dalam penelitian dan pengembangan produk, umpan balik yang cepat mengenai potensi masalah toksikologi/keselamatan, atau untuk penilaian awal terhadap material nano yang dimanufaktur. Standar ini dibagi menjadi dua bagian, yaitu uji skrining yang terkait dengan manusia dan uji skrining yang terkait dengan lingkungan. Uji skrining adalah uji yang relatif sederhana dan murah yang dapat dilakukan dengan mudah dan memberikan indikasi potensi hasil yang merugikan dan dampak buruk pada kesehatan manusia atau lingkungan.

Standar ini dimaksudkan untuk melengkapi upaya internasional lainnya yang membahas toksikologi material nano dengan berfokus pada metode skrining yang sesuai untuk penilaian awal dan dimaksudkan tidak untuk menduplikasi upaya serupa di organisasi internasional lainnya seperti Organisasi untuk Kerja Sama Ekonomi dan Pembangunan (OECD). Jika skrining memberikan indikasi awal bahaya, panduan tersebut akan merujuk pada pendekatan organisasi lain untuk penilaian toksikologi skala penuh atau studi berjenjang lebih lanjut.

2 Acuan normatif

Dokumen berikut dirujuk dalam teks sehingga sebagian atau seluruh isinya merupakan persyaratan Standar ini. Untuk acuan bertanggung, hanya edisi yang diacu yang berlaku. Untuk acuan tidak bertanggung, berlaku edisi terakhir dari dokumen acuan (termasuk amendemennya).

ISO/TS 27687:2008, *Nanotechnologies — Terminology and definitions for nano-objects — Nanoparticle, nanofibre and nanoplate*

ISO/TS 80004-1, *Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms*

3 Istilah dan definisi

Untuk tujuan Standar ini, istilah dan definisi yang ada dalam ISO/TS 27687:2008 dan ISO/TS 80004-1 serta istilah dan definisi berikut ini berlaku.

3.1

aglomerat

kumpulan partikel atau agregat yang terikat lemah atau campuran keduanya di mana luas permukaan luar yang dihasilkan sama dengan jumlah luas permukaan masing-masing komponen

CATATAN 1 Gaya yang menyatukan aglomerat adalah gaya yang lemah, misalnya gaya van der Waals, atau belitan fisik sederhana.

CATATAN 2 Aglomerat juga disebut sebagai partikel sekunder dan partikel sumber asli disebut sebagai partikel primer.

Nanotechnologies — Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials

1 Scope

This Standard provides a compilation and description of *in vitro* and *in vivo* methods that can be useful for the toxicological, including ecotoxicological screening of engineered and manufactured nanomaterials. Toxicological screening tests included in this Standard can be used for such purposes as early decision-making in research and product development, rapid feedback on potential toxicological/safety concerns, or for the preliminary assessment of manufactured nanomaterials. This Standard is divided between screening assays related to humans and screening assays related to the environment. A screening test is a relatively simple, inexpensive test that can be administered easily and provides an indication of potential adverse outcomes and effects on human health or the environment.

The Standard is intended to complement other international efforts that address nanomaterial toxicology by focusing on screening methods suited for preliminary assessment and is not intended to duplicate similar efforts in other international organizations such as the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). If screening provides an early indication of hazard, the guidance will refer to other organizations' approaches for full-scale toxicological assessment or further tiered studies.

2 Normative references

The following documents, in whole or in part, are normatively referenced in this document and are indispensable for its application. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO/TS 27687:2008, *Nanotechnologies — Terminology and definitions for nano-objects — Nanoparticle, nanofibre and nanoplate*

ISO/TS 80004-1, *Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms*

3 Terms and definitions

For the purposes of this document, the terms and definitions given in ISO/TS 27687:2008 and ISO/TS 80004-1 and the following apply.

3.1

agglomerate

collection of weakly bound particles or aggregates or mixtures of the two where the resulting external surface area is similar to the sum of the surface areas of the individual components

NOTE 1 to entry: The forces holding an agglomerate together are weak forces, for example van der Waals forces, or simple physical entanglement.

NOTE 2 to entry: Agglomerates are also termed secondary particles and the original source particles are termed primary particles.

RSNI3 Error! Reference source not found.

[SUMBER: ISO/TS 27867:2008, 3.2]

3.2

agregat

partikel yang terdiri dari partikel-partikel yang terikat kuat atau menyatu dengan luas permukaan eksternal yang dihasilkan dapat secara signifikan lebih kecil daripada jumlah luas permukaan yang dihitung dari masing-masing komponen

CATATAN 1 Gaya yang menyatukan agregat adalah gaya yang kuat, misalnya ikatan kovalen, atau gaya yang dihasilkan dari sintering atau belitan fisik yang kompleks.

CATATAN 2 Agregat juga disebut sebagai partikel sekunder dan partikel sumber asli disebut sebagai partikel primer.

[SUMBER: ISO/TS 27867:2008, 3.3]

3.3

material nano yang dimanufaktur

material nano yang sengaja diproduksi untuk tujuan komersial agar memiliki sifat tertentu atau komposisi tertentu

[SUMBER: ISO/TS 80004-1, 2.9]

3.4

serat nano

objek nano dengan dua dimensi eksternal dalam skala nano dan dimensi ketiga secara signifikan lebih besar

CATATAN 1 Serat nano dapat bersifat fleksibel atau kaku.

CATATAN 2 Dua dimensi eksternal yang serupa dianggap berbeda ukurannya bila kurang dari tiga kali dan dimensi eksternal secara signifikan lebih besar dianggap berbeda dari dua dimensi lainnya bila lebih dari tiga kali.

CATATAN 3 Dimensi eksternal terbesar belum tentu dalam skala nano.

[SUMBER: ISO/TS 27687:2008, 4.3]

3.5

material nano

material dengan dimensi eksternal dalam skala nano atau memiliki struktur internal atau struktur permukaan dalam skala nano

CATATAN 1 Istilah umum ini mencakup objek nano dan material berstruktur nano.

CATATAN 2 Lihat juga material nano yang direkayasa, material nano yang dimanufaktur, dan material nano yang tidak disengaja.

[SUMBER: ISO/TS 80004-1, 2.4]

3.6

objek nano

material dengan satu, dua, atau tiga dimensi eksternal dalam skala nano

CATATAN 1 Istilah umum untuk semua objek diskrit berskala nano.

[SUMBER: ISO/TS 27867:2008, 3.2]

3.2

aggregate

particle comprising strongly bonded or fused particles where the resulting external surface area can be significantly smaller than the sum of calculated surface areas of the individual components

NOTE 1 to entry: The forces holding an aggregate together are strong forces, for example covalent bonds, or those resulting from sintering or complex physical entanglement.

NOTE 2 to entry: Aggregates are also termed secondary particles and the original source particles are termed primary particles.

[SOURCE: ISO/TS 27867:2008, 3.3]

3.3

manufactured nanomaterial

nanomaterial intentionally produced for commercial purposes to have specific properties or specific composition

[SOURCE: ISO/TS 80004-1, 2.9]

3.4

nanofibre

nano-object with two external dimensions in the nanoscale and the third dimension significantly larger

NOTE 1 to entry: A nanofibre can be flexible or rigid.

NOTE 2 to entry: The two similar external dimensions are considered to differ in size by less than three times and the significantly larger external dimension is considered to differ from the other two by more than three times.

NOTE 3 to entry: The largest external dimension is not necessarily in the nanoscale.

[SOURCE: ISO/TS 27687:2008, 4.3]

3.5

nanomaterial

material with any external dimension in the nanoscale or having internal structure or surface structure in the nanoscale

NOTE 1 to entry: This generic term is inclusive of nano-object and nanostructured material.

NOTE 2 to entry: See also engineered nanomaterial, manufactured nanomaterial, and incidental nanomaterial.

[SOURCE: ISO/TS 80004-1, 2.4]

3.6

nano-object

material with one, two, or three external dimensions in the nanoscale

NOTE 1 to entry: Generic term for all discrete nanoscale objects.

3.7

partikel nano

objek nano dengan ketiga dimensi eksternal dalam skala nano

CATATAN 1 Jika panjang sumbu terpanjang hingga terpendek dari material nano berbeda secara signifikan (secara tipikal lebih dari tiga kali lipat), istilah batang nano atau pelat nano dimaksudkan untuk digunakan sebagai pengganti istilah partikel nano.

[SUMBER: ISO/TS 27687:2008, 4.1]

3.8

skala nano

rentang ukuran dari sekitar 1 nm hingga 100 nm

CATATAN 1 Properti yang bukan merupakan ekstrapolasi dari ukuran yang lebih besar secara tipikal tetapi tidak secara eksklusif, akan ditunjukkan dalam kisaran ukuran ini. Untuk properti semacam itu, batas ukuran dianggap sebagai perkiraan.

CATATAN 2 Batas bawah dalam definisi ini (sekitar 1 nm) diperkenalkan untuk menghindari kelompok atom tunggal dan kecil ditetapkan sebagai objek nano atau elemen struktur nano, yang mungkin tersirat dari ketiadaan batas bawah.

[SUMBER: ISO/TS 27687:2008, 2.1]

3.9

tabung nano

serat nano berongga

[SUMBER: ISO/TS 27687:2008, 4.4]

3.10

partikel

bagian kecil dari materi dengan batas-batas fisis yang ditentukan

CATATAN 1 Batas fisis juga dapat digambarkan sebagai antarmuka.

CATATAN 2 Sebuah partikel dapat bergerak sebagai sebuah unit.

CATATAN 3 Definisi partikel umum ini berlaku untuk objek nano.

[SUMBER: ISO/TS 27687:2008, 3.1]

4 Lambang (dan istilah singkatan)

ASTM	Masyarakat Amerika untuk Pengujian dan Material
ESR	Resonansi Spin Elektron
IT	Intrakranial
ITS	Strategi Pengujian Terpadu (atau dalam beberapa kasus, Strategi Pengujian Cerdas)
LTE	Modul Setara Jaringan Limfoid

3.7

nanoparticle

nano-object with all three external dimensions in the nanoscale

NOTE 1 to entry: If the lengths of the longest to the shortest axes of the nano-object differ significantly (typically by more than three times), the terms nanorod or nanoplate are intended to be used instead of the term nanoparticle.

[SOURCE: ISO/TS 27687:2008, 4.1]

3.8

nanoscale

size range from approximately 1 nm to 100 nm

NOTE 1 to entry: Properties that are not extrapolations from a larger size will typically, but not exclusively, be exhibited in this size range. For such properties, the size limits are considered approximate.

NOTE 2 to entry: The lower limit in this definition (approximately 1 nm) is introduced to avoid single and small groups of atoms from being designated as nano-objects or elements of nanostructures, which might be implied by the absence of a lower limit.

[SOURCE: ISO/TS 27687:2008, 2.1]

3.9

nanotube

hollow nanofibre

[SOURCE: ISO/TS 27687:2008, 4.4]

3.10

particle

minute piece of matter with defined physical boundaries

NOTE 1 to entry: A physical boundary can also be described as an interface.

NOTE 2 to entry: A particle can move as a unit.

NOTE 3 to entry: This general particle definition applies to nano-objects.

[SOURCE: ISO/TS 27687:2008, 3.1]

4 Symbols (and abbreviated terms)

ASTM American Society for Testing and Materials

ESR Electron Spin Resonance

IT Intracheal

ITS Integrated Testing Strategies (or in some cases, Intelligent Testing Strategies)

LTE Lymphoid Tissue Equivalent Module

RSNI3 Error! Reference source not found.

NMs	material nano
OECD	Organisasi untuk Kerja Sama Ekonomi dan Pembangunan
PBS	larutan garam penyangga fosfat
PTE	ekuivalen jaringan perifer
ROS	spesies oksigen reaktif
STS	studi toksisitas standar

5 Latar belakang

5.1 Peran dan relevansi skrining toksikologi untuk evaluasi keselamatan material nano yang dimanufaktur

Merupakan tantangan untuk mempertahankan jumlah material nano yang muncul dengan sifat-sifat baru dan untuk menguji secara toksikologi material baru sebelum terpapar pada manusia, termasuk paparan pekerjaan dan lingkungan. Karena hampir setiap elemen pada tabel periodik dapat dieksplorasi dalam nanoteknologi, potensi keragaman material nano membuatnya tidak praktis untuk menggunakan paradigma pengujian saat ini untuk mengevaluasi setiap material nano baru. Skrining toksikologi dengan hasil tinggi sangat penting untuk mengimbangi laju material nano yang saat ini muncul di pasar. Skrining semacam itu biasanya dilakukan dengan menggunakan kultur sel atau teknik *in vitro* lainnya karena keterbatasan biaya, infrastruktur, dan waktu; pertimbangan semacam itu mencegah sebagian besar penelitian pada hewan secara keseluruhan. Selain itu, ada upaya di seluruh dunia untuk mengurangi penggunaan penelitian pada hewan *in vivo* seperti yang disajikan dalam prinsip 3R (penggantian, pengurangan, penyempurnaan)^[5].

Tujuan dari uji skrining adalah untuk memberikan indikasi potensi hasil yang merugikan dan dampak buruk pada kesehatan manusia atau lingkungan. Meskipun ada banyak definisi yang tersedia untuk istilah uji skrining, untuk tujuan Standar ini, uji skrining secara umum dapat didefinisikan sebagai uji yang relatif sederhana dan murah yang dapat dilakukan dengan mudah dan memberikan hasil yang cepat.

Uji skrining dapat mencakup hal-hal berikut ini:

- tidak menggunakan (atau dalam jumlah yang sangat terbatas) hewan hidup;
- menghasilkan titik akhir yang dapat diukur atau hasil skrining ya/tidak yang dapat diterima dengan baik dan dapat diandalkan;
- telah menunjukkan pengulangan di beberapa laboratorium;
- dapat direproduksi dengan kontrol positif dan negatif yang sesuai.

Uji skrining sering kali memberikan data mekanistik spesifik yang sebaiknya digunakan dalam konteks kerangka kerja jalur hasil yang merugikan atau analisis ciri khas kimiawi. Standar ini hanya membahas uji skrining yang telah digunakan untuk tujuan menilai toksisitas material nano; oleh karena itu, hasil dari uji skrining jenis ini dapat digunakan untuk menentukan kelanjutan pengembangan produk material nano tertentu. Sebagai contoh, material nano yang diprediksi sangat berbahaya dapat dihilangkan dari pengembangan.

NMs	nanomaterials
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
PBS	phosphate buffer saline
PTE	peripheral tissue equivalent
ROS	reactive oxygen species
STS	standard toxicity studies

5 Background

5.1 Role and relevance of toxicological screening for the safety evaluation of manufactured NMs

It is a challenge to keep up with the number of emerging NMs with novel properties and to toxicologically assay new materials prior to human exposure, including occupational and environmental exposure. Because virtually every element on the periodic table could be explored in nanotechnology, the potential diversity of NMs makes it impractical to utilize our current testing paradigms to evaluate every new nanomaterial. High-throughput toxicological screening is essential to keeping pace with the rate of NMs currently emerging on the market. Such screening is typically conducted using cell culture or other *in vitro* techniques due to cost, infrastructure, and time constraints; such considerations prevent most whole animal studies. In addition, there is a worldwide effort to diminish the use of *in vivo* animal studies as presented in the 3R (replacement, reduction, refinement) principle.^[5]

The purpose of a screening test is to provide an indicator of potential adverse outcomes and effects on human health or the environment. Although there are many definitions available for the term screening test, for the purposes of this Standard, a screening test can be generally defined as a relatively simple, inexpensive test that can be administered easily and provides rapid results.

A screening test might include the following:

- uses no (or a very limited number of) sentient animals;
- produces a quantifiable end point or a yes/no screen that is well-accepted and reliable;
- has demonstrated repeatability in multiple laboratories;
- is reproducible with appropriate positive and negative controls.

Screening tests often provide specific mechanistic data that should be used in the context of either an adverse outcome pathway framework or a chemical signature analysis. This Standard deals solely with screening tests that have been used for the purposes of assessing nanomaterial toxicity; therefore, results from this type of screening test could be used to determine whether or not to pursue the continued development of a particular nanomaterial product. For example, NMs predicted to be particularly hazardous can be removed from development.

Ketika digunakan dalam strategi pengujian berjenjang, metode skrining dengan hasil yang tinggi berpotensi untuk menghilangkan pengujian *in vivo* lebih lanjut atau untuk mengidentifikasi material berbahaya pada investigasi *in vitro* atau *in vivo* yang ditargetkan, sehingga merampingkan proses identifikasi bahaya. Fakta bahwa pengujian skrining dapat dilakukan dengan cara hasil tinggi memiliki implikasi kesehatan manusia yang sangat penting mengingat kompleksitas dan banyaknya material nano yang sudah ada di pasaran dan saat ini sedang dalam pengembangan.

Namun, ada juga keterbatasan uji skrining relatif terhadap uji konfirmasi yang lebih rinci; oleh karena itu, uji skrining sebaiknya dirancang untuk dimasukkan ke dalam strategi pengujian terintegrasi. Keterbatasan uji skrining meliputi

- uji skrining sering kali tidak memiliki prediktabilitas yang tervalidasi pada manusia,
- ekstrapolasi hubungan dosis-respons dari uji skrining terhadap paparan pada manusia merupakan hal yang kompleks, dan
- prediksi bahaya paparan kronis pada manusia dari uji skrining paparan akut sulit dilakukan.

Meskipun uji skrining dimaksudkan tidak untuk digunakan sebagai metode yang berdiri sendiri, uji ini dapat meniadakan penelitian lebih lanjut jika hasilnya menunjukkan bahwa material nano sangat beracun atau tidak beracun.

Ini berarti bahwa uji skrining dalam beberapa kasus tidak diragukan lagi akan melebih-lebihkan atau meremehkan bahaya bagi manusia.

5.2 Skrining toksikologi sebagai bagian dari pendekatan berjenjang untuk penilaian toksikologi dari material nano yang dimanufaktur

Pendekatan pengujian berjenjang didasarkan pada penilaian bertahap, dengan setiap langkah penilaian menyediakan data/informasi yang mungkin diperlukan untuk langkah berikutnya atau akan berguna untuk keseluruhan pendekatan pengujian.

Sering kali uji skrining termasuk dalam strategi pengujian berjenjang, dan umumnya dilakukan pada salah satu tingkat yang paling awal. Hal ini memungkinkan penggunaan sumber daya yang efisien pada beberapa tingkatan, misalnya untuk mengidentifikasi kebutuhan pengujian lebih lanjut dan untuk pengambilan keputusan dalam pengembangan produk dengan mempertimbangkan profil bahaya awal.

Skrining toksikologi merupakan bagian dari tingkatan paling awal dalam strategi pengujian cerdas berbasis bukti (ITS).^[6] ITS memperhitungkan data yang tersedia untuk material nano yang diminati dan memberikan strategi pengujian yang rasional untuk memahami sifat-sifat bahaya dari material nano tersebut tanpa harus menggunakan uji coba pada hewan yang tidak semestinya.

Selain metode *in vitro* dan *in vivo*, metode *in silico* dapat menjadi bagian dari ITS. Pada prinsipnya, metode analisis Hubungan Struktur-Aktivitas Kuantitatif (QSAR) dapat diterapkan pada partikel nano, asalkan deskriptor yang sesuai dapat ditemukan untuk mengaitkan karakteristik struktural dan fisikokimia partikel nano dengan aktivitas biologisnya.^{[7][8]} Hal ini dapat menghasilkan model yang menghasilkan prediksi kualitatif (misalnya potensi stres oksidatif) atau kuantitatif (misalnya potensi sitotoksik), tergantung pada data dan pendekatan pemodelan. Namun, hingga saat ini, hanya beberapa penelitian yang telah dipublikasikan, mungkin karena kurangnya kumpulan data yang sesuai.^{[9]-[17]} Tantangan dan keberhasilan baru-baru ini dalam mengembangkan QSAR untuk partikel nano diuraikan lebih lanjut di tempat lain.^{[18][19]}

When used in a tiered testing strategy, high throughput screening methods have the potential to eliminate further *in vivo* testing or to identify hazardous materials for targeted *in vitro* or *in vivo* investigation, thus streamlining the hazard identification process. The fact that screening assays can be conducted in a high-throughput fashion has especially important human health implications considering the complexity and the large number of NMs already on the market and currently in development.

However, there are also limitations of screening assays relative to more detailed, confirmatory assays; therefore, screening assays should be designed to be incorporated into an integrated testing strategy. Limitations of screening assays include

- screening assays often lack validated human predictability,
- extrapolation of dose-response relationships from screening assays to human exposure is complex, and
- prediction of human chronic exposure hazard from an acute exposure screen is difficult.

While screening tests are not meant to be used as stand-alone methods, they can eliminate further studies if the results suggest a NM is particularly toxic or non-toxic.

This means that screening assays in some instances will undoubtedly overestimate or underestimate human hazards.

5.2 Toxicological screening as part of tiered approaches to toxicological assessment of manufactured NMs

A tiered testing approach is based on a stepwise assessment, with each step of the assessment providing data/information that might be required for the subsequent step or will be of use for the whole testing approach.

Often screening tests are included in a tiered testing strategy, and they are generally carried out in one of the earliest tiers. This allows an efficient use of resources at several levels, e.g. both for identifying further testing needs and for decisions on product development in view of an early hazard profile.

Toxicological screening is part of most early tiers in weight-of-evidence-based, intelligent testing strategies (ITS).^[6] ITS take into account the data available for the nanomaterial of interest and provide a rational testing strategy to understand the hazard properties of that nanomaterial without resorting to undue animal testing.

In addition to *in vitro* and *in vivo* methods, *in silico* methods could form part of ITS. In principle, the methods of Quantitative Structure–Activity Relationship (QSAR) analysis can be applied to nanoparticles, provided that suitable descriptors can be found to associate the structural and physicochemical characteristics of nanoparticles with their biological activity.^{[7][8]} These could result in models that make qualitative (e.g. the potential for oxidative stress) or quantitative predictions (e.g. cytotoxic potency), depending on the data and modelling approach. To date, however, only a few studies have been published, probably due to a lack of suitable data sets.^{[9]–[17]} The challenges and recent successes of developing QSARs for nanoparticles are further outlined elsewhere.^{[18][19]}

5.3 Diskusi tentang dosis yang relevan untuk skrining toksikologi

Manusia dan lingkungan terpapar material nano melalui sejumlah rute yang terbatas, misalnya penghirupan, tertelan, kontak dengan kulit, atau, untuk lingkungan, air, udara, dan tanah. Konsentrasi paparan untuk beberapa skenario paparan ini dapat ditentukan, misalnya material nano di udara di tempat kerja atau partikel per gram emulsi minyak dalam air yang dioleskan ke kulit. Saat ini, konsentrasi paparan material nano yang direkayasa untuk lingkungan tidak diketahui. Meskipun kepastian konsentrasi ini diperlukan untuk penilaian risiko kuantitatif, namun tidak diperlukan untuk karakterisasi bahaya yang biasanya terkait dengan uji tingkat skrining. Seperti halnya semua penelitian, kehati-hatian sebaiknya dilakukan oleh penyelidik yang melakukan uji skrining dan oleh penilai yang mengevaluasi data sehingga hubungan antara efek dan dosis tidak ditafsirkan secara berlebihan. Jika memungkinkan, penyelidik sebaiknya menggunakan tingkat dosis yang mendekati perkiraan dosis yang dapat menyebabkan spesies yang menjadi perhatian terpapar; dengan demikian, penelitian *in vitro* pada kultur sel dari saluran pernapasan sebaiknya menggunakan konsentrasi yang berkaitan dengan beban paru-paru yang diamati setelah penghirupan, atau penelitian *in vitro* pada keratinosit harus menggunakan tingkat dosis yang konsisten dengan konsentrasi yang diterapkan pada kulit. Tingkat dosis lain dapat digunakan untuk menunjukkan respons terkait dosis. Untuk identifikasi potensi bahaya, umumnya digunakan respons dosis. Dosis terendah dari studi tersebut mungkin berada dalam rentang paparan yang diharapkan pada manusia. Tingkat dosis tambahan ini sering kali merupakan tingkat yang lebih-lebihkan dari paparan yang sebenarnya, tetapi berfungsi untuk menekankan sistem yang diselidiki dan untuk mengidentifikasi potensi bahaya.

Ada banyak faktor yang perlu dipertimbangkan dalam persiapan sampel untuk memastikan bahwa dosis yang ditargetkan dapat diberikan. Metode sebaiknya mempertimbangkan agen pendispersi yang diperlukan agar partikel tidak membentuk gumpalan dalam media kecuali jika aglomerasi dimaksudkan untuk dipertimbangkan dalam evaluasi. Jika agen pendispersi digunakan, agen tersebut harus dievaluasi untuk memastikan bahwa kontribusinya terhadap efek yang diamati dapat dipahami. Sebagai contoh, jika partikel nano sedang dievaluasi untuk efek toksik, agen pendispersi sebaiknya tidak berkontribusi terhadap efek toksik. Metode energi tinggi seperti ultrasonikasi digunakan untuk mendispersikan partikel. Dispersi semacam itu sebaiknya dipertimbangkan jika partikel yang dihasilkan mewakili partikel di lingkungan.

Seperti yang disebutkan di beberapa lokasi dalam Standar ini, informasi fisiko-kimia yang memadai sebaiknya diambil untuk memungkinkan para penyelidik mempertimbangkan beberapa metrik dosis (jumlah, massa, dan luas permukaan) yang ditemukan dalam literatur. Dalam hal studi lingkungan, perlu juga dilakukan pembedaan antara konsentrasi, paparan, dan dosis lingkungan. Perhatian khusus sebaiknya diberikan pada situasi di mana stabilitas dispersi lebih pendek dari durasi pengujian dan kemudian mempertimbangkan strategi dosis alternatif.

Berdasarkan sifatnya, uji skrining dimaksudkan untuk identifikasi bahaya dan untuk menemukan rentang ketika mempersiapkan protokol uji yang lebih rumit dan lebih teliti. Pembaca sebaiknya diingatkan bahwa tingkat dosis (dan konsentrasi lingkungan serta tingkat paparan) yang digunakan untuk penilaian risiko kemungkinan besar akan berbeda dengan tingkat dosis yang sesuai untuk identifikasi bahaya.

5.3 Discussion of relevant dosing for toxicological screening

Humans and the environment are exposed to NMs via a limited number of routes, e.g. inhalation, ingestion, dermal contact, or, for the environment, water, air, and soil. The exposure concentrations for some of these exposure scenarios can be determined, e.g. airborne NMs in the workplace or particles per gram of oil-in-water emulsions applied to the skin. Currently, the exposure concentrations of engineered NMs for the environment are unknown. While certainty of these concentrations is required for quantitative risk assessment, it is not required for the hazard characterization typically associated with screening level assays. As with all studies, care should be employed by the investigator conducting screening assays and by the assessors evaluating the data so that the relationship between effect and dose is not overly interpreted. Whenever possible, investigators should use dose levels that approximate the estimated dose to which the species of concern might be exposed; thus, *in vitro* studies of cell cultures from the respiratory tract should use concentrations that relate to lung burden observed following inhalation, or *in vitro* studies of keratinocytes should use dose levels that are consistent with concentrations applied to the skin. Other dose levels could be used to demonstrate dose-related responses. For potential hazard identification, the dose-response is generally used. The lowest dose of such study might be in the range of expected human exposure. These additional dose levels are frequently exaggerated levels of real exposures, but they serve to stress the system investigated and to identify potential hazards.

There are many factors that need to be considered in sample preparation to ensure that the targeted doses are delivered. Methods should consider if dispersing agents are needed so that particles do not form agglomerates in media unless the agglomeration is intended to be considered in evaluations. If dispersing agents are used they need to be evaluated to ensure that their contribution to observed effects is understood. For example, if a nanoparticle is being evaluated for toxic effects the dispersing agent should not also contribute to the toxic effects. High energy methods such as ultrasonication are used to disperse particles. Such dispersion should be considered if the resulting particles are representative of particles in the environment.

As is noted at several locations in this Standard, sufficient physico-chemical information should be taken to allow investigators to consider the several dose-metrics (number, mass, and surface area) found in the literature. In the case of environmental studies, need should also be taken to differentiate among environmental concentration, exposure, and dose. Particular attention should be paid to situations where dispersion stability is shorter than the test duration and then consider alternative dosing stratagems.

By their nature, screening tests are intended for hazard identification and for range-finding when preparing for the more involved, exacting test protocols. Readers should be reminded that the dose levels (and environmental concentrations and exposure levels) used for risk assessment will likely differ from those appropriate to hazard identification.

5.4 Diskusi mengenai hubungan antara Standar ini dengan ISO/DTR 16196, Kompilasi dan deskripsi persiapan sampel dan metode pemberian dosis untuk material nano yang dimanufaktur

Standar ini dikembangkan bersama dengan dokumen pendampingnya, ISO/DTR 16196¹.^[20] ISO/DTR 16196 membahas metode yang digunakan untuk menyiapkan sampel dalam berbagai media yang relevan untuk studi toksikologi, dan juga membahas isu-isu metrik dosis yang relevan untuk pengujian toksikologi dengan mempertimbangkan berbagai rute pemberian. Standar ini melengkapi ISO/DTR 16196 dengan beralih dari persiapan sampel dan dosimetri ke diskusi yang lebih rinci tentang berbagai metode yang digunakan untuk melakukan skrining toksikologi. Ketika menggunakan Standar ini, penting untuk mempertimbangkan ISO/DTR 16196, karena kesulitan yang terkait dengan preparasi sampel dan dosimetri sering kali menjadi masalah dalam melakukan penilaian toksikologi yang baik terhadap material nano.

5.5 Diskusi mengenai hubungan antara Standar ini dengan ISO/TR 13014, Nanoteknologi - Panduan karakterisasi fisiko-kimia material berskala nano yang direkayasa untuk penilaian toksikologi

ISO/TR 13014 membahas pentingnya karakterisasi material nano saat melakukan pengujian toksikologi dan memberikan daftar parameter yang penting untuk diukur dengan mempertimbangkan kondisi pengetahuan saat ini dan hubungan parameter material nano dengan hasil yang berpotensi merugikan.^[3]

ISO/TR 13014 merekomendasikan karakterisasi material nano yang ketat untuk lebih memahami dan menginterpretasikan hasil pengujian toksikologi; oleh karena itu, ini merupakan material latar belakang yang sangat baik untuk Standar ini.

5.6 Reviu atas kegiatan internasional yang relevan dan dokumen yang dipublikasikan

Upaya lain untuk menstandarisasi pengujian toksisitas nano dipimpin oleh OECD dan ASTM International serta beberapa Lembaga Metrologi Nasional.^[21] Kelompok Kerja OECD untuk Material Nano yang dimanufaktur (WPMN) didirikan pada tahun 2006 dan terdiri dari sembilan kelompok pengarah (*steering group*, SG) pada tahun 2011.

¹ ISO/DTR 16196 saat ini sedang dalam tahap pengembangan.

5.4 Discussion of the relationship between this Standard and ISO/DTR 16196, Compilation and description of sample preparation and dosing methods for manufactured NMs

This Standard was developed in concert with a sister document, ISO/DTR 16196^{1,[20]} ISO/DTR 16196 discusses methods used to prepare samples in various relevant media for toxicological studies, and also discusses issues of relevant dose metrics for toxicological testing considering the various routes of administration. This Standard complements ISO/DTR 16196 by moving from sample preparation and dosimetry into a more detailed discussion of the various methods used to perform toxicological screening. When using this Standard, it is important to consider ISO/DTR 16196, because difficulties associated with sample preparation and dosimetry are often problematic in performing a good toxicological assessment of NMs.

5.5 Discussion of the relationship between this Standard and ISO/TR 13014, Nanotechnologies — Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicological assessment

ISO/TR 13014 discusses the importance of NM characterization when performing toxicological testing and provides a list of parameters that are important to measure considering the current state of knowledge and the relationship of the nanomaterial parameter to a potentially adverse outcome.^[3]

ISO/TR 13014 recommends rigorous characterization of the NM in order to better understand and interpret the results of any toxicological testing; therefore, it is excellent background material for this Standard.

5.6 Review of other relevant international activities and published documents

Other efforts to standardize nanotoxicity testing are led by OECD and ASTM International as well as several National Metrology Institutes.^[21] OECD's Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMN) was established in 2006 and consists of nine steering groups (SG) as of 2011.

¹ ISO/DTR 16196 is currently under development.

Tabel 1 — Kelompok Kerja OECD pada Kelompok Pengarah material nano yang dimanufaktur

Kelompok pengarah	Nama kelompok pengarah
SG1/SG2	Basis Data OECD terkait Material Nano yang dimanufaktur untuk Menginformasikan dan Menganalisis aktivitas penelitian EHS
SG3	Pengujian Keselamatan Satu Set Mewakili Material Nano yang Dimanufaktur
SG4	Material Nano yang Dimanufaktur dan Panduan Uji
SG5	Kerja sama di Bidang Skema Sukarela dan Program Terkait Regulasi
SG6	Kerja sama di Bidang Kajian Risiko
SG7	Aturan Metode Alternatif dalam Toksikologi Nano
SG8	Pengukuran Paparan dan Mitigasi Paparan
SG9	Keberlanjutan Penggunaan secara Lingkungan Material Nano yang Dimanufaktur

WPMN SG4 telah melakukan revidi komprehensif terhadap pedoman uji OECD untuk penerapannya pada material nano yang dimanufaktur. Temuan umumnya adalah bahwa pada prinsipnya, metode pengujian OECD yang ada mampu mendeteksi efek material nano. Catatan panduan tentang persiapan sampel dan dosimetri untuk pengujian keamanan material nano dan penilaian risiko diterbitkan pada tahun 2012.^[22]

Pada tahun 2011, Otoritas Keamanan Pangan Eropa (EFSA) mempublikasikan dokumen panduan untuk kajian risiko aplikasi material nano yang direkayasa (ENM) dalam pangan dan pakan. Panduan tersebut meliputi kajian risiko untuk aplikasi pangan dan pakan termasuk aditif pangan, enzim, penyedap rasa, material kontak pangan, makan yang baru ditemukan, aditif pakan dan pestisida (tersedia di <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2140.htm>).

Panduan tentang penilaian keamanan material nano dalam kosmetik dikeluarkan oleh Komite Ilmiah Komisi Eropa untuk Keamanan Konsumen (SCCS) pada tahun 2012 (tersedia di http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_005.pdf).

Komite Teknis internasional ASTM untuk Nanoteknologi, E56, telah mengembangkan dan menerbitkan tiga standar untuk pengujian toksikologi material nano (lihat Tabel 2).

Tabel 2 — Daftar standar yang di publikasi dari ASTM E56 terkait pengujian toksikologi

Nomor acuan	Judul
E2524-08	Metode Uji Standar untuk Analisis sifat Hemolitik Partikel Nano
E2525-08	Metode Uji Standar untuk Evaluasi Dampak Material Partikulat Nano pada Pembentukan Koloni Makrofag Granulosit Tikus
E2526-08	Metode Uji Standar untuk Evaluasi Sitotoksitas Material Partikulat Nano pada Sel Ginjal Babi dan Sel Hepatokarsinoma Manusia

Basis data yang komprehensif mengenai dampak kesehatan, keselamatan, dan lingkungan dari partikel nano (NHECD) baru-baru ini dibuat dengan pendanaan dari Kerangka Kerja ke-7 Uni Eropa (tersedia di www.nhecd-fp7.eu). Tempat penyimpanan informasi ini terbuka untuk pembaruan otomatis dan evaluasi kritis dari para penggunanya.

Table 1 — OECD Working Party on Manufactured Nanomaterials Steering Groups

Steering group	Steering group title
SG1/SG2	OECD Database on Manufactured NMs to Inform and Analyse EHS Research Activities
SG3	Safety Testing a Representative Set of Manufactured Nanomaterials (NMs)
SG4	Manufactured NMs and Test Guidelines
SG5	Co-operation on Voluntary Schemes and Regulatory Programmes
SG6	Co-operation on Risk Assessment
SG7	The Role of Alternative Methods in Nanotoxicology
SG8	Exposure Measurement and Exposure Mitigation
SG9	Environmentally Sustainable Use of Manufactured NMs

WPMN SG4 has conducted a comprehensive review of the OECD test guidelines for their applicability to manufactured NMs. The general finding was that in principle, existing OECD test methods are capable of detecting effects of NMs. The guidance notes on sample preparation and dosimetry for safety testing of NMs and risk assessment were published in 2012.^[22]

In 2011, the European Food Safety Authority (EFSA) published a guidance document for the risk assessment of engineered nanomaterial (ENM) applications in food and feed. The guidance covers risk assessments for food and feed applications, including food additives, enzymes, flavourings, food contact materials, novel foods, feed additives, and pesticides (available at <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2140.htm>).

Guidance on the safety assessment of nanomaterials in cosmetics was issued by the European Commission's Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) in 2012 (available at http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_005.pdf).

ASTM international Technical Committee on Nanotechnology, E56, has developed and published three standards for nanomaterial toxicological testing (see Table 2).

Table 2 — List of published standards from ASTM E56 related to toxicological testing

Reference number	Title
E2524-08	Standard Test Method for Analysis of Haemolytic Properties of Nanoparticles
E2525-08	Standard Test Method for Evaluation of the Effect of Nanoparticulate Materials on the Formation of Mouse Granulocyte Macrophage Colonies
E2526-08	Standard Test Method for Evaluation of Cytotoxicity of Nanoparticulate Materials in Porcine Kidney Cells and Human Hepatocarcinoma Cells

A comprehensive database on the health, safety, and environmental impact of nanoparticles (NHECD) was recently established with funding from the EU 7th Framework (available at www.nhecd-fp7.eu). This information repository is open to automatic updates and critical evaluation by its users.

6 Metode untuk skrining toksikologi yang berkaitan dengan kesehatan manusia

6.1 Umum

Metode skrining *in vitro* dapat berupa pengujian atau uji seluler atau aseluler (bebas sel). Metode bebas sel digunakan untuk memeriksa efek nonspesifik material nano, seperti interaksi dengan protein dalam media kultur sel atau plasma atau potensi menghasilkan radikal bebas.

Uji seluler dapat digunakan untuk memeriksa kemampuan material nano untuk mengganggu proses biologis yang penting untuk pemeliharaan homeostasis seluler. Proses-proses ini antara lain mencakup kelangsungan hidup sel, proliferasi, replikasi DNA, dan pembelahan seluler. Metode skrining *in vitro* juga telah berhasil digunakan untuk menentukan efek merusak dari material nano, seperti kerusakan DNA, mutagenisitas, apoptosis, atau nekrosis. Meskipun uji *in vitro* berbasis titik akhir individu tidak dimaksudkan untuk mengukur efek pada tingkat seluruh organisme, baterai uji *in vitro* dapat berpotensi memprediksi efek *in vivo* (misalnya fungsi organ tertentu atau jalur atau proses spesifik jaringan). Strategi skrining *in vitro* dengan hasil tinggi juga merupakan komponen dari inisiatif 'Pengujian Toksisitas pada Abad ke-21' yang dikeluarkan oleh Dewan Riset Nasional Amerika Serikat^[23]. Dalam pendekatan pengujian berjenjang, metode skrining dapat berfungsi sebagai tingkat pertama untuk identifikasi bahaya dan penentuan prioritas material nano yang memerlukan pengujian dan validasi lebih lanjut melalui pengujian konfirmatori, jika disyaratkan oleh kerangka kerja peraturan yang relevan atau konteks penggunaan. Metodologi skrining alternatif juga dapat diintegrasikan ke dalam pendekatan pengujian berjenjang. Teknik-teknik ini mencakup platform dengan konten tinggi, tetapi dengan hasil menengah, seperti genomik, proteomik, dan metabolomik. Pendekatan-pendekatan ini dapat memberikan informasi tentang semua proses biologis yang dapat terpengaruh sebagai respons terhadap paparan material nano dalam satu percobaan untuk sampel tertentu. Disarankan untuk melakukan beberapa uji skrining, jika memungkinkan, untuk menghindari hasil positif palsu atau negatif palsu.

6.2 Kontrol positif dan negatif untuk pengujian toksisitas material nano

Agar lebih bermakna, percobaan skrining sebaiknya menyertakan kontrol positif dan negatif.

Biasanya, kontrol positif digunakan untuk memvalidasi prosedur eksperimental. Kontrol positif sebaiknya diketahui dari pengalaman sebelumnya untuk menginduksi respons yang merugikan ketika mengekspos sistem pengujian terhadapnya. Agar relevan, kontrol positif harus memiliki karakteristik fisikokimia yang sama dengan material nano, setidaknya, mewakili kelas yang sama, misalnya oksida logam, logam, polimer, dan lain-lain. Dengan begitu, material nano yang tidak diketahui toksisitasnya dapat dibandingkan dengan material acuan yang toksisitasnya telah dikarakterisasi dengan baik, dan, sebaiknya, mengikuti mekanisme biologis yang diketahui. Selain itu, rentang dosis kontrol positif sebaiknya mencerminkan kondisi paparan di dunia nyata. Silika kristal (*nanoUsil*) telah digunakan sebagai kontrol positif untuk toksikologi partikel dalam kasus studi instilasi intratrakeal. Silika kristal telah diketahui dapat menginduksi respons inflamasi secara *in vivo*. Demikian pula, serat asbes juga telah digunakan sebagai kontrol positif untuk toksikologi serat secara *in vivo* dan *in vitro*. Para pengguna Standar ini sebaiknya selalu mempertimbangkan partikel dan serat kontrol positif yang tepat ketika merancang uji skrining.

Sebaliknya, kontrol negatif sebaiknya menghasilkan efek yang dapat diabaikan atau efek tingkat rendah yang selanjutnya dapat diperlakukan sebagai toksisitas tingkat latar belakang. Jika efek positif diamati setelah paparan pada kontrol negatif, biasanya hal ini mengindikasikan bahwa ada beberapa faktor lain yang berperan dan hasil eksperimen sebaiknya dibuang.

6 Methods for toxicological screening related to human health

6.1 General

In vitro screening methods can be either cellular or acellular (cell-free) assays or tests. Cell-free methods are used to examine the non-specific effects of NMs, such as interaction with proteins in cell culture media or plasma or the potential to generate free radicals.

Cellular assays can be employed to examine the ability of the NMs to interfere with the biological processes essential for maintenance of cellular homeostasis. These processes include cell survival, proliferation, DNA replication, and cellular division, among others. *In vitro* screening methods have also been successfully used to determine deleterious effects of NMs, such as DNA damage, mutagenicity, apoptosis, or necrosis. Although individual, end point-based *in vitro* tests are not intended to measure effects at the level of the whole organism, batteries of *in vitro* tests can be potentially predictive of *in vivo* effects (e.g. specific organ function or tissue specific pathways or processes). High-throughput *in vitro* screening strategy is also a component of the 'Toxicity Testing in the 21st Century' initiative issued by the United States National Research Council.^[23] In a tiered testing approach, screening methods can serve as a first tier for hazard identification and prioritization of NMs that require further testing and validation through confirmatory assays, if required by the relevant regulatory framework or use context. Alternate screening methodologies can also be integrated into a tiered testing approach. The techniques include high-content, but medium-throughput, platforms, such as genomics, proteomics, and metabolomics. These approaches can provide information on all biological processes that can be affected in response to nanomaterial exposure in a single experiment for a given sample. It is recommended to perform multiple screening tests, if possible, to avoid false positives or false negatives.

6.2 Positive and negative controls for nanomaterial toxicity testing

In order to be meaningful, the screening experiment should incorporate the positive and negative controls.

Typically, the positive control is used to validate the experimental procedure. A positive control should be known from previous experience to induce an adverse response when exposing the test system to it. In order to be relevant, the positive control has to share common physicochemical characteristics with a NM, at least, represent a similar class, for example metal oxides, metals, polymers etc. That way, the NM of unknown toxicity could be benchmarked with a reference material whose toxicity has been well characterized, and, preferably, follows a known biological mechanism. Moreover, a positive control dosing range should reflect real-world exposure conditions. Crystalline silica (nanoUsil) has been used as positive control for particle toxicology in case of intratracheal instillation studies. The crystalline silica has been known to induce inflammatory response *in vivo*. Similarly asbestos fibres also have been used as positive control for fibre toxicology *in vivo* and *in vitro*. The users of this Standard should always consider proper positive control particles and fibres when designing screening tests.

A negative control, on the other hand, should produce a negligible or low level effect that could further be treated as a background level toxicity. If a positive effect is observed following exposure to a negative control, it usually indicates that some other factors are at play and experiment results should be discarded.

Protokol skrining toksisitas yang telah ada dikembangkan untuk zat kimia dan partikulat berskala lebih besar, oleh karena itu, uji skrining toksikologi nano saat ini sebagian besar mengandalkan zat kimia atau partikulat yang lebih besar sebagai kontrol uji. Diharapkan bahwa kontrol berbasis material nano akan secara bertahap menggantikan tolok ukur pengujian tradisional ketika uji skrining toksikologi partikel nano khusus dikembangkan. Seiring dengan munculnya jenis material acuan partikel nano lainnya, hal ini akan memfasilitasi pembuatan infrastruktur pengukuran toksikologi nano, yang dimaksudkan untuk merampingkan proses skrining dan mengurangi ketidakkonsistenan hasil akhir di antara laboratorium yang berbeda. Baru-baru ini istilah *Representative Test Material* (RTM) diperkenalkan untuk satu set material nano yang dikarakterisasi dengan baik yang tersedia bagi para peneliti dari Uni Eropa – Pusat Penelitian Bersama di Ispra, repositori material nano Italia.^[24] Material nano ini banyak digunakan sehingga banyak informasi dasar yang tersedia untuk material nano ini.

6.3 Metode yang relevan untuk skrining toksikologi *in vitro* dari material nano yang dimanufaktur

6.3.1 Umum

Langkah pertama dalam membangun rangkaian skrining *in vitro* adalah mengidentifikasi pengujian *in vitro* yang relevan untuk disertakan. Secara umum, pengujian *in vitro* untuk pengujian material nano sebaiknya menyertakan kontrol positif dan negatif serta kriteria penerimaan untuk memastikan kinerja pengujian. Kontrol positif dan negatif secara ideal sebaiknya berupa partikel nano yang terkait dengan (atau tidak terkait, dalam kasus kontrol negatif) bahaya bagi manusia, yang dasar mekanismenya dievaluasi oleh pengujian. Dalam kasus ketika kontrol partikel nano tersebut belum diidentifikasi, kontrol molekul kecil cocok digunakan. Pengujian juga sebaiknya mencakup metode untuk mengidentifikasi interferensi partikel nano, karena ada banyak contoh interferensi sebagai akibat dari spektral partikel nano, katalitik, atau sifat absorpsi reagen.^{[25][26][27]} Selain itu, adalah bijaksana untuk menggunakan beberapa pengujian untuk mengukur mekanisme yang sama, untuk mengidentifikasi potensi hasil positif dan negatif palsu.

Idealnya, pengujian *in vitro* yang dimasukkan ke dalam rangkaian skrining bahaya material nano sebaiknya divalidasi untuk kemampuannya dalam memprediksi bahaya aktual pada manusia, kecuali efek lokal, dan menyertakan material nano kontrol positif yang sesuai. Kegunaan metode *in vitro* ini untuk tujuan skrining, dan sesekali menyortir (*triaging*) bahan positif ke dalam *bioassay* tingkat yang lebih tinggi, bergantung pada prediktabilitas ini. Yang menggembirakan, data terbaru menunjukkan bahwa menggabungkan respons stres oksidatif *in vitro* dengan konversi dosimetri luas permukaan sangat menjanjikan untuk prediksi peradangan paru akut.^[28] Hasil dari banyak uji *in vitro* telah memprediksi respons manusia, dan para peneliti didorong untuk menggunakan (dan mengembangkan lebih lanjut) uji *in vitro* yang dikontrol dengan cermat dan dirancang dengan baik yang dapat memprediksi efek kesehatan manusia.^{[28][29][30][31][32][33][34]} Namun, dalam beberapa kasus, mekanisme yang berbeda bertanggung jawab atas toksisitas yang teramati dibandingkan dengan mekanisme yang sedang diukur, atau uji *in vitro* itu sendiri tidak secara akurat mengukur target-target mekanistik ini. Apa pun itu, ini merupakan masalah besar untuk skrining material nano untuk bahaya dengan uji *in vitro*. Untuk beberapa pengujian (misalnya sitotoksitas, genotoksitas), absorpsi dan kontak partikel dalam nano sel perlu ditunjukkan, karena tidak adanya efeknya mungkin disebabkan oleh kurangnya paparan organ target di dalam sel.

The established toxicity screening protocols were developed for chemical substances and larger scale particulates, therefore, current nanotoxicology screening assays mostly rely on chemical or larger particulate substances as assay controls. It is expected that nanomaterial-based controls will gradually replace traditional test benchmarks when the dedicated nanoparticle toxicology screening assays are developed. Along with the emergence of the other nanoparticle reference materials types, this should facilitate the creation of the nanotoxicology measurement infrastructure, intended to streamline the screening process and reduce the end result inconsistency among different laboratories. Recently the term Representative Test Material (RTM) was introduced for a set of well characterized NMs that are available for researchers from European Union – the Joint Research Center in Ispra, Italy NM repository.^[24] These NMs are widely used so a lot of basic information is available for these nanomaterials.

6.3 Relevant methods for *in vitro* toxicological screening of manufactured NMs

6.3.1 General

The first step in building an *in vitro* screening set is identifying the relevant *in vitro* assays to include. In general, *in vitro* assays for testing of NMs should incorporate positive and negative controls and acceptance criteria to ensure assay performance. The positive and negative controls ideally should be nanoparticles associated with (or unassociated, in the case of the negative control) a human hazard, the mechanistic basis of which is evaluated by the assay. In cases where such nanoparticle controls have not been identified, small molecule controls are suitable. Assays should also include methods to identify nanoparticle interference, as there are many instances of interference as a result of nanoparticle spectral, catalytic, or reagent absorption properties.^{[25][26][27]} Furthermore, it is prudent to use multiple assays to measure the same mechanism, in order to identify potential false positive and negative results.

Ideally, the *in vitro* assays incorporated into a nanomaterial hazard screening set should be validated for their ability to predict actual human hazards, except local effects, and include appropriate positive control NMs. The utility of these *in vitro* methods for screening purposes, and eventual triaging of the positive materials into higher tier bioassays, depends upon this predictability. Encouragingly, recent data suggest that combining *in vitro* oxidative stress responses with surface area dosimetric conversions holds great promise for prediction of acute pulmonary inflammation.^[28] The results of many *in vitro* assays have been predictive of the human response, and researchers are encouraged to use (and further develop) carefully controlled and well-designed *in vitro* assays that are predictive of human health effects.^{[28][29][30][31][32][33][34]} However, in some cases, different mechanisms are responsible for the observed toxicities than the ones being measured, or the *in vitro* assays themselves do not accurately measure these mechanistic targets. Either way, this represents an enormous problem for screening of NMs for hazard by *in vitro* assays. For several assays (e.g. cytotoxicity, genotoxicity) nanoparticle uptake and contact in cells needs to be demonstrated, because the absence of the effect might be due to lack of exposure of the target organelles in the cells.

Toksikologi material nano yang direkayasa masih merupakan ilmu yang sangat muda dibandingkan dengan toksikologi molekul kecil, dan bahkan untuk molekul kecil, mengembangkan serangkaian uji *in vitro* yang bersifat prediktif dan inklusif terhadap semua potensi bahaya merupakan tantangan dan tidak lengkap.^[35] Memisahkan toksikan yang diketahui ke dalam kelas-kelas yang diakui membuat masalah dalam mengidentifikasi pengujian yang relevan menjadi lebih mudah; kelas toksikan molekul kecil, misalnya pengganggu endokrin, dikaitkan dengan toksisitas yang ditentukan, mekanisme kerja, hubungan struktur-aktivitas, dan yang terpenting untuk tujuan skrining, pengujian *in vitro* yang tervalidasi. Hal yang sama kemungkinan akan berlaku untuk toksikologi material nano di masa depan, dengan segmentasi racun material nano ke dalam kelas-kelas berdasarkan sifat fisikokimia yang khas, dengan toksisitas dan mekanisme aksi yang terdefinisi dengan baik.

Sayangnya, sebagai sebuah ilmu, toksikologi material nano belum mencapai tingkat kecanggihan ini. Serupa dengan material nano, dalam banyak kasus, dasar mekanistik toksisitas molekul kecil tidak diketahui. Dalam kasus-kasus ini, program-program seperti *ToxCast* milik Badan Perlindungan Lingkungan Amerika Serikat (EPA)^[35] menggunakan profil bioaktivitas dari toksikan yang diketahui di seluruh matriks uji *in vitro* yang besar untuk mengidentifikasi ciri-ciri khas dalam memprediksi bahaya entitas kimia baru.^[35] Pembuatan profil matriks dari toksikan material nano yang diketahui di seluruh rangkaian *bioassay* yang besar dengan tujuan untuk mengidentifikasi ciri-ciri toksisitas juga dapat menjadi harapan untuk prediksi bahaya material nano.

Peradangan yang dimediasi stres oksidatif saat ini merupakan paradigma mekanistik yang paling mapan dalam toksikologi partikel nano.^{[36][37]} Namun, sebaiknya dicatat bahwa paradigma ini telah dikembangkan hampir secara eksklusif oleh para peneliti yang mempelajari toksisitas paru yang timbul dari paparan inhalasi terhadap material nano dan mungkin tidak relevan untuk toksisitas yang mempengaruhi organ target alternatif dan/atau skenario paparan alternatif. Fakta ini dapat membatasi kegunaan skrining yang menggabungkan serangkaian uji stres oksidatif dan inflamasi untuk mengevaluasi secara ketat material nano terhadap bahaya lingkungan atau pekerjaan, dengan paparan inhalasi merupakan perhatian utama. Untuk tujuan lain ketika paparan inhalasi bukan merupakan perhatian utama, seperti aplikasi biomedis, pengujian ini mungkin tidak relevan. Misalnya, rangkaian skrining yang menggabungkan uji hematologi mungkin lebih relevan untuk aplikasi biomedis yang memanfaatkan pemberian sistemik.^[38] Demikian pula, pengujian fototoksikitas kulit dan fungsi penghalang mungkin lebih tepat untuk skrining partikel nano yang ditujukan untuk aplikasi topikal, seperti yang digunakan dalam losion tabir surya. Oleh karena itu, penting bagi para peneliti dan pihak lain yang menggunakan uji *in vitro* sebagai bagian dari rangkaian skrining untuk memahami konteks pengembangan uji individual tersebut, seperti rute pemaparan yang diinginkan dan organ target. Memang benar, seiring berkembangnya bidang toksikologi material nano pengujian mekanistik baru kemungkinan akan diidentifikasi dan divalidasi tidak hanya untuk prediksi toksisitas spesifik yang timbul dari skenario paparan spesifik, namun juga untuk kelas material nano spesifik.

6.3.2 Metode skrining sitotoksitas

Uji sitotoksitas adalah uji *in vitro* yang paling dasar dan umum dan sesuai dengan uji *in vivo* akut dosis tinggi ketika sel atau *cell line* yang sesuai digunakan. Biasanya sitotoksitas dievaluasi dengan konsentrasi mematikan 50% (LC₅₀) atau konsentrasi efektif 50% (EC₅₀) 24 jam setelah paparan. Karena uji sitotoksitas sering dilakukan dengan adanya serum janin sapi (*fetal bovine serum*, FBS) atau dalam kondisi pertumbuhan, EC₅₀ adalah istilah yang lebih tepat dibandingkan LC₅₀, karena jumlah sel akan meningkat selama 24 jam kultur.

The toxicology of engineered NMs is still a very young science in comparison to small molecule toxicology, and even for small molecules, developing sets of *in vitro* assays that are both predictive and inclusive of all potential hazards has been challenging and incomplete.^[35] Separating known toxicants into recognized classes makes the problem of identifying relevant assays more tractable; small molecule toxicant classes, e.g. endocrine disrupters, are associated with defined toxicities, mechanisms of action, structure-activity-relationships, and, most importantly for screening purposes, validated *in vitro* assays. The same will likely be true of nanomaterial toxicology in the future, with segmentation of nanomaterial toxins into classes based on characteristic physicochemical properties, with well-defined toxicities and mechanisms of action.

Unfortunately, as a science, nanomaterial toxicology has not reached this level of sophistication. Similar to NMs, in many cases, the mechanistic basis of small molecule toxicities are unknown. In these cases, programs such as the United States Environmental Protection Agency's (EPA) ToxCast^[35] are using bioactivity profiling of known toxicants across large *in vitro* assay matrices to identify characteristic signatures for predicting the hazards of new chemical entities.^[35] Matrix profiling of known nanomaterial toxicants across large sets of bioassays for the purpose of identifying toxicity signatures could also hold promise for nanomaterial hazard prediction.

Oxidative stress-mediated inflammation is currently the most well established mechanistic paradigm in nanoparticle toxicology.^{[36][37]} However, it should be noted that this paradigm has been developed almost exclusively by researchers studying pulmonary toxicities arising from inhalation exposure to NMs and might not be relevant for toxicities affecting alternate target organs and/or by alternate exposure scenarios. This fact could limit the utility of a screening incorporating a base set of oxidative stress and inflammatory assays to strictly evaluate the NMs for environmental or occupational hazard, where inhalation exposure is the primary concern. For other purposes in which inhalation exposure is not the primary concern, such as biomedical applications, these assays might not be relevant. For example, screening sets incorporating haematological assays could be more relevant for biomedical applications that utilize systemic administration.^[38] Similarly, cutaneous phototoxicity testing and barrier function could be more appropriate for screening nanoparticles intended for topical applications, such as those used in sunscreen lotions. Therefore, it is important that researchers and others using any *in vitro* assay as part of a screening set understand the context for which the individual assay was developed, such as the intended route of exposure and target organ. Indeed, as the field of nanomaterial toxicology evolves, new mechanistic assays will likely be identified and validated for not only prediction of specific toxicities arising from specific exposure scenarios, but also for specific NM classes.

6.3.2 Cytotoxicity screening methods

The cytotoxicity test is the most basic and common *in vitro* assay and corresponds to the acute high-dose *in vivo* test when appropriate cells or cell lines are used. Usually the cytotoxicity is evaluated by 50 % lethal concentration (LC₅₀) or 50 % effective concentration (EC₅₀) 24 h after exposure. Since the cytotoxicity assay is often carried out in the presence of fetal bovine serum (FBS) or in growth condition, EC₅₀ is a more proper term than LC₅₀, because the cell number would increase during 24 h of culture.

Metode pengujian yang biasa digunakan untuk pengukuran sitotoksitas bahan kimia dapat diterapkan pada uji sitotoksitas material nano. Metode yang paling populer adalah 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil) -2,5 -dipenil-2H-tetrazolium bromida (MTT) atau MTT yang dimodifikasi. Alamar blue, pelepasan LDH, dan penghitungan jumlah sel dengan metode uji pengecualian pewarna *trypan blue* juga telah digunakan secara rutin. Kehadiran material nano yang tidak transparan dalam sampel pengukuran mungkin mengganggu nilai kolorimetri atau fluorometri dalam uji sitotoksitas. Masalah ini dapat dihindari dengan memindahkan supernatan larutan pengujian secara hati-hati ke sumur atau kuvet lain sebelum pengukuran. Namun, kemampuan partikel nano yang diuji untuk menyerap produk akhir dari sistem pengujian dan/atau kemampuannya untuk mengganggu penyerapan cahaya fluoresensi atau sinar UV-tampak juga sebaiknya diselidiki. Jika adsorpsi atau interferensi tersebut dipastikan, pengujian ini mungkin tidak memberikan hasil yang dapat diandalkan mengenai toksisitas material nano yang diuji. Pengendalian yang tepat terhadap interferensi tersebut perlu dimasukkan dalam pengujian.

Ketika material nano hidrofobik diuji dalam uji sitotoksitas, kemampuan dispersi material uji adalah salah satu penentu utama, karena material hidrofobik yang diaglomerasi bahkan mungkin tidak mencapai lapisan tunggal sel. Sebaiknya juga dicatat bahwa polaritas potensi zeta, salah satu karakteristik terpenting partikel yang menentukan serapan seluler, dapat diubah oleh beberapa bahan tambahan dan/atau pelapis.^[39] Oleh karena itu, lebih baik untuk mengukur tingkat penyerapan material nano oleh seluler sebelum pengukuran sitotoksitas.^[40]

6.3.3 Metode skrining respons inflamasi dan imun

Evaluasi imunotoksitas material nano mungkin menghadapi tantangan yang berbeda dari pengujian imunotoksitas farmasi dan kimia konvensional. Material nano mungkin memiliki sifat fisikokimia yang berbeda dari material non-skala nano. Sifat fisikokimia yang berasal dari ukuran skala nano ini kemudian dapat menjadi pertimbangan utama untuk evaluasi imunotoksitas material nano. Ukuran partikel dan distribusi dalam kaitannya dengan luas permukaan juga telah diidentifikasi sebagai parameter penting dalam menilai aspek lingkungan, kesehatan, dan keselamatan material nano. Kekhususan ukuran sehubungan dengan toksisitas suatu material telah dibahas dalam kaitannya dengan luas permukaannya.^{[41][42]} Reaksi kimia terjadi pada permukaan; oleh karena itu, material dengan luas permukaan yang besar diharapkan memiliki reaktivitas yang lebih tinggi berdasarkan massa dibandingkan material yang sama dengan rasio luas permukaan terhadap volume yang rendah. Agregasi/aglomerasi juga dapat mempengaruhi konsumsi partikel oleh makrofag alveolar. Partikel yang terhirup ke paru-paru biasanya dikenali dan dibersihkan oleh makrofag. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa makrofag lebih mudah mengenali partikel yang teragregasi atau diaglomerasi dibandingkan partikel nano individual dan membersihkan partikel yang teragregasi atau diaglomerasi dengan kecepatan yang jauh lebih cepat dibandingkan partikel skala nano individual. Efek bentuk terhadap toksisitas material nano belum sepenuhnya diselidiki, namun publikasi terbaru menunjukkan bahwa serat nano dengan rasio aspek tinggi (HARN) telah terbukti berpotensi menyebabkan respons seperti asbes dalam penelitian pada hewan.^[43] Pada tahun 2007 terbitan komprehensif tentang metode yang didedikasikan untuk evaluasi imunotoksitas pada model hewan diterbitkan.^[44]

Untuk sensitisasi kulit (hipersensitivitas tipe tertunda), tiga uji *in vivo* saat ini tersedia yaitu uji maksimalisasi kelinci percobaan (GPMT), uji Beuhler (BT), dan uji kelenjar getah bening lokal (LLNA).^[45] Dua pengujian terakhir bergantung pada penetrasi kulit dari material yang akan diuji sebelum sensitisasi dapat terjadi. Namun, penetrasi kulit untuk material nano umumnya dianggap rendah atau tidak ada sama sekali.^{[46]-[49]} Saat ini, untuk bahan kimia, uji alternatif *in vitro* sedang dikembangkan untuk pengujian sensitisasi kulit. Keberlakuan untuk material nano masih belum diketahui.

The assay methods commonly used for the cytotoxicity measurement of chemicals can be applied to cytotoxicity assay of NMs. The most popular method is 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) or modified MTT. Alamar blue, LDH release, and the cell number counting with trypan blue dye exclusion assay methods have been routinely used as well. The presence of non-transparent NMs in the measurement samples might disturb the colourimetric or fluorometric value in cytotoxicity assays. This problem can be avoided by transferring the supernatant of the assay solution carefully to another well or cuvette before the measurement. However, the ability of the tested nanoparticles to adsorb the final product of the test system and/or their ability to interfere in their fluorescence or UV-visible light absorption should also be investigated. If such adsorption or interference is confirmed, these tests might not produce reliable results on the toxicity of the tested NMs. Proper controls for such interferences need to be included in the assays.

When hydrophobic NMs are tested in the cytotoxicity assay, the dispersability of test materials is one of the major determinants, since agglomerated hydrophobic materials might not even reach to the cell monolayer. It should be also noted that the polarity of the zeta-potential, one of the most important characteristics of particles that determine the cellular uptake, can be changed by some additives and/or coatings.^[39] Therefore, it is preferable to measure uptake rate of NMs by cells before cytotoxicity measurements.^[40]

6.3.3 Inflammatory and immune response screening methods

Immunotoxicity evaluation of NMs might face different challenges from conventional pharmaceutical and chemical immunotoxicity testing. NMs could have physicochemical properties different from non-nanoscale materials. The physicochemical properties originating from this nanoscale size could then be a major consideration for immunotoxicity evaluation of NMs. The particle size and distribution in relation to the surface area have also been identified as critical parameters in assessing the environmental, health, and safety aspects of NMs. The size-specificity with regard to the toxicity of a material has already been discussed in relation to its surface area.^{[41][42]} Chemical reactions take place on surfaces; therefore, a material with a large surface area can be expected to have a higher reactivity on a mass basis than the same material with a low surface area to volume ratio. Aggregation/agglomeration might also affect particle ingestion by alveolar macrophages. The particles inhaled to the lung are usually recognized and cleared by macrophages. Some research demonstrated that macrophages recognize more easily the aggregated or agglomerated particles than individual nanoparticles and clear the aggregated or agglomerated particles at a much faster rate than individual nanoscale particles. The effects of the shape on the toxicity of NMs have not been fully investigated, yet recent publications indicated that high aspect ratio nanofibres (HARN) have been shown to have the potential to cause an asbestos-like response in animal studies.^[43] In 2007 a comprehensive issue of methods was published dedicated to the evaluation of immunotoxicity in animal models.^[44]

For skin sensitization (delayed type hypersensitivity), three *in vivo* assays are currently available being the guinea-pig maximization test (GPMT), Beuhler test (BT), and local lymph node assay (LLNA).^[45] The latter two assays depend on skin penetration of the agent to be tested before sensitization can occur. However, for NMs skin penetration is generally considered to be low or absent.^{[46]-[49]} Currently, for chemicals, *in vitro* alternative tests are under development for skin sensitization testing. Whether these are applicable to NMs is yet unknown.

Serangkaian metode yang terdefinisi dengan baik dan terstandardisasi untuk menilai imunotoksitas dilakukan oleh *Modular Immune In vitro Construct System*. Sistem ini merupakan seperangkat kultur dan pengujian *in vitro* berbasis sel manusia yang meniru sistem kekebalan tubuh manusia.

Sistem ini terdiri dari modul-modul yang disebut ekuivalen jaringan perifer (PTE), Modul Setara Jaringan Limfoid (LTE), serta pengujian fungsional dan model penyakit tambahan. PTE bekerja dengan cara yang analog dengan respons imun bawaan dan respons imun adaptif pada jaringan perifer seperti kulit, paru-paru, dan jaringan mukosa tambahan. PTE dapat memprediksi potensi bahan pembantu atau vaksin, toksisitas, dan potensi imunostimulan berbagai senyawa biologis dan kimia. Ada model khusus untuk paparan subkutan atau intramuskular, paparan intravena, dan jaringan mukosa.

Modul LTE menggunakan jenis sel dan interaksi yang relevan untuk meniru kondisi kelenjar getah bening dengan sel dendritik mengaktifkan sel-T, yang kemudian mengaktifkan sel B dan memulai proses produksi antibodi. Modul LTE mampu menghasilkan sel-T teraktivasi, antibodi, dan sitokin dan telah terbukti lebih unggul dibandingkan pengujian sel mononuklear darah tepi. Teknologi ini relevan tidak hanya untuk material nano tetapi juga untuk obat-obatan dan bahan kimia tradisional.

Meskipun lebih berorientasi pada obat-obatan dan tidak spesifik pada material nano, salah satu panduan yang diterima secara internasional dan banyak digunakan untuk studi imunotoksitas adalah pedoman tripartit yang diselaraskan oleh *International Conference on Harmonization*.^[50] Tujuannya adalah untuk menyediakan

- a) rekomendasi pendekatan uji nonklinis untuk mengidentifikasi senyawa yang berpotensi imunotoksik, dan
- b) panduan mengenai pendekatan pengambilan keputusan berdasarkan bukti untuk pengujian imunotoksitas.

Imunotoksitas, dalam panduan ini, didefinisikan sebagai penekanan atau peningkatan immunosupresi yang tidak diinginkan. Hipersensitivitas dan autoimunitas akibat obat tidak termasuk. Prinsip umum yang berlaku pada pedoman ini adalah sebagai berikut:

- a) Semua obat-obatan baru untuk manusia sebaiknya dievaluasi potensinya menghasilkan imunotoksitas.
- b) Metodenya mencakup studi toksisitas standar (STS) dan studi imunotoksitas tambahan yang dilakukan sesuai kebutuhan.

Adanya studi imunotoksitas tambahan diperlukan atau tidak, sebaiknya ditentukan melalui review bobot bukti. Data dari STS sebaiknya dievaluasi untuk mengetahui tanda-tanda potensi imunotoksik. Tanda-tanda yang perlu diperhatikan adalah sebagai berikut:

- a) perubahan hematologi (seperti leukositopenia/leukositosis, granulositopenia/granulositosis, atau limfopenia/limfositosis);
- b) perubahan berat dan/atau histologi organ sistem imun (misalnya perubahan pada timus, limpa, kelenjar getah bening, dan/atau sumsum tulang);
- c) perubahan globulin serum yang terjadi tanpa penjelasan yang masuk akal, seperti efek pada hati atau ginjal, dapat menjadi indikasi adanya perubahan imunoglobulin serum;
- d) peningkatan kejadian infeksi;
- e) peningkatan kejadian tumor dapat dilihat sebagai tanda immunosupresi tanpa adanya penyebab lain yang masuk akal seperti genotoksitas, efek hormonal, atau induksi enzim hati.

A well-defined and standardized set of methods for assessing immunotoxicity is carried out by the Modular Immune *In vitro* Construct System. This system is a proprietary set of human cell-based, *in vitro* cultures and assays that mimic the human immune system.

The system comprises modules termed the Peripheral Tissue Equivalent (PTE), the Lymphoid Tissue Equivalent Module (LTE), as well as functional assays and additional disease models. The PTE works in an analogous way as both the innate immune response and the adaptive immune response in peripheral tissues such as the skin, lungs, and additional mucosal tissues. The PTE can predict adjuvant or vaccine potency, toxicity, and the immunostimulatory potential of various biological and chemical compounds. There are models specific for the subcutaneous or intramuscular exposure, intravenous exposure, and mucosal tissue.

The LTE module uses relevant cell types and interactions to mimic conditions of the lymph nodes where dendritic cells activate T-cells, which then activate B-cells and begin the antibody-production process. The LTE module is capable of producing activated T-cells, antibodies, and cytokines and has been shown to be superior to peripheral blood mononuclear cell assays. This technology is relevant not only to NMs but to drugs and traditional chemicals, as well.

Although it is more oriented to pharmaceuticals and not specific to NMs, one internationally accepted and widely used guideline for immunotoxicity studies is the International Conference on Harmonization harmonized tripartite guideline.^[50] The purposes are to provide

- a) recommendations on nonclinical testing approaches to identify compounds which have the potential to be immunotoxic, and
- b) guidance on a weight-of-evidence decision making approach for immunotoxicity testing.

Immunotoxicity is, for the purpose of this guideline, defined as unintended immunosuppression or enhancement. Drug-induced hypersensitivity and autoimmunity are excluded. The general principles that apply to this guideline are the following:

- a) All new human pharmaceuticals should be evaluated for the potential to produce immunotoxicity.
- b) Methods include standard toxicity studies (STS) and additional immunotoxicity studies conducted as appropriate.

Whether additional immunotoxicity studies are appropriate should be determined by a weight-of-evidence review. The data from STS should be evaluated for signs of immunotoxic potential. Signs that should be taken into consideration are the following:

- a) haematological changes (such as leukocytopenia/leukocytosis, granulocytopenia/granulocytosis, or lymphopenia/lymphocytosis);
- b) alterations in immune system organ weights and/or histology (e.g. changes in thymus, spleen, lymph nodes, and/or bone marrow);
- c) changes in serum globulins that occur without a plausible explanation, such as effects on the liver or kidney, can be an indication that there are changes in serum immunoglobulins;
- d) increased incidence of infections;
- e) increased occurrence of tumours can be viewed as a sign of immunosuppression in the absence of other plausible causes such as genotoxicity, hormonal effects, or liver enzyme induction.

Ketika tersedia secara sistematis, sebagian besar partikel nano berakhir di organ sistem retikuloendotelial (*reticuloendothelial system*, RES) seperti hati dan limpa yang kaya akan sel fagosit. Protein-protein serum yang sesuai dan pembentukan sebuah korona protein dianjurkan untuk meningkatkan pengenalan dan penyerapan oleh sel-sel RES.^{[51][52][53]}

Paparan partikel kecil dapat menimbulkan respons imun dalam darah.^[54] Efek ini pada darah tidak berlaku universal untuk semua partikel kecil,^{[55][56]} kemungkinan hanya mencerminkan sifat permukaan partikel tersebut. Demikian pula, respons imun setelah paparan inhalasi terhadap material nano berkisar dari imunosupresi hingga imunostimulasi, dan sekali lagi tidak konsisten untuk semua partikel kecil, mungkin hanya mencerminkan kimia permukaan partikel tersebut.

Respons imun manusia sulit untuk dievaluasi dalam sistem model, karena lingkungan humoral dalam tubuh sulit untuk ditiru. Namun, Ryan dkk.^[57] menunjukkan bahwa fuleren menekan respons imun ketika diinkubasi dengan sel mast atau basofil darah tepi. Lebih jauh lagi, fuleren menghambat anafilaksis pada model tikus yang diberi IgE. Schöler dkk.^{[47][58]} mempelajari pelepasan sitokin dari makrofag peritoneum yang diinkubasi dengan material nano lipid padat. Meskipun partikel-partikel ini tidak mewakili partikel yang sama yang mempunyai kepentingan lingkungan, karena mereka biasanya berdiameter 200 nm dan bukan merupakan partikel kristal yang tidak dapat larut, metode ini mungkin memiliki nilai. Dalam penelitian mereka, para penulis telah memanen makrofag peritoneum dan menginkubasinya dengan material nano. Setelah 3 jam, 24 jam, dan 48 jam, kadar IL-6, IL-10, IL-12, dan TNF- α yang dilepaskan diukur dalam supernatan. Hasilnya menunjukkan bahwa Material nano lipid padat tidak menimbulkan sekresi sitokin di luar sitotoksitas. Validasi dengan Material Nano lain diperlukan untuk memahami nilai desain penelitian ini.

Mirip dengan penilaian risiko toksikologi pada sistem organ lain, penilaian imunotoksitas sebaiknya mencakup hal-hal berikut:

- signifikansi perubahan secara statistik dan biologis;
- tingkat keparahan dampaknya;
- hubungan dosis/paparan;
- faktor keamanan di atas dosis klinis yang diharapkan;
- durasi pengobatan;
- jumlah spesies dan titik akhir yang terkena dampak;
- perubahan yang mungkin terjadi secara sekunder setelah perubahan lainnya;
- kemungkinan target seluler dan/atau mekanisme aksi;
- dosis yang menyebabkan perubahan ini sehubungan dengan dosis yang menyebabkan toksisitas lainnya;
- reversibilitas efek.

When systematically available most nanoparticles end up in organs of the reticuloendothelial system (RES) like liver and spleen which are rich in phagocytizing cells. The adherence of serum proteins and the formation of a protein corona are suggested to enhance recognition and uptake by cells of the RES.^{[51][52][53]}

Exposure to small particles can elicit immune responses in the blood.^[54] These effects on blood are not universal to all small particles,^{[55][56]} probably reflecting the surface properties of the particle. Likewise, immune responses following inhalation exposure to NMs range from immunosuppression to immunostimulation, and again are not consistent for all small particles, probably reflecting the surface chemistry of the particle.

Human immune responses are difficult to evaluate in model systems, because the humoral milieu in the body is difficult to replicate. However, Ryan et al.^[57] demonstrated that fullerenes suppressed immune response when incubated with mast cells or peripheral blood basophils. Furthermore, fullerenes inhibited anaphylaxis in a mouse model primed with IgE. Schöler et al.^{[47][58]} studied the release of cytokines from peritoneal macrophages incubated with solid lipid NMs. While these particles do not represent the same particle that is of environmental interest, because they are typically 200 nm in diameter and are not insoluble, crystalline particles, the method might have value. In their study, these authors have harvested peritoneal macrophages and incubated them with the nanomaterial. After 3 h, 24 h, and 48 h, the levels of released IL-6, IL-10, IL-12, and TNF- α were measured in the supernatant. The results indicate that solid lipid NMs did not elicit secretion of cytokines outside of cytotoxicity. Validation with other NMs is necessary to understand the value of this study design.

Similar to the assessment of toxicological risk in other organ systems, the assessment of immunotoxicity should include the following:

- statistical and biological significance of the changes;
- severity of the effects;
- dose/exposure relationship;
- safety factor above the expected clinical dose;
- treatment duration;
- number of species and end points affected;
- changes that might occur secondarily to others;
- possible cellular targets and/or mechanisms of action;
- doses which produce these changes in relation to doses which produce other toxicities;
- reversibility of effect(s).

Tabel 3 — Studi imunotoksistas

Parameter	Komponen spesifik
Respons antibodi yang bergantung pada sel-T	Menggunakan antigen dependen sel-T yang dikenali [misalnya sel darah merah domba (<i>sheep red blood cells</i> , SRBC) atau <i>keyhole limpet haemocyanin</i> (KLH)] yang menghasilkan respons antibodi yang kuat.
Imunofenotip ^a	Identifikasi dan/atau enumerasi subset leukosit menggunakan antibodi dengan analisis aliran sitometri atau dengan imunohistokimia.
Uji aktivitas sel pembunuh alami (<i>natural killer</i> , NK) ^a	Dilakukan jika penelitian imunofenotip menunjukkan perubahan jumlah, atau jika penelitian STS menunjukkan peningkatan tingkat infeksi virus, atau sebagai respons terhadap faktor lain.
Studi resistensi induk (<i>host</i>)	Libatkan kelompok tikus atau mencit yang diberi tantangan dengan dosis senyawa uji berbeda dengan konsentrasi patogen (bakteri, jamur, virus, dan parasit) atau sel tumor yang berbeda-beda.
Uji fungsi makrofag dan neutrofil	Menilai fungsi makrofag/neutrofil sel yang terpapar senyawa uji secara <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> , atau diperoleh dari hewan yang diberi senyawa uji (uji <i>ex vivo</i>).
^a dapat digunakan sebagai uji toksisitas baku.	

6.3.4 Metode skrining respons stres (termasuk oksidatif dan produksi protein).

6.3.4.1 Aspek umum

Peran stres oksidatif dalam toksisitas material nano ambien dan cara yang terlibat dalam respons stres oksidatif seluler telah ditinjau sebelumnya.^{[36][59][60]} Spesies Reaktif pada Oksigen (ROS) terjadi pada sel sebagai produk samping dari aktivitas seluler normal yang dapat dinetralkan oleh pertahanan antioksidan sel. Stres oksidatif terjadi jika produksi ROS melebihi kapasitas penetralan pertahanan antioksidan seluler. Respons seluler selama stres oksidatif mencakup induksi sejumlah kaskade pensinyalan sensitif redoks menurut model tiga tingkat yang diusulkan berikut ini.^[59] Pada tingkat stres oksidatif yang rendah, respons pelindung tingkat 1 menginduksi enzim antioksidan seperti isoenzim glutathion S-transferase untuk memulihkan homeostasis redoks. Peningkatan lebih lanjut dalam produksi ROS atau kegagalan respons antioksidan awal dapat menyebabkan proinflamasi (tingkat 2) dan akhirnya dalam efek sitotoksik (tingkat 3). Induksi stres oksidatif dan peradangan yang dihasilkan dianggap sebagai mekanisme yang masuk akal bahwa material nano dapat menginduksi toksisitas, mirip dengan partikel halus dan sangat halus.^{[59][60]} material nano dapat menginduksi stres oksidatif melalui sejumlah cara. Misalnya, pembentukan radikal O₂⁻ dan OH• dapat dihasilkan dari pembentukan pasangan lubang elektron melalui fotoaktivasi TiO₂ atau dari lompatan elektron dari pita konduksi material nano semikonduktor.^[61] Selain itu, pembubaran material nano melepaskan ion logam dan adanya logam transisi seperti Fe, Ni, Cu, Co, dan Cr pada permukaan material nano dapat menghasilkan OH• melalui reaksi Fenton. Akhirnya, material nano yang lembam pun dapat meningkatkan produksi ROS dengan berdiam di mitokondria dan mengganggu fungsinya.^[59]

Table 3 — Immunotoxicity studies

Parameter	Specific component
T-cell dependent antibody response	Using a recognized T-cell dependent antigen [e.g. sheep red blood cells (SRBC) or keyhole limpet haemocyanin (KLH)] that results in a robust antibody response.
Immunophenotyping ^a	Identification and/or enumeration of leukocyte subsets using antibodies with flow cytometric analysis or by immunohistochemistry.
Natural killer (NK) cell activity assays ^a	Conducted if immunophenotyping studies demonstrate a change in number, or if STS studies demonstrate increased viral infection rates, or in response to other factors.
Host resistance studies	Involve challenging groups of mice or rats treated with the different doses of test compound with varying concentrations of a pathogen (bacterial, fungal, viral and parasitic) or tumour cells.
Macrophage and neutrophil function assays	Assessing macrophage/neutrophil function of cells exposed to the test compound <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> , or obtained from animals treated with the test compound (<i>ex vivo</i> assay).
^a Could be used as standard toxicity tests.	

6.3.4 Stress response (including oxidative and protein production) screening methods

6.3.4.1 General aspects

The role of oxidative stress in the toxicity of ambient NMs and the pathways involved in a cellular oxidative stress response have been reviewed previously.^{[36][59][60]} Reactive Oxygen Species (ROS) are generated by cells as by-products of normal cellular activity that can be neutralized by cellular antioxidant defenses. Oxidative stress occurs if the production of ROS exceeds the neutralizing capacity of the cellular antioxidant defence. The cellular response during oxidative stress includes the induction of a number of redox-sensitive signalling cascades according to the following proposed three tiered model.^[59] At low levels of oxidative stress, the tier 1 protective response induces antioxidant enzymes such as glutathione S-transferase isoenzymes to restore redox homeostasis. A further increase in ROS production or a failure of the initial antioxidant response can result in proinflammatory (tier 2) and eventually in cytotoxic (tier 3) effects. The induction of oxidative stress and resulting inflammation is thought to be a plausible mechanism by which NMs might induce toxicity, similar to fine and ultrafine particulate matter.^{[59][60]} NMs could induce oxidative stress via a number of pathways. For example, generation of $O_2^{\cdot-}$ and OH^{\cdot} radicals could result from the formation of electron hole pairs by photoactivation of TiO_2 or from an electron jumping from the conduction band of semiconductor NMs.^[61] In addition, dissolution of NMs releasing metal ions and the presence of transition metals such as Fe, Ni, Cu, Co, and Cr on the nanomaterial surface can generate OH^{\cdot} via the Fenton reaction. Finally, even inert NMs could give rise to ROS production by lodging in mitochondria and perturbing their function.^[59]

Oleh karena itu, banyak penelitian *in vitro* dengan material nano berfokus pada uji yang mengukur penanda stres oksidatif dan peradangan.

6.3.4.2 Aktivitas redoks aseluler partikel nano

Aktivitas redoks aseluler partikel nano dapat dievaluasi menggunakan uji ditionitritol (DTT). Uji DTT menentukan aktivitas umum redoks sampel dengan mengukur stimulus (misalnya partikel nano) yang bergantung pada oksidasi DTT, suatu ditiol. Pengujian mengukur pembentukan ROS dengan jumlah DTT yang diketahui. Selama reaksi ini, DTT dikonsumsi, diikuti dengan reaksinya dengan asam 5,5'-ditiobis-(2-) nitrobenzoat (DTNB) untuk membentuk asam 2-nitro-5-merkaptobenzoat, yang dapat diukur dengan spektrofotometer. Partikel nano dapat diinkubasi dalam berbagai periode waktu, setelah itu reaksi diakhiri dengan menambahkan larutan asam trikloroasetat. Aliquot kemudian diinkubasi dengan *buffer* tris-HCl (pH 8,9) yang mengandung DTNB dan absorbansinya dapat dibaca pada 412 nm pada spektrofotometer.

Metode yang lebih canggih melibatkan penggunaan spektroskopi Resonansi Spin Elektron (ESR) yang dikombinasikan dengan teknik *spin trapping*,^{[63][64]} yang menawarkan keuntungan bahwa ROS dan spesies radikal bebas serupa yang dihasilkan oleh partikel nano dapat diidentifikasi. Untuk deteksi pembentukan ROS, prinsipnya didasarkan pada penangkapan radikal dengan 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksida (DPMO). Spektra ESR direkam setelah inkubasi partikel nano dengan DPMO dengan ada atau tidak adanya H₂O₂. Identifikasi dan kuantifikasi karakteristik sinyal ROS yang terperangkap DPMO dapat dilakukan dengan integrasi yang disebut pengukuran permukaan puncak. Data yang dihasilkan adalah identifikasi jenis radikal dan ROS yang dihasilkan oleh partikel nano dan kuantifikasi berdasarkan permukaan puncak, misalnya DPMO-OH• dalam satuan sembarang.

6.3.4.3 Pembentukan ROS dalam sel

6.3.4.3.1 Umum

ROS dapat dihasilkan oleh sel sebagai produk samping dari aktivitas seluler normal, tetapi peningkatan ROS sebagai respons terhadap faktor stres dapat melebihi kapasitas antioksidan dan dapat mengakibatkan kerusakan sel. Namun, tidak semua kultur sel menghasilkan ROS setelah terpapar partikel nano.

Untuk induksi stres oksidatif dalam sel, dua uji yang paling umum digunakan dalam penelitian toksikologi nano adalah pengukuran pembentukan ROS intraseluler dan glutathione tereduksi (*glutathione*, GSH). ROS diukur dengan uji fluorometrik berdasarkan oksidasi intraseluler 2,7-dikloroflorosen diasetat, sedangkan glutathione (GSH) sebagian besar diukur dengan uji berdasarkan produksi fluoresen atau zat warna pada reaksi dengan GSH. Hasil uji ROS dan GSH berkorelasi sangat baik.^{[65][66][67][68]}

Many *in vitro* studies with NMs have therefore focused on assays measuring markers of oxidative stress and inflammation.

6.3.4.2 Acellular redox activity of nanoparticles

The acellular redox activity of nanoparticles can be evaluated using the dithiothreitol (DTT) assay.^[62] The DTT assay determines the general redox activity of a sample by measuring the stimulus (e.g. nanoparticles) dependent oxidation of DTT, a dithiol. The assay measures the formation of ROS by a known amount of DTT. During this reaction, DTT is consumed, followed by its reaction with 5,5'-dithiobis-(2-) nitrobenzoic acid (DTNB) to form 2-nitro-5-mercaptobenzoic acid, which can be measured by a spectrophotometer. Nanoparticles can be incubated for various time periods, after which the reaction is terminated by adding trichloroacetic acid solution. Aliquots are then incubated with a tris-HCl buffer (pH 8,9) containing DTNB and the absorbance can be read at 412 nm on a spectrophotometer.

A more sophisticated method involves using Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy in combination with the spin trapping technique,^{[63][64]} which offers the advantage that ROS and similar kinds of free radical species generated by the nanoparticles can be identified. For detection of ROS formation, the principle is based on the trapping of radicals with 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DPMO). ESR spectra are recorded after incubation of the nanoparticles with DPMO in the presence or absence of H₂O₂. The identification and quantification of characteristic DPMO-trapped ROS signals can be performed by integration of so-called peak surface measurements. The resulting data are an identification of type of radical and ROS generated by the nanoparticles and a quantification based on peak surfaces of, for example, the DPMO-OH[•] in arbitrary units.

6.3.4.3 Generation of ROS in cells

6.3.4.3.1 General

ROS can be generated by cells as by-products of normal cellular activity, but an increase in ROS in response to stress factors might exceed the antioxidant capacity and could result in cell damage. However, not all cell lines produce ROS after exposure to nanoparticles.

For induction of oxidative stress in cells, the two most commonly used assays in nanotoxicology research are measurement of intracellular ROS generation and reduced glutathione (GSH). ROS is measured by means of a fluorometric assay based on intracellular oxidation of 2,7-dichlorofluorescein diacetate, while glutathione (GSH) is mostly measured with assays based on the production of a fluorescent or coloured dye upon reaction with GSH. The results of ROS and GSH assays correlated remarkably well.^{[65][66][67][68]}

6.3.4.3.2 Penentuan ROS

Nonfluoresen 2',7'-diklorodihidrofloresen diasetat (H₂DCF-DA) dapat digunakan untuk mengukur pembentukan ROS. Saat memasuki sel, gugus asetat terbelah, dan senyawa H₂DCF yang tersisa tetap berada di dalam sel yang dapat dioksidasi oleh ROS menjadi senyawa fluoresen DCF. Setelah inkubasi sel dengan partikel nano, media kultur jaringan dihilangkan dan kultur dicuci. Sel diinkubasi dengan probe H₂DCF-DA 10 mM yang baru disiapkan dalam PBS selama 45 menit pada kondisi kultur jaringan yang sesuai, sambil terlindung dari cahaya. Setelah inkubasi, probe yang tidak diambil oleh sel dihilangkan dengan mencuci sel dengan PBS hangat. Aliquot terakhir 100 µl PBS ditambahkan ke sel dalam sumbu kultur jaringan dan fluoresensi dapat diukur pada panjang gelombang eksitasi 485 nm dan panjang gelombang emisi 520 nm menggunakan spektrofotometer fluoresensi. Sel yang terpapar kendaraan berfungsi sebagai kontrol negatif atau pelarut. Untuk kontrol positif, sel-sel seperti makrofag, dapat dipaparkan ke media kultur sel yang mengandung 10 mg/ml lipopolisakarida (LPS) dan/atau *phorbol myristate acetate* (PMA) 10 mg/ml, jika diperlukan diferensiasi. Kontrol partikel nano saja sebaiknya dimasukkan dalam pengujian untuk mengecualikan interferensi partikel nano yang sedang diselidiki dengan sistem pembacaan fluoresen. Jika interferensi tersebut terdeteksi, hasil positif palsu mungkin dihasilkan.

6.3.4.3.3 Pengukuran GSH

Diduga bahwa hilangnya GSH membahayakan pertahanan antioksidan, sehingga menghasilkan peningkatan ROS dalam sel dan akhirnya kematian sel.^[66] Glutathion ada dalam keadaan tereduksi (GSH) dan teroksidasi (GSSG). Dalam keadaan tereduksi, gugus tiol dari sistein mampu menyumbangkan ekuivalen pereduksi ke molekul tidak stabil lainnya, seperti ROS. Dalam menyumbangkan elektron, glutathion sendiri menjadi reaktif, tetapi mudah bereaksi dengan glutathion reaktif lainnya untuk membentuk glutathion disulfid (GSSG). Melalui mekanisme ini, GSH berperan sebagai antioksidan dan dapat melindungi sel dari kerusakan oleh spesies oksigen radikal. Rasio GSSG-ke-GSH yang meningkat dianggap sebagai indikasi stres oksidatif. Tingkat GSH dalam sel dapat ditentukan dengan menggunakan kit yang tersedia secara komersial. Penentuan kandungan GSH dalam lisat sel dapat didasarkan pada zat kimia yang secara spesifik berikatan dengan GSH, setelah itu reaksi kedua mengubah kompleks menjadi senyawa kromoforik yang dapat diukur dalam spektrofotometer. Juga, kit antibodi tersedia yang menggunakan antibodi anti-GSH spesifik dalam apa yang disebut *Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay* (ELISA) untuk pengukuran kadar GSH. Dalam kit untuk setiap jenis pengujian, sampel disertakan untuk menyiapkan kurva standar. Sekali lagi, interferensi oleh partikel nano yang diuji dengan absorbansi produk reaksi akhir sebaiknya diperiksa.

6.3.5 Metode skrining komponen darah (termasuk faktor pembekuan, hemolisis).

6.3.5.1 Umum

Studi tentang interaksi partikel dengan komponen darah terbagi dalam tiga kategori umum.

- a) yang berfokus pada efek pada sistem kardiovaskular dan darah sebagai target;
- b) yang melihat cara darah dan protein darah berinteraksi dengan objek nano;
- c) salah satu yang menggunakan efek pada darah sebagai indikator sifat biologis.

Masing-masing akan dibahas.

6.3.4.3.2 ROS determination

Nonfluorescent 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA) can be used to measure the generation of ROS. Upon entering the cell, the acetate groups are cleaved off, and the remaining compound H2DCF remains inside the cell where it can be oxidized by ROS to the fluorescent compound DCF. After incubation of cells with nanoparticles, the tissue culture medium is removed and the culture is washed. Cells are incubated with freshly prepared 10 mM H2DCF-DA probe in PBS for 45 min at appropriate tissue culture conditions, while protected from light. After incubation, the probe that is not taken up by the cells is removed by washing the cells with warm PBS. A final aliquot of 100 μ l of PBS is added to cells in the tissue culture well and fluorescence can be measured at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm using a fluorescence spectrophotometer. Cells exposed to the vehicle serve as negative or solvent control. For a positive control, cells such as macrophages, can be exposed to cell culture medium containing 10 mg/ml lipopolysaccharide (LPS) and/or 10 mg/mL phorbol myristate acetate (PMA), if differentiation is required. A nanoparticle only control should be included in the assay to exclude interference of the nanoparticles under investigation with the fluorescent read out system. If such interference is detected, false-positive results might be produced.

6.3.4.3.3 GSH measurement

It is suggested that loss of GSH compromises antioxidant defenses, thus resulting in an increase in ROS in the cell and eventually cell death.^[66] Glutathione exists in both reduced (GSH) and oxidized (GSSG) states. In the reduced state, the thiol group of cysteine is able to donate a reducing equivalent to other unstable molecules, such as ROS. In donating an electron, glutathione itself becomes reactive, but readily reacts with another reactive glutathione to form glutathione disulfide (GSSG). Through this mechanism, GSH acts as antioxidant and can protect cells against damage by radical oxygen species. An increased GSSG-to-GSH ratio is considered indicative of oxidative stress. GSH levels in cells can be determined using commercially available kits. The determination of the GSH content in cell lysates can be based on a chemical agent that specifically binds to GSH, after which a second reaction transforms the complex to a chromophoric compound that can be measured in a spectrophotometer. Also, antibody kits are available that use a specific anti-GSH antibody in a so called Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA) for the measurement of GSH levels. In kits for each type of assay, samples are included for preparing standard curves. Once again, interference by the tested nanoparticles with the absorbance of the final reaction product should be checked.

6.3.5 Blood components (including clotting factors, haemolysis) screening methods

6.3.5.1 General

Studies of the interaction of particles with blood components fall into three general categories.

- a) one that focuses on effects on the cardiovascular system and blood as a target;
- b) one that looks at how blood and blood proteins interact with nano-objects;
- c) one that uses effects on blood as an indicator of a biological property.

Each of these will be discussed.

6.3.5.2 Efek pada sistem kardiovaskular atau darah

Diketahui bahwa paparan inhalasi partikel kecil dapat memengaruhi sistem kardiovaskular, peningkatan risiko serangan jantung telah diamati setelah paparan partikel ambien^[69] termasuk knalpot diesel. Selain itu, paparan partikel ultrahalus seperti abu vulkanik^[70] dapat memengaruhi hemolisis dan pembekuan darah.^[71] Bagian berikut merangkum studi skrining yang berfokus pada darah atau sistem kardiovaskular sebagai target. Helfenstein dkk.^[72] mengevaluasi efek material nano langsung pada otot jantung, *in vitro*. Dalam studi mereka, miosit ventrikel tikus neonatal diinkubasi dengan berbagai konsentrasi tabung nano karbon dinding tunggal, partikel emisi diesel, atau TiO₂ dan kecepatan konduksi serta produksi ROS diukur. Sementara hasilnya menunjukkan efek yang berbeda pada fungsi sel jantung dari produksi ROS, para penyelidik tidak pernah memastikan keadaan fisik partikel mereka dalam media biakan. Karbon tabung nano diketahui menyerap nutrisi dari media kultur, dan protein serum dapat mengubah toksisitas. Oleh karena itu, desain penelitian ini memerlukan sejumlah uji kontrol yang sesuai (misalnya terjadinya interferensi, penipisan protein), dan validasi ekstensif.

Li dan rekan kerja^[73] mempelajari efek partikel nano langsung pada eritrosit; sedimentasi eritrosit, dan morfologi diubah oleh TiO₂ berskala nano relatif terhadap material berskala mikron. Selanjutnya, hemolisis dan produksi ROS lebih luas dengan material berskala nano relatif terhadap material berskala mikron. Evaluasi dengan partikel yang berbeda akan diperlukan untuk memastikan nilai prediktif dari pengujian ini.

6.3.5.3 Interaksi dengan darah yang mengubah respons biologis

Telah dikenal bahwa darah, khususnya protein, dapat berinteraksi dengan material nano dengan melapisi permukaan dan membentuk korona.^[74] Dalam beberapa kasus, material nano yang dilapisi protein telah mengubah toksisitas, umumnya menghasilkan toksisitas yang lebih rendah dibandingkan dengan partikel 'telanjang'; misalnya, protein korona telah disarankan untuk memfasilitasi dan mengurangi penyerapan seluler,^{[51]-[53]} dan perubahan aktivitas biologis.^[75] Meskipun interaksi ini mungkin penting untuk memahami efek partikel pada sistem biologis, belum mungkin memprediksi efek biologis dari interaksi tersebut. Oleh karena itu, fenomena tersebut tidak akan dibahas lebih lanjut.

6.3.5.4 Interaksi dengan darah sebagai indikator sifat toksik

Interaksi material nano dengan darah telah digunakan untuk memprediksi sifat biologis, khususnya reaktivitas permukaan. Studi-studi ini akan disajikan dan dirangkum. Secara umum, pengujian semacam itu mengalami kekurangan validasi.

Darah, khususnya hemolisis, telah digunakan sebagai indikator reaktivitas permukaan. Warheit dkk.^[76] menggunakan hemolisis sebagai indikator reaktivitas permukaan dan berkorelasi dengan respons paru setelah paparan *in vivo*. Dalam studi mereka, penulis telah menginkubasi kuarsa berukuran nano atau mikron dengan eritrosit dari darah segar manusia utuh dan mengukur hemolisis secara spektrofotometri. Selain itu, hewan yang terpapar dengan instilasi IT pada bahan yang sama ini dan toksisitas paru dievaluasi menggunakan histopatologi dan bilasan bronko-alveolar. Luasnya hemolisis berkorelasi lebih baik dengan inflamasi paru dan histopatologi paru daripada karakteristik fisik seperti ukuran, kristalinitas, luas permukaan, atau pembentukan radikal yang diukur dengan ESR.

6.3.5.2 Effects on cardiovascular system or blood

It is known that inhalation exposure to small particles can affect the cardiovascular system, an increased risk of heart attack has been observed following exposure to ambient particles^[69] including diesel exhaust. In addition, exposure to ultrafine particles such as volcanic ash^[70] can affect haemolysis and blood clotting.^[71] The following section summarizes screening studies that focused on either blood or the cardiovascular system as the target. Helfenstein et al.^[72] evaluated the effect of NMs directly on cardiac muscle, *in vitro*. In their study, neonatal rat ventricular myocytes were incubated with varying concentrations of single-wall carbon nanotubes, diesel emission particles, or TiO₂ and conduction velocity and ROS production were measured. While the results suggest differing effects on heart cell function of ROS production, the investigators never confirmed the physical state of their particles in the culture medium. Carbon nanotubes are known to adsorb nutrients from culture medium, and serum proteins can alter toxicity. Therefore, this study design requires a number of appropriate assay controls (e.g. occurrence of interference, protein depletion), and extensive validation.

Li and coworkers^[73] studied the effects of nanoparticles directly on the erythrocyte; erythrocyte sedimentation, and morphology were altered by nanoscale TiO₂ relative to micron-scale material. Further, haemolysis and ROS production were more extensive with nanoscale material relative to micron-scale material. Evaluation with different particles will be necessary to ascertain the predictive value of this test.

6.3.5.3 Interaction with blood that modifies biological response

It has been recognized that blood, specifically proteins, can interact with NMs by coating the surface and forming a corona.^[74] In some cases, protein-coated NMs have altered toxicity, generally resulting in lower toxicity compared with the 'naked' particle; for example, The protein corona has been suggested to both facilitate and reduce cellular uptake,^{[51]-[53]} and alteration in biological activity.^[75] While these interactions could be important for understanding the effects of particles on biological systems, it is not yet possible to predict the biological effect from that interaction. Therefore, these phenomena will not be discussed further.

6.3.5.4 Interaction with blood as indicator of toxic property

Interactions of NMs with blood have been used to predict biological properties, specifically surface reactivity. These studies will be presented and summarized. In general, such assays suffer from a lack of validation.

Blood, particularly haemolysis, has been used as an indicator of surface reactivity. Warheit et al.^[76] used haemolysis as an indicator of surface reactivity and correlated that with pulmonary responses following *in vivo* exposure. In their study, the authors have incubated nano-sized or micron-sized quartz with erythrocytes from fresh whole human blood and measured haemolysis spectrophotometrically. In addition, animals were exposed by IT instillation to these same materials and the pulmonary toxicity evaluated using histopathology and broncho-alveolar lavage. The extent of haemolysis was correlated better with lung inflammation and lung histopathology than did physical characteristics such as size, crystallinity, surface area, or radical formation as measured by ESR.

Aisaka dkk.^[77] juga mengkorelasikan tingkat hemolisis dengan toksisitas paru, tetapi tidak dalam percobaan yang sama. Dengan menggunakan eritrosit dari darah segar manusia, hemolisis anatase dan rutil TiO₂ berukuran nano dan mikron dibandingkan dengan efek paru seperti yang dilaporkan oleh Sayes dkk.^[29] Namun, karakterisasi partikel yang digunakan oleh Sayes dkk. tidak memadai untuk memungkinkan perbandingan langsung dengan partikel yang digunakan oleh Aisaka dkk.^[77]

Li dkk.^[73] telah melaporkan aktivitas hemolitik partikel nano titanium dioksida. Lin dan Haynes^[78] juga menggunakan hemolisis sebagai indikator sitotoksitas. Eritrosit dicuci dan diinkubasi dengan partikel nano silika berpori dan tidak berpori. Peningkatan hemolisis yang bergantung pada konsentrasi diamati, dan hemolisis berkorelasi dengan luas permukaan. Kurva respons sangat curam untuk silika berpori, tetapi tidak untuk partikel yang tidak berpori. Tidak ada upaya untuk mengorelasikan aktivitas hemolitik dengan pengujian lain untuk sitotoksitas.

Menggunakan prinsip yang sama, Rogers dkk.^[79] memodifikasi uji 'kemampuan pengurangan besi plasma' (*Ferric reducing ability of plasma*, FRAP) dengan menggunakan serum (FRAS) daripada plasma. Serum diinkubasi dengan berbagai konsentrasi material nano yang berbeda dan tingkat stres oksidatif diukur. Mengonversi data mentah ke unit setara Trolox, material nano yang berbeda dapat diberi peringkat berdasarkan kemampuannya untuk mengurangi kapasitas anti-oksidan serum. Hasilnya umumnya seperti yang diharapkan – karbon hitam ukuran nano mengurangi kapasitas anti-oksidan lebih dari karbon hitam 220 nm; jelaga fuleren mengurangi kapasitas anti-oksidan lebih dari fuleren olahan; dan anatase TiO₂ mengurangi kapasitas lebih dari yang dilakukan rutil.

6.3.6 Metode skrining genotoksitas

Pengujian material nano untuk genotoksitas *in vitro* sebagai prediktor potensi karsinogenik atau bahaya perkembangan adalah subjek perdebatan besar di antara ahli toksikologi, dan ada banyak ulasan menyeluruh tentang subjek tersebut.^{[80][81][82][83][83][84]} Masalah utamanya adalah

- 1) kesesuaian uji genotoksitas *in vitro* awalnya dikembangkan untuk pengujian molekul kecil,
- 2) relevansi mekanistik titik akhir *genotoksitas in vitro* dengan karsinogenesis material nano,
- 3) kurangnya ketersediaan kontrol positif material nano untuk evaluasi kinerja pengujian, sensitivitas dan perbandingan potensi, dan
- 4) relevansi konsentrasi *in vitro* dengan skenario paparan *in vivo*.

Rangkaian uji *in vitro* saat ini, banyak di antaranya tersedia dalam format standar, termasuk uji elektroforesis gel sel tunggal (uji komet),^[85] uji mutasi balik bakteri (uji Ames),^[86] uji aberasi kromosom mamalia dalam sel ovarium hamster Cina,^[87] uji mutasi maju HPRT,^[88] uji mikronukleus (MNvit),^[89] uji sintesis DNA tak terjadwal pada sel mamalia *in vitro*,^[90] dan uji transformasi sel embrio hamster Suriah *in vitro*.^[83]

Aisaka et al.^[77] also correlated the extent of haemolysis to pulmonary toxicity, but not in the same experiment. Using erythrocytes from fresh human blood, the haemolysis of anatase and rutile nano-sized and micron-sized TiO₂ was compared with the pulmonary effects as reported by Sayes et al.^[29] However, the characterization of the particles used by Sayes et al. was not adequate to allow direct comparisons to the particles used by Aisaka et al.^[77]

Li et al.^[73] have reported the haemolytic activity of titanium dioxide nanoparticles. Lin and Haynes^[78] also used haemolysis as an indicator of cytotoxicity. Erythrocytes were washed and incubated with porous and non-porous silica nanoparticles. Concentration-dependent increases in haemolysis were observed, and haemolysis was correlated with surface area. The response curves were very steep for porous silica, but not for the non-porous particle. There was no attempt to correlate haemolytic activity with other assays for cytotoxicity.

Using the same principle, Rogers et al.^[79] modified the 'Ferric reducing ability of plasma' assay (FRAP) by using serum (FRAS) rather than plasma. Serum was incubated with varying concentrations of different NMs and the degree of oxidative stress was measured. Converting the raw data to Trolox equivalent units, the different NMs could be ranked for their ability to reduce the anti-oxidant capacity of serum. The results are generally what one might expect – nano-sized carbon black reduced anti-oxidant capacity more than the 220 nm carbon black did; fullerene soot reduced anti-oxidant capacity more than refined fullerenes; and anatase TiO₂ reduced capacity more than the rutile did.

6.3.6 Genotoxicity screening methods

The testing of NMs for genotoxicity *in vitro* as a predictor of potential carcinogenic or developmental hazard is a subject of great debate among toxicologists, and there have been many thorough reviews on the subject.^{[80][81][82][83][84]} The primary issues are

- 1) the suitability of *in vitro* genotoxicity assays originally developed for testing of small molecules,
- 2) mechanistic relevance of *in vitro* genotoxicity end points to nanomaterial carcinogenesis,
- 3) the lack of availability of nanomaterial positive controls for evaluation of assay performance, sensitivity and potency comparison, and
- 4) the relevance of *in vitro* concentrations to *in vivo* exposure scenarios.

The current battery of *in vitro* assays, many of which are available in standardized formats, include single cell gel electrophoresis assay (comet assay),^[85] the bacterial reverse mutation test (Ames assay),^[86] mammalian chromosome aberration test in Chinese hamster ovary cells,^[87] the HPRT forward mutation assay,^[88] micronucleus test (MNvit),^[89] unscheduled DNA synthesis test in mammalian cell *in vitro*,^[90] and *in vitro* Syrian hamster embryo cell transformation assay.^[83]

Survei literatur pengujian genotoksisitas material nano telah mengidentifikasi beberapa tren umum.^{[81][82]} Misalnya, sebagian besar uji mutasi gen bakteri material nano, misalnya uji Ames, hasilnya negatif, mungkin karena kurangnya penetrasi material nano dari dinding sel bakteri.^{[81][82]} Sebaliknya, sebagian besar uji komet untuk kerusakan DNA dan uji mutasi gen mamalia telah positif, tetapi ini mungkin juga terdistorsi oleh bias pelaporan untuk hasil positif.^[82] Karena genotoksisitas terutama didasarkan pada efek DNA langsung (walaupun efek tidak langsung melalui ROS dapat terjadi) untuk uji genotoksisitas apa pun, paparan seluler internal sebaiknya ditunjukkan. Partikel positif dalam pengujian komet meliputi material nano berbasis karbon, seperti fuleren dan karbon tabung nano, serta partikel nano logam, seperti kobalt dan TiO₂.^[82] Di dalam kelas material nano, misalnya material kimia dengan karakteristik fisikokimia umum dan/atau komposisi kimia, dan kelas uji genotoksisitas, misalnya penyimpangan kromosom dan mutasi gen, ada kekurangan temuan yang konsisten.^[81] Selain itu, inkonsistensi dalam desain pengujian dan karakterisasi dan identifikasi fisikokimia material nano telah menjadi masalah umum ketika mencoba untuk membandingkan studi dan menarik kesimpulan mengenai sifat genotoksik material nano spesifik dan kinerja pengujian individu^[81] dan, seperti semua studi, menunjukkan pentingnya mengembangkan protokol terstandarisasi.

Masalah lain yang perlu dipertimbangkan adalah bagaimana uji genotoksisitas terstandarisasi mungkin perlu dimodifikasi untuk mengakomodasi evaluasi material nano. Seperti dijelaskan di atas, sistem sel mamalia bisa lebih cocok daripada galur bakteri, karena perbedaan serapan sel material nano.^[83] Uji mikronukleus *in vitro* standar umumnya menggunakan media yang mengandung serum dan penghambat polimerisasi aktin (actin polymerization) *cytochalasin-B*, dan kedua komponen ini juga dapat mengganggu penyerapan sel material nano.^{[83][88]} Ini bisa memerlukan perubahan konsentrasi serum atau penambahan *cytochalasin-B* setelah perawatan material nano. Selain itu, masalah besarnya konsentrasi *in vitro* terkait dengan paparan *in vivo* sangat bermasalah untuk material nano, karena tidak hanya konsentrasi material nano yang menjadi masalah penting, tetapi juga keadaan material nano (misalnya keadaan agregasi/aglomerasi, protein yang terikat ke permukaan, dan lain-lain), karena hal ini dapat memengaruhi paparan sel dan aktivitas biologis. Dengan demikian, penting untuk mengarakterisasi material nano dalam media perawatan dan menghubungkan sifat fisikokimia ini dengan paparan material nano yang sebenarnya.

Pada akhirnya, pengujian genotoksisitas *in vitro* dari material nano hanya berguna jika titik akhir mekanistik berhubungan dengan mekanisme karsinogenesis manusia atau bahaya reproduksi. Pada saat ini, pemahaman yang berlaku tentang karsinogenesis paru yang diinduksi material nano adalah bahwa mekanisme yang mendasarinya tidak melibatkan interaksi material nano langsung dengan genom, melainkan terjadi melalui mekanisme sekunder atau tidak langsung, misalnya peradangan dan stres oksidatif.^{[90][91]} Sementara mekanisme oksidatif berpotensi dievaluasi dalam sistem *in vitro* jika stres oksidatif bukan akibat inflamasi sekunder, mekanisme inflamasi tidak langsung tidak dapat dievaluasi. Dengan demikian, literatur karsinogenesis paru material nano tidak memberikan alasan mekanistik yang kuat untuk menggunakan uji genotoksisitas *in vitro* saat ini. Alasan mekanistik ini dapat berasal dari studi karsinogenesis material nano di masa depan, terutama pada organ alternatif yang mengikuti rute pemaparan alternatif. Baterai prediktif uji genotoksisitas perlu dikembangkan, distandardisasi, dan divalidasi untuk relevansinya dengan kesehatan manusia. Metode yang paling tepat mungkin mencakup metode yang sudah diterima OECD atau, jika perlu, metode yang diubah untuk menangani material nano secara lebih spesifik.

Surveys of the nanomaterial genotoxicity testing literature have identified some common trends.^{[81][82]} For instance, the majority of nanomaterial bacterial gene mutation assays, e.g. Ames assay, results have been negative, possibly due to a lack of nanomaterial penetration of the bacterial cell wall.^{[81][82]} By contrast, the majority of comet assays for DNA damage and mammalian gene mutation assays have been positive, but this might also be skewed by a reporting bias for positive results.^[82] As genotoxicity is primarily based on direct DNA effects (although indirect effects via ROS can occur) for any genotoxicity assay internal cellular exposure should be demonstrated. Particles positive in the comet assay include carbon-based NMs, such as fullerene and carbon nanotube, as well as metal nanoparticles, such as cobalt and TiO₂.^[82] Within NMs classes, e.g. NMs with common physicochemical characteristics and/or chemical composition, and genotoxicity assay classes, e.g. chromosome aberration and gene mutation, there has been a lack of consistent findings.^[81] Furthermore, inconsistencies in assay design and nanomaterial physicochemical characterization and identification have been a common problem when attempting to compare studies and draw conclusions regarding the genotoxic nature of specific NMs and the performance of individual assays^[81] and, as with all studies, show the importance of developing standardized protocols.

Another issue to consider is how standardized genotoxicity assays might need to be modified in order to accommodate evaluation of NMs. As described above, mammalian cell systems could be more suitable than bacterial strains, due to differences in nanomaterial cell uptake.^[83] The standard *in vitro* micronucleus assay commonly utilizes media containing serum and the actin polymerization inhibitor cytochalasin-B, and both these components can also interfere with cell uptake of NMs.^{[83][88]} This could require alteration of the serum concentration or addition of cytochalasin-B following nanomaterial treatment. Additionally, the issue of how *in vitro* concentration relates to *in vivo* exposure is especially problematic for NMs, as not only is the nanomaterial concentration an important issue, but also the nanomaterial state (e.g. aggregation/agglomeration state, proteins bound to the surface, etc.), as this can affect both cell exposure and biological activity. Thus, it is important to characterize the nanomaterial in the treatment media and relate these physicochemical properties to those following actual nanomaterial exposure.

Ultimately, *in vitro* genotoxicity testing of NMs is only useful if the mechanistic end points relate to human mechanisms of carcinogenesis or reproductive hazard. At this time, the prevailing understanding of nanomaterial-induced pulmonary carcinogenesis is that underlying mechanisms do not involve direct nanomaterial interaction with the genome, but rather occur through secondary or indirect mechanisms, e.g. inflammation and oxidative stress.^{[90][91]} While an oxidative mechanism could potentially be evaluated in an *in vitro* system if the oxidative stress is not secondary to inflammation, an indirect inflammatory mechanism cannot be evaluated. Thus, the nanomaterial pulmonary carcinogenesis literature does not provide a strong mechanistic rationale for employing *in vitro* genotoxicity assays at this time. This mechanistic rationale could come from future studies of nanomaterial carcinogenesis, especially in alternate organs following alternate routes of exposure. Predictive batteries of genotoxicity assays need to be developed, standardized, and validated for their relevance to human health. The most appropriate methods might include those that are already OECD-accepted or, if necessary, those that are altered to more specifically address NMs.

6.3.7 Pengujian penghalang *in vitro* dan sistem pengujian yang sesuai untuk menilai toksisitas terhadap penghalang biologis

6.3.7.1 Umum

Efek buruk dari material nano pada kesehatan manusia mungkin terkait dengan kemampuan mereka untuk melewati penghalang biologis dalam tubuh. Rute pemaparan (paru, gastro-intestinal, dermal) dan, karenanya, pintu masuk partikel nano ke dalam tubuh, sangat penting. Penghalang yang diidentifikasi di bawah ini adalah dua hal yang dianggap penting bagi material nano saat ini.

6.3.7.2 Paru

Studi toksisitas inhalasi yang dilakukan pada awal 1990-an mendorong fokus ke area penelitian toksikologi yang sedang berkembang, yaitu toksikologi nano dan terutama potensi efek material nano pada paru. Makalah pendahuluan yang sering dikutip ini berfokus pada efek paru material nano dan terus memengaruhi penelitian toksikologi nano paru beberapa dekade kemudian. Contoh studi awal termasuk yang dilakukan oleh Ferin dkk.^[92] dan Oberdorster dkk.,^[93] antara lain. Setelah publikasi makalah ini, konsep seperti luas permukaan, jumlah partikel, dosis yang diberikan, laju dosis yang diberikan, dan potensi translokasi partikel ke interstitium paru menjadi perhatian. Kemudian, karakteristik seperti pembentukan spesies oksigen reaktif, keadaan aglomerasi/agregasi, komposisi, kemurnian, heterogenitas, luas permukaan spesifik, kimia permukaan, potensial zeta, sifat katalitik, distribusi ukuran, sifat penyerapan, muatan permukaan, fase kristal, ukuran butir, ukuran hidrodinamik/ukuran partikel, dan bentuk menjadi karakteristik yang menarik. Selain itu, detail seperti debu dan kelarutan lemak juga dapat membantu memprediksi potensi toksisitas partikel nano.

Untuk tujuan skrining, ada metode hasil yang lebih tinggi dan biaya yang lebih rendah yang menunjukkan kesesuaian data jika dibandingkan dengan hasil *in vivo*. Karena inisiatif seperti Tox21,^[94] ada upaya bersama untuk mulai menggunakan kultur bersama berbasis sel manusia untuk menguji potensi toksisitas untuk rute paparan ini.

Model *in vitro* yang menggunakan kultur sel dan kultur bersama telah terbukti informatif.^{[95][96]} Beberapa model tiga dimensi, menggunakan cawan kultur sel dari kaca dan model sel *in vitro* dari epitel saluran napas manusia dapat dipertahankan selama beberapa bulan.

Sebuah studi tentang titik-titik kuantum dalam sel mirip makrofag murine (sel J774.A1) juga telah membantu mempelajari alasan mekanistik di balik toksisitas partikel nano. Clift dkk. berhipotesis bahwa lokalisasi intraseluler dari material nano tertentu sebenarnya dapat secara langsung menentukan potensi toksiknya.^[97] Sementara penelitian ini berfokus pada titik-titik kuantum, penelitian lain mengilustrasikan bahwa ini mungkin merupakan hipotesis yang bermanfaat.

Alfaro-Moreno dkk.^[98] menemukan bahwa bi-kultur dan tri-kultur sel paru-paru manusia melepaskan faktor perangsang koloni granulosit (G-CSF), protein inflamasi makrofag (MIP)-1 β , interleukin (IL)-1 β , IL-6, faktor nekrosis tumor α , dan MIP-1 α . Para penulis melanjutkan dengan menyatakan bahwa efek ini konsisten dengan efek sistemik yang dijelaskan untuk partikel dan berhubungan dengan peradangan, disfungsi endotel, dan mobilisasi sel sumsum tulang.

6.3.7 *In vitro* barrier tests and appropriate testing systems to assess toxicity to biological barriers

6.3.7.1 General

Adverse effects of NMs on human health might be linked to their ability to cross biological barriers in the body. The route of exposure (pulmonary, gastro-intestinal, dermal) and, hence, the portal of entry of nanoparticles into the body, is of critical importance. The barriers identified below are two that are considered important for NMs at this time.

6.3.7.2 Pulmonary

Inhalation toxicity studies conducted in the early 1990s prompted focus to a developing area of toxicological research, that of nanotoxicology and especially to the potential pulmonary effects of NMs. These often cited preliminary papers focused on the pulmonary effects of NMs and have continued to influence pulmonary nanotoxicology research decades later. Examples of early studies include those conducted by Ferin et al.^[92] and Oberdorster et al.,^[93] among others. Subsequent to the publications of these papers, concepts such as surface area, particle number, delivered dose, delivered dose rate, and potential translocation of particles to the pulmonary interstitium became of keen interest. Later, characteristics such as the generation of reactive oxygen species, agglomeration/aggregation state, composition, purity, heterogeneity, specific surface area, surface chemistry, zeta potential, catalytic properties, size distribution, absorption properties, surface charge, crystalline phase, grain size, hydrodynamic size/particle size, and shape became characteristics of interest. In addition, details such as dustiness and fat solubility might also aid in predicting the potential toxicity of nanoparticles.

For screening purposes, there are higher throughput and lower cost methods that show data concordance when compared to *in vivo* results. Due to initiatives such as Tox21,^[94] there is a concerted effort to begin using human cell-based co-cultures to assay potential toxicity for this exposure route.

In vitro models using cell cultures and co-cultures have proven to be informative.^{[95][96]} Some three-dimensional models, using glass-bottom cell culture dishes and *in vitro* cell models of the human airway epithelium can be maintained for several months.

A study on quantum dots in murine macrophage-like cells (J774.A1 cells) has also helped to delve into the mechanistic reasoning behind the toxicity of nanoparticles. Clift et al. hypothesized that the intracellular localization of a given NM could in fact directly determine its toxic potential.^[97] While this study focused on quantum dots, other studies illustrate that this might be a worthwhile hypothesis.

Alfaro-Moreno et al.^[98] found that bi-cultures and tri-cultures^[98] of human lung cells released granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), macrophage inflammatory protein (MIP)-1beta, interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumour necrosis factor α , and MIP-1 α . The authors go on to state that these effects are consistent with those systemic effects described for particulate matter and correspond to inflammation, endothelial dysfunction, and bone marrow cell mobilization.

Rothen-Rutishauser dkk.^[99] mengembangkan *triple co-culture* yang terdiri dari sel epitel, makrofag, dan sel dendritik yang menyatakan bahwa itu 'mensimulasikan fungsi penghalang paling penting dari jalan napas epitel.' Dengan model ini, penulis telah menunjukkan pengukuran respons seluler terhadap titanium dioksida, termasuk reaktif spesies oksigen dan pelepasan faktor nekrosis tumor, dan juga telah mengilustrasikan lokalisasi intraseluler partikel nano dengan mikroskop elektron penyangkutan energi. Model ini disajikan sebagai alat untuk mempelajari interaksi partikel nano dan sel paru-paru dan metode untuk menyelidiki potensi toksik material nano. Sistem model ini telah dibandingkan dengan hasil *in vivo* dan kesesuaian data yang baik diamati. Selanjutnya, tanggapan toksikologi yang dihasilkan dari paparan selulosa (nano), tabung nano karbon ber dinding banyak, dan serat asbes *crocidolite* dibedakan satu sama lain dalam sistem tri-kultur.^[97] Sel tipe II seperti alveolar manusia (A-549) terpapar magnetit dengan ukuran mulai dari 20 nm hingga 10 μm , dipisahkan menjadi empat fraksi berbasis ukuran yang berbeda dan diuji kecenderungannya untuk menyebabkan ROS, efek genotoksik, dan stimulasi dari jalur sitokin. Aktivasi jalur c-Jun tampaknya bergantung pada ROS dan pembentukan ROS tampaknya juga berperan dalam genotoksitas magnetit.^[100] Selain itu, sistem ko-kultur juga dapat digunakan untuk pemaparan dalam apa yang disebut antarmuka udara-cair untuk meniru pemaparan inhalasi melalui aliran udara dengan lebih baik, berbeda dengan pemaparan kultur sel terendam.^[101]

Sementara banyak percobaan kultur sel atau sel ko-kultur yang dipublikasikan menghasilkan hasil yang menjanjikan, sangat sedikit protokol standar yang digunakan oleh banyak laboratorium. Pengecualian untuk ini adalah model jaringan jalan napas manusia *in vitro* yang tersedia secara komersial yang telah diuji dalam material nano oleh banyak laboratorium yang bekerja sama dan merupakan metode yang dikutip dalam berbagai publikasi.

6.3.7.3 Kulit (*Dermal*)

Masalah penetrasi kulit sehubungan dengan partikel nano sebagian besar masih belum terselesaikan. Ada bukti terbatas yang menunjukkan material nano memiliki kemampuan untuk menembus kulit atau berada di folikel rambut;^{[102][103]} namun, ada kesenjangan pengetahuan mendasar seputar perilaku material nano pada kulit yang rusak atau tertekuk. Selain itu, diketahui bahwa partikel nano berperilaku berbeda sesuai dengan dispersan yang dipilih; oleh karena itu, saat menganalisis data toksisitas *dermal*, dispersan yang digunakan sebaiknya dipertimbangkan.

Kulit tikus dan babi telah menjadi proksi paling umum untuk kulit manusia untuk digunakan dalam percobaan permeabilitas. Namun, penghalang permeabilitas kulit dari hewan laboratorium diketahui relatif lemah, karena transportasi folikel yang signifikan dan perbedaan fisiologis. Perbedaan morfologis antara jenis kulit, terutama terdiri dari kepadatan folikel rambut bersama dengan konsentrasi asam lemak bebas dan trigliserida, merupakan faktor besar dalam perbedaan antara penghalang kulit pada spesies yang berbeda. Variabilitas antar individu dari sampel kulit manusia juga perlu diperhatikan, yang dapat dicapai dengan menggunakan metode *in vitro* saat ini.

Banyak variabel yang terlibat dalam paparan *dermal* menggunakan hewan membuat metode ini kurang efisien dan berpotensi tidak relevan dengan keselamatan manusia dibandingkan jika model *in vitro* manusia digunakan.

Rothen-Rutishauser et al.^[99] developed a triple co-culture comprised of epithelial cells, macrophages, and dendritic cells stating that it 'simulates the most important barrier functions of the epithelial airway.' With this model, the authors have shown measurement of cellular responses to titanium dioxide, including reactive oxygen species and the release of tumour necrosis factor, and also have illustrated the intracellular localization of the nanoparticles by energy filtering electron microscopy. This model is presented as a tool to study the interaction of nanoparticles and lung cells and a method for the investigation of the toxic potential of NMs. This model system has been compared to *in vivo* results and good data concordance was observed. Subsequently, toxicological responses resulting from exposure to (nano)cellulose, multi-walled carbon nanotubes, and crocidolite asbestos fibres were discerned from one another in the tri-culture system.^[97] Human alveolar epithelial-like type II cells (A-549) were exposed to magnetite ranging in size from 20 nm to 10 µm, separated into four different size-based fractions and tested for their propensity to cause ROS, genotoxic effects, and the stimulation of cytokine pathways. C-Jun pathway activation appeared to be ROS-dependent and ROS formation appeared to also play a role in genotoxicity of the magnetite.^[100] In addition, co-culture systems can also be used for exposure in a so called air-liquid-interface to mimic the inhalation exposure via an air flow even better, in contrast to submerged cell culture exposure.^[101]

While many of the published cell culture or co-culture experiments produce promising results, very few standardized protocols are used by multiple laboratories. The exception to this is the commercially available *in vitro* human airway tissue model that has been tested in NMs by many collaborating laboratories and is the method cited in multiple publications.

6.3.7.3 Dermal

The issue of skin penetration with regard to nanoparticles is still largely unresolved. There is limited evidence to suggest NMs have the ability to penetrate through the skin or reside in hair follicles;^{[102][103]} however, there is a fundamental knowledge gap surrounding the behaviour of nanomaterials on broken or flexed skin. Additionally, it is known that nanoparticles behave differently according to the chosen dispersant; therefore, when analysing dermal toxicity data, the dispersant used should be taken into consideration.

Rat and pig skin have been the most common proxies for human skin for use in permeability experiments. However, the permeability barrier of skin from laboratory animals is known to be relatively weak, due to significant follicular transport and physiological differences. Morphological differences between skin types, mainly comprising the density of hair follicles along with the concentration of free fatty acids and triglycerides, represent a huge factor in the differences amongst skin barriers in different species. The inter-individual variability of human skin samples also needs to be addressed, which is achievable using current *in vitro* methods.

The many variables involved in dermal exposure using animals make these methods much less efficient and potentially irrelevant to human safety than if *in vitro* human models are used.

OECD TG 428^[104] menggunakan sampel kulit manusia sebagai komponen strategi pengujian penyerapan kulit. Teknik *in vitro* ini telah diterapkan pada material nano menggunakan kulit manusia secara *in vitro* dan *in vivo*.^{[105][106][107]} Sampel kulit digunakan secara *in vitro* untuk menilai penyerapan partikel nano atau difusi zat melalui kulit dengan menggunakan sel difusi tipe Franz atau model penetrasi Saarbruecken. Protokol pengujian toksisitas *dermal* lainnya, yang divalidasi oleh OECD termasuk pengujian korosi *EpiSkin*,^[108] *Corrositex* untuk Korosivitas Kulit,^[109] Korosivitas kulit TER tikus^{[99][110]} dan iritasi kulit *in vitro* OECD TG 439.^[111] Penetrasi partikel nano pada *dermal* umumnya dianggap rendah atau tidak ada.^{[46][47][48][49]} Uji skrining kepekaan kulit dijelaskan dalam Pasal 6.3.3.

Model yang dapat diakses dan tersedia secara komersial telah terbukti andal dan relevan untuk material nano. Cawan biakan sel beralas kaca dan teknologi berbasis model sel *in vitro* 3D mengatasi masalah iritasi *dermal* dan permeabilitas dan telah divalidasi untuk bahan kimia.^[112] Metode ini telah digunakan oleh industri dan akademisi dan dapat direproduksi di seluruh laboratorium.

6.3.8 Pengukuran Omics

Pendekatan toksikogenomik telah diterapkan untuk material nano penilaian mekanistik. Pengukuran Omics, seperti genomik, proteomik, transkriptomik, metabolomik, dan sistem Omics lainnya digunakan secara teratur untuk pengembangan farmasi dan penilaian ekotoksikologi, dan sering diterapkan pada material nano dengan cara yang serupa. Penggunaan kultur sel bersama dengan Omics untuk menguji material nano untuk efek kesehatan manusia sering terlihat dalam literatur, meskipun teknik ini biasanya tidak dilakukan dengan cara terstandar. Meskipun demikian, data yang dihasilkan terbukti bermanfaat dan dapat memberikan informasi berharga tentang potensi toksisitas material nano dalam percobaan yang relatif cepat dan hemat biaya. Selain itu, penggunaan spesies trofik tingkat dasar (misalnya bakteri, ganggang, *Daphnia*, dan *C. elegans*) untuk skrining ekotoksikologi nano juga telah diuji dalam kombinasi dengan analisis Omics.

Lee dkk.^[113] telah mengilustrasikan penerapan genomik fungsional dan melaporkan efek *ceria* nano (dikenal memberikan sifat redoks, namun dampak luas genom sebelumnya tidak dipahami) pada transkripsi gen global dalam sel saraf tikus. Temuan seperti ini menunjukkan bahwa genomik dan transkriptomik mungkin berguna dalam mengidentifikasi gen spesifik penyakit dan dapat diterapkan untuk analisis efek kesehatan spesifik material nano.^[114]

Contoh metodologi yang umum diterapkan untuk skrining ekotoksitas terlihat di Roh dkk.,^[115] dengan partikel nano perak diuji menggunakan organisme tingkat dasar, seperti *C. elegans*. Jenis genomik dan *transkriptomik* yang sama dapat dilakukan dengan menggunakan bakteri yang ditemukan di tanah, spesies alga yang ditemukan di air, atau *Daphnia*, kutu air. Dalam studi *C. elegans*, *microarray* seluruh genom digunakan untuk menilai profil transkripsi secara kualitatif, sementara profil spesifik dipantau secara kuantitatif.

6.3.9 Toksisitas lainnya

Uji skrining toksikologi tambahan, yang tidak tercakup di atas, termasuk pengujian untuk neurotoksisitas, toksisitas perkembangan, embriotoksitas, dan efek pada organ tertentu.

Neurotoksisitas: Ko-kultur sel yang memodelkan penghalang darah-otak dan mampu memprediksi *transcytosis* dan toksisitas partikel nano telah dikembangkan. Perbandingan antara hasil *in vitro* dan hasil uji *in vivo* pada tikus menunjukkan kesesuaian data.^[116]

OECD TG 428^[104] uses human skin samples as a component of the skin absorption testing strategy. This *in vitro* technique is already being applied to NMs using human skin *in vitro* and *in vivo*.^{[105][106][107]} The skin samples are used *in vitro* to assess nanoparticle absorption or the diffusion of substances through the skin by using Franz-type diffusion cells or the Saarbruecken penetration model. Other dermal toxicity testing protocols, validated by OECD include EpiSkin corrosion assay,^[108] Corrositex for Skin Corrosivity,^[109] Rat TER skin corrosivity^{[99][110]} and *in vitro* skin irritation OECD TG 439.^[111] Dermal penetration of nanoparticles is generally considered to be low or absent.^{[46][47][48][49]} Skin sensitization screening tests are described in 6.3.3.

Accessible, commercially available models have proven reliable and relevant for NMs. Both glass-bottom cell culture dish and 3D *in vitro* cell model based technologies address dermal irritation and permeability concerns and have been validated for chemicals.^[112] These methods have been used by industry and academia and are reproducible across laboratories.

6.3.8 Omics measurements

The toxicogenomic approach has been applied for the mechanistic assessment NMs. Omics measurements, such as genomics, proteomics, transcriptomics, metabolomics, and other omics systems are used regularly for pharmaceutical development and ecotoxicology assessment, and are often applied to NMs in a similar manner. The use of cell culture in conjunction with omics for assaying NMs for human health effects is seen often in the literature, although these techniques are not typically performed in a standardized manner. Nonetheless, the resulting data prove helpful and could provide valuable information on potential nanomaterial toxicity in a relatively quick and cost-effective experiment. In addition, the use of base-level trophic species (e.g. bacteria, algae, *Daphnia*, and *C. elegans*) for nano-ecotoxicology screening have also been assayed in combination with omics analysis.

Lee et al.^[113] have illustrated the application of functional genomics and report the effects of nanoceria (known to impart redox properties, yet the genome-wide impact was previously not understood) on the global gene transcription in mouse neuronal cells. Findings such as these indicate that genomics and transcriptomics are likely useful in identifying disease-specific genes and can be applied to analyses of nanomaterial-specific health effects.^[114]

An example of a commonly applied methodology for ecotoxicity screening is seen in Roh et al.,^[115] where silver nanoparticles are tested using base-level organisms, such as *C. elegans*. The same type of genomics and transcriptomics can be done using bacteria found in soil, algal species found in water, or *Daphnia*, the water flea. In the *C. elegans* study, whole genome microarray was used to qualitatively assess transcription profiles, while specific profiles were monitored in a quantitative manner.

6.3.9 Other toxicities

Additional toxicological screening assays, not covered above, include tests for neurotoxicity, developmental toxicity, embryotoxicity, and effects on particular organs.

Neurotoxicity: Cell co-cultures that model the blood-brain barrier and are capable of predicting nanoparticle transcytosis and toxicity have been developed. Comparison between the *in vitro* results and results from *in vivo* tests in rats showed data concordance.^[116]

Toksikitas Pengembangan: Model perfusi plasenta manusia *ex vivo* telah terbukti berguna dalam menentukan molekul kecil dan partikel nano mampu melewati penghalang plasenta dan karenanya dapat membantu memastikan partikel nano tertentu dapat membahayakan janin yang sedang berkembang.^[117]

Embriotoksitas: Ada pengganti sebagian untuk uji toksisitas perkembangan *in vivo* dan mencakup uji seperti: uji sel punca embrionik, uji tunas tungkai tikus, dan uji massa mikro.^[118]

Efek Organ: Untuk menilai efek obat-obatan pada organ tertentu atau kemampuan obat atau perangkat penghantar molekular untuk target jenis sel tertentu, sebuah *mikrochip* mikrofluida multi-bilik *in vitro* dari berbagai jenis sel manusia telah dikembangkan. Sin dkk.^[119] telah mengembangkan salah satu perangkat tersebut, HuREL (*Human Relevance*), yang sangat relevan untuk metabolomik, toksikogenomik, toksisitas multi-organ, dan evaluasi kemanjuran senyawa dan metabolit. Walker dkk.^[120] mengembangkan *lab-on-a-chip* berkemampuan nano untuk pengujian sitotoksitas, yang mampu menguji sembilan pengenceran linier secara paralel dalam *cell line* manusia. Gottwald dkk.^[121] telah mengembangkan platform berbasis cip untuk generasi *in vitro* organisasi jaringan tiga dimensi yang kompatibel dengan otomatisasi. Perangkat *lung-on-a-chip* dan *gut-on-a-chip* serupa telah dikembangkan.^{[122][123][124]} Kemajuan *lab-on-a-chip* ini memungkinkan para peneliti untuk menguji toksisitas serta penargetan sel menggunakan berbagai sel manusia.

6.4 Metode yang relevan untuk skrining toksikologi *in vivo* dari material nano yang dimanufaktur

6.4.1 Umum

Sistem model *in vivo* baru seperti embrio ikan zebra, dapat dengan mudah dan cepat diinterogasi pada tingkat seluler dan molekuler, selain tingkat hewan secara keseluruhan, untuk memajukan pemahaman kita tentang konsekuensi biologis dari paparan material nano dengan cepat.

6.4.2 Model skrining seluruh hewan (termasuk pengukuran metabolomik, proteomik, transkriptomik, dan genotoksitas)

Pendekatan skrining seluruh hewan menggunakan sistem model yang menggunakan spesies tidak hidup muncul sebagai alat yang memungkinkan untuk menilai dampak toksikologi material nano terhadap kesehatan lingkungan dan manusia. Misalnya, model embrio ikan zebra telah muncul sebagai model biologi vertebrata yang berguna dan berharga dan secara bersamaan, toksikologi manusia.^{[125][126][127][128][129][130][131][132]} Sistem model ini menawarkan kekuatan investigasi seluruh hewan (misalnya organisme utuh, mekanisme umpan balik homeostatik fungsional, dan pensinyalan antar seluler) dengan kenyamanan kultur sel (misalnya hemat biaya dan hemat waktu, infrastruktur minimal, sejumlah kecil solusi material nano diperlukan). Perlu disadari bahwa efek toksik juga dapat terjadi ketika insang ikan tersumbat oleh partikel nano. Jadi, ada penyebab fisik kematian bukan penyebab toksikologi.

Developmental Toxicity: *Ex vivo* human placental perfusion models have proven useful in determining whether small molecules and nanoparticles are able to cross the placental barrier and can therefore help ascertain whether a given nanoparticle might put a developing foetus at risk.^[117]

Embryotoxicity: Partial replacements for the *in vivo* developmental toxicity test exist and include tests such as: embryonic stem cell test, rat limb bud test, and micromass test.^[118]

Organ Effects: To assess the effects of pharmaceuticals on particular organs or the ability of drug or molecular delivery devices to target specific cell types, a novel *in vitro* multi-chambered microfluidic microchip of various human cell types has been developed. Sin et al.^[119] have developed one such device, the HuREL (Human Relevance), which is particularly relevant for metabolomics, toxicogenomics, multi-organ toxicity, and the evaluation of compound efficacy and metabolites. Walker et al.^[120] developed a nano-capable lab-on-a-chip for cytotoxicity testing, which is able to test nine linear dilutions in parallel in human cell lines. Gottwald et al.^[121] have developed a chip-based platform for the *in vitro* generation of three-dimensional tissue organization that is compatible with automation. Similar lung-on-a-chip and gut-on-a-chip devices have been developed.^{[122][123][124]} These lab-on-a-chip advances allow researchers to test for both toxicity as well as cell targeting using a variety of human cells.

6.4 Relevant methods for *in vivo* toxicological screening of manufactured NMs

6.4.1 General

New *in vivo* model systems such as the embryonic zebrafish, can be easily and rapidly interrogated at the cellular and molecular levels, in addition to the whole animal level, to rapidly advance our understanding of the biological consequences of nanomaterial exposure.

6.4.2 Whole animal screening models (including measurements of metabolomics, proteomics, transcriptomics, and genotoxicity)

Whole animal screening approaches using model systems employing non-sentient species are emerging as possible tools to assess the toxicological impacts of NMs for environmental and human health. For instance, the embryonic zebrafish model has emerged as a useful and valuable model of vertebrate biology and concomitantly, human toxicology.^{[125][126][127][128][129][130][131][132]} This model system offers the power of whole-animal investigations (e.g. intact organism, functional homeostatic feedback mechanisms, and intercellular signalling) with the convenience of cell culture (e.g. cost-efficient and time-efficient, minimal infrastructure, small quantities of nanomaterial solutions required). It should be realized that toxic effects might also occur when the gills of the fish are clogged by nanoparticles. So, there is a physical cause of death instead of toxicological cause.

Model ikan zebra embrionik dapat digunakan untuk memberikan informasi dengan cepat tentang dampak biologis paparan material nano pada seluruh sistem hewan. Uji toksisitas material nano memberikan indikator sensitif dari efek sistem terintegrasi, karena vertebrata pada tahap awal kehidupan seringkali lebih responsif terhadap gangguan. Proses perkembangan mendasar sangat dilestarikan di seluruh spesies, memungkinkan terjemahan luas dari hasil pengujian. Karena komunikasi sel-ke-sel yang sangat terkoordinasi dan pensinyalan molekuler diperlukan untuk perkembangan normal, jika material nano mengganggu interaksi ini, perkembangan diharapkan akan terganggu. Perkembangan yang terganggu dapat bermanifestasi sebagai malformasi secara morfologis, kelainan perilaku atau kematian embrio. Serangkaian analisis secara morfologis, perkembangan, dan perilaku dikombinasikan untuk memberikan ukuran efek sistem terintegrasi.

6.4.3 Uji skrining *in vivo* lain yang relevan

Dalam seluruh sistem hewan, toksisitas juga dapat diinduksi sebagai efek sekunder dari paparan material nano; misalnya, efek hilir dari material nano utuh atau produk sampingan, ion terlarut atau spesies reaktif dapat dilihat pada organ hilir setelah penyerapan. Selain itu, efek sekunder dapat dilihat ketika material nano menumpuk di organ atau sistem organ. Misalnya, akumulasi tabung nano karbon di saluran usus *Daphnia magna*^{[133][134]} menginduksi kematian dengan kelebihan beban fisik dan bukan karena efek langsung dari ukuran material. Pentingnya kerangka bukti berat untuk menentukan tidak ada tingkat efek samping disorot dalam studi tikus yang terpapar serat nano karbon.^[135]

Satu desain studi dapat dianggap sebagai skrining untuk trombogenesis. Silva dan rekan kerja^[136] mengevaluasi penggunaan vena telinga tikus sebagai skrining efek trombosis. Dalam model ini, trombus dipicu oleh infusi *Rose Bengal* intravena (IV) dan penerangan pembuluh darah dengan sinar laser. Efek material nano pada pembentukan gumpalan kemudian dapat dipelajari dengan infus partikel IV secara simultan, atau pemberian intratrakeal (IT) sebelum infus *Rose Bengal*, karena gumpalan terbentuk dalam waktu 10 menit setelah aktivasi *Rose Bengal* di vena. Hasil mereka menunjukkan bahwa manik-manik polistiren yang diberikan IV secara signifikan menurunkan waktu pembekuan dibandingkan dengan kelompok yang tidak diobati, tetapi manik-manik yang diberikan IT menurunkan waktu pembekuan bahkan di luar kelompok IV. Menariknya, pelapisan polistiren dengan amina lebih efektif daripada manik-manik berlapis karboksilat; selanjutnya, manik-manik berlapis amina menunjukkan respons dosis berbentuk U. Banyak pekerjaan yang perlu dilakukan untuk memvalidasi metode ini relatif terhadap partikel lain dan ukuran partikel, tetapi ini memiliki kemungkinan uji skrining untuk trombogenesis. Uji administrasi intratrakeal diusulkan sebagai metode skrining untuk toksisitas inhalasi.

7 Metode skrining toksikologi terkait lingkungan

7.1 Pendahuluan

Pertimbangan penting untuk pengujian toksikologi lingkungan meliputi:

- memilih rentang konsentrasi partikel nano yang dipaparkan ke organisme,
- kuantifikasi dan karakterisasi (agregasi, pelapisan permukaan, dan lain-lain, dan sejauh mana karakteristik ini berubah selama pengujian) dari material nano yang diamati dalam media paparan,
- memilih jalur paparan (yaitu menelan, menghirup, atau kontak dengan permukaan luar organisme),
- karakteristik media pemaparan, kondisi makan (ada atau tidaknya makanan, dan berapa banyak dan jenis makanan apa yang tersedia),

The embryonic zebrafish model can be employed to rapidly provide information on the biological impacts of nanomaterial exposure on whole animal systems. The test for nanomaterial toxicity provides a sensitive indicator of integrated system effects, because vertebrates at the earliest life stages are often more responsive to perturbation. Fundamental processes of development are highly conserved across species, enabling broad translation of assay results. Since highly coordinated cell-to-cell communications and molecular signalling are required for normal development, if NMs perturb these interactions, development would be expected to be disrupted. Perturbed development can manifest as morphological malformations, behavioural abnormalities or death of the embryos. A suite of morphological, developmental, and behavioural analyses are combined to provide a measure of integrated system effects.

6.4.3 Other relevant *in vivo* screening tests

In whole animal systems, toxicity can also be induced as a secondary effect of exposure to the nanomaterial; for instance, downstream effects of the intact nanomaterial or by-products, dissolved ions or reactive species could be seen on downstream organs after uptake. Additionally, secondary effects can be seen when NMs accumulate in organs or organ systems. For instance, accumulation of carbon nanotubes in the gut tract of *Daphnia magna*^{[133][134]} induces mortality by apparent physical overloading and not due to direct effect of the size of the material. The importance of a weight-of-evidence framework for determining no adverse effect levels was highlighted in the carbon nanofibre exposed rat study.^[135]

One study design can be considered 'screening' for thrombogenicity. Silva and coworkers^[136] evaluated the use of the rat ear vein as a screen for effects on thrombosis. In this model, a thrombus is triggered by intravenous (IV) infusion of Rose Bengal and illumination of the vessel with a laser light. The effect of the nanomaterial on clot formation can then be studied by simultaneous IV infusion of the particle, or intratracheal (IT) administration prior to infusion of Rose Bengal, because clots form within 10 min of activation of the Rose Bengal in the vein. Their results indicate that IV administered polystyrene beads significantly decreased the clotting time compared with the untreated group, but IT administered beads decreased the clotting time even beyond the IV group. Interestingly, coating of the polystyrene with an amine was more effective than carboxylate-coated beads; furthermore, amine-coated beads demonstrated a U-shaped dose response. Much work needs to be done to validate this method relative to other particles and particle sizes, but it does hold the possibility of a screening assay for thrombogenicity. Intratracheal administration tests are proposed as screening methods for inhalation toxicity.

7 Methods for toxicological screening related to the environment

7.1 Introduction

Important considerations for environmental toxicology testing include:

- choosing the concentration range of nanoparticles to which the organisms are exposed,
- quantification and characterization (aggregation, surface coatings, etc. and to what extent these characteristics change during the test) of NMs of interest in the exposure media,
- selecting the exposure pathway(s) (i.e. ingestion, inhalation, or contact with the outer surface of the organism),
- characteristics of the exposure medium, feeding conditions (presence or absence of food, and how much and what types of food are available),

- titik akhir diselidiki (toksisitas akut, toksisitas reproduksi, stres oksidatif, dan lain-lain), dan
- sensitivitas organisme yang terpapar.

Titik akhir atau efek yang akan diuji serupa dengan yang akan diuji untuk polutan lingkungan biasa, seperti yang biasa diukur (kematian, penurunan berat badan, dan tingkat populasi atau efek reproduksi), serta titik akhir toksikologi yang lebih baru, seperti sebagai perubahan ekspresi gen atau protein atau kerusakan oksidatif pada biomolekul.

Sejauh mana metode pengujian baku saat ini dapat diterapkan pada material nano tanpa modifikasi, dan modifikasi apa yang diperlukan untuk memastikan hasil yang andal dan dapat direproduksi, adalah topik untuk penelitian yang sedang berlangsung. Penerapan metode saat ini tanpa modifikasi atau modifikasi yang diperlukan mungkin akan bervariasi berdasarkan organisme dan media (tanah, air, atau sedimen) tempat pengujian dilakukan dan sifat-sifat material nano. Namun demikian, metode pengujian standar saat ini^{[137][138]} adalah titik awal yang direkomendasikan untuk pengujian efek ekologis dari material nano. Beberapa contoh metode potensial untuk skrining cepat partikel nano meliputi: Uji penghambatan pertumbuhan alga,^[139] *Daphnia sp.* Uji immobilisasi akut,^[140] Penentuan kualitas air dari efek toksik sampel sedimen dan tanah terhadap pertumbuhan, kesuburan, dan reproduksi *Caenorhabditis elegans* (Nematoda), (4 hari untuk uji pertumbuhan),^[141] dan Panduan Standar untuk Melakukan Uji Toksisitas Tanah Laboratorium dengan Nematoda *Caenorhabditis elegans*, (1 hari atau 2 hari untuk uji kematian akut).^{[142][143]} Peluang lain yang menjanjikan untuk metode skrining cepat adalah toksisitas bakteri menggunakan 96 pelat sumur dan pembaca pelat otomatis. Salah satu contoh untuk ini disebut profil fisiologis tingkat komunitas dan telah terbukti efektif untuk perubahan spasial dan temporal yang berbeda dalam komunitas mikroba. Dalam penelitian ekologi terapan, platform 96 sumur dapat digunakan untuk mengukur metabolisme 31 sumber karbon per pengujian.^[144] Meskipun tidak ada metode standar yang dikembangkan untuk pendekatan ini, ada metode singkat (4 jam) untuk penghambatan respirasi lumpur aktif.^[145]

Pertimbangan metodologis khusus untuk pengujian partikel nano karbon baru-baru ini dikeluarkan,^[143] dan revidi efek ekologis dari tabung nano karbon dalam matriks yang berbeda juga diterbitkan.^[146] Selain itu, metode persiapan suspensi material nano dan relevansi lingkungan dari pendekatan ini atau kekurangannya perlu dipertimbangkan dengan hati-hati. Sebagai contoh, beberapa eksperimen awal dengan fuleren^[147] menggunakan fuleren yang disuspensikan dengan tetrahidrofur (THF), yang menyebabkan efek toksik terkait produk sampingan THF dan bukan fuleren itu sendiri.^[148] Faktor penting lainnya terkait prosedur penanggulangan partikel nano adalah ultrasonikasi dan reproduktifitas prosedur ini di antara laboratorium.^[149]

7.2 Keadaan dan distribusi lingkungan

Keadaan dan distribusi lingkungan material nano bergantung pada sejumlah besar faktor, seperti jalur pelepasan ketika material nano awalnya memasuki lingkungan (misalnya dalam biosolid dari instalasi pengolahan air limbah untuk aplikasi lahan atau degradasi produk konsumen). Setelah pelepasan, mobilitas material nano bergantung pada karakteristik lingkungan dari media, seperti sifat tanah atau sedimen atau sifat kimia air dari badan air. Karakteristik material nano biasanya juga sangat relevan, seperti lapisan permukaannya atau kekurangannya, bentuk dan morfologi (batang versus bola), komposisi partikel, dan afinitas untuk molekul lain di lingkungan, seperti bahan organik alami.^{[150][151]}

- end points investigated (acute toxicity, reproductive toxicity, oxidative stress, etc.), and
- sensitivity of the organisms exposed.

The end points or effects to be tested are similar to those that would be tested for typical environmental pollutants, such as those commonly measured (mortality, weight loss, and population level or reproductive effects), as well as more novel toxicological end points, such as changes to gene or protein expression or oxidative damage to biomolecules.

The extent to which current standard test methods can be applied to NMs without modification, and what modifications if any are needed to ensure reliable and reproducible results, are topics for ongoing research. The applicability of current methods without modification or the modifications needed will probably vary based upon the organism and medium (soil, water, or sediment) in which the test occurs and the properties of the NMs. Nevertheless, the current standard test methods^{[137][138]} are a recommended starting point for the testing of ecological effects from NMs. Some examples of potential methods for rapid screening of NPs include: Algae growth inhibition test,^[139] *Daphnia* sp. Acute immobilization test,^[140] Water quality-determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility, and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda), (4 d for growth test),^[141] and the Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity Tests with the Nematode *Caenorhabditis elegans*, (1 d or 2 d for acute mortality test).^{[142][143]} Another promising opportunity for a rapid screening method is bacteria toxicity using 96 well plates and automated plate readers. One example for this is called community-level physiological profiling and has been demonstrated to be effective for distinguished spatial and temporal changes in microbial communities. In applied ecological research, the 96 well platform can be used to measure the metabolism of 31 carbon sources per assay.^[144] While there are no standard methods developed for this approach, there is a short (4 h) method for activated sludge respiration inhibition.^[145]

Specific methodological considerations for the testing of carbon nanoparticles were recently issued,^[143] and a review of the ecological effects of carbon nanotubes in different matrices was also published.^[146] Additionally, the preparation method for the NM suspension and the environmental relevance of this approach or lack thereof need to be carefully considered. For example, some early experiments with fullerenes^[147] used fullerenes suspended with tetrahydrofuran (THF), which caused toxic effects related to THF byproducts and not the fullerenes themselves.^[148] Another important factor related to nanoparticle suspension procedures is ultrasonication and reproducibility of this procedure among laboratories.^[149]

7.2 Environmental fate and distribution

The environmental fate and distribution of NMs depend on a large number of factors, such as the release pathway through which NMs initially enter the environment (e.g. in biosolids from a wastewater treatment plant for land application or degradation of consumer products). After release, NM mobility depends on environmental characteristics of the media, such as soil or sediment properties or the aqueous chemistry of a water body. NM characteristics are typically also highly relevant, such as their surface coatings or lack thereof, shape and morphology (rods versus spheres), particle composition, and affinity for other molecules in the environment, such as natural organic matter.^{[150][151]}

7.3 Degradasi dan transformasi lingkungan

Degradasi dan transformasi potensial berbeda untuk material nano berbasis karbon dan anorganik. Partikel nano karbon (misalnya fuleren dan tabung nano karbon) pada akhirnya dapat termineralisasi menjadi karbon dioksida melalui jalur biotik (biodegradasi) atau abiotik.^[152] Partikel nano karbon juga dapat dimodifikasi, seperti melalui oksidasi dan perubahan kimia permukaan partikel. Material nano anorganik juga dapat diubah melalui penguraian menjadi ion karakteristiknya, proses oksidasi (misalnya besi valensi nol menjadi oksida besi), dan reaksi kimia, yang sebaliknya mengubah komposisi material nano (misalnya partikel nano perak diubah menjadi perak klorida atau perak sulfida). Topik lain yang relevan untuk beberapa material nano menyangkut perubahan pelapis permukaannya, seperti biodegradasi, pertukaran pelapis permukaan (misalnya bahan organik alami untuk sitrat), atau modifikasi pelapis permukaan dengan proses biotik atau abiotik (misalnya fotolisis).

7.4 Biopersistensi dan bioakumulasi lingkungan

Biopersistensi dan bioakumulasi material nano bergantung pada karakteristik material nano (misalnya ukuran, komposisi partikel nano, lapisan permukaan), karakteristik media lingkungan (dengan berbagai faktor yang paling penting untuk media akuatik, media terestrial, atau sedimen), dan karakteristik organisme. Untuk paparan material nano melalui konsumsi makanan, air, tanah, atau sedimen, faktor kritis adalah sejauh mana material tersebut diabsorpsi ke dalam jaringan organisme daripada tetap berada di sistem pencernaan. Kemampuan organisme untuk mengeluarkan material nano adalah komponen penting lain dari biopersistensi mereka. Sejauh ini, absorpsi ke dalam jaringan organisme biasanya tidak teramati pada paparan yang relevan secara ekologis, dengan material nano tersisa di sistem pencernaan.^{[133][134][151][152]} Namun, penyerapan material nano emas ke dalam cacing tanah^[153] dan penyerapan partikel nano emas dan fuleren serta tabung nano karbon ke dalam tanaman^{[151][152][154]} telah diamati. Selain itu, transfer rantai makanan telah diamati pada beberapa kesempatan,^{[155][156][157][158]} tetapi biomagnifikasi (yaitu peningkatan dari satu tingkat trofik ke tingkat berikutnya) jauh lebih jarang terjadi.^{[158][159][160]} Salah satu tantangan besar dalam bidang ini adalah kurangnya prosedur deteksi dan ekstraksi material nano spesifik. Lainnya adalah kurangnya metode analitik untuk menilai distribusi dan modifikasi partikel nano dalam organisme.

7.3 Environmental degradation and transformation

Potential degradation and transformations differ for carbon-based and inorganic NMs. Carbon nanoparticles (e.g. fullerenes and carbon nanotubes) might ultimately be mineralized into carbon dioxide through biotic (biodegradation) or abiotic pathways.^[152] Carbonaceous nanoparticles could also be modified, such as through oxidation and changes to the surface chemistry of the particles. Inorganic NMs can also be transformed through dissolution into their characteristic ions, oxidation processes (e.g. zero-valent iron to iron oxides), and chemical reactions, which otherwise change the composition of the NMs (e.g. silver nanoparticles being transformed to silver chloride or silver sulfide). Another relevant topic for some NMs concerns changes to their surface coatings, such as biodegradation, exchange of the surface coating (e.g. natural organic matter for citrate), or modification of surface coatings by biotic or abiotic processes (e.g. photolysis).

7.4 Environmental biopersistence and bioaccumulation

The biopersistence and bioaccumulation of NMs depend on the NM characteristics (e.g. size, nanoparticle composition, surface coatings), characteristics of the environmental media (with different factors being most important for aquatic media, terrestrial media, or sediment), and characteristics of the organisms. For NM exposure through ingestion of food, water, soil, or sediment, a critical factor is to what extent the material is absorbed into the organisms' tissues rather than remaining in the digestive system. The capability of the organism to excrete NMs is another critical component of their biopersistence. Thus far, absorption into the organisms' tissues has usually not been observed in ecologically relevant exposures, with NMs remaining in the digestive system.^{[133][134][151][152]} However, absorption of gold NMs into earthworms^[153] and absorption of gold and fullerene nanoparticles and carbon nanotubes into plants^{[151][152][154]} have been observed. Additionally, food chain transfer has been observed on a number of occasions,^{[155][156][157][158]} but biomagnifications (i.e. an increase from one trophic level to the next) is much less common.^{[158][159][160]} One of the substantial challenges in this field is the lack of NM-specific detection and extraction procedures. Another is the lack of analytical methods to assess the distribution and modifications of the nanoparticles within the organism.

Bibliografi

- [1] ISO 10993-18, *Biological evaluation of medical devices — Part 18: Chemical characterization of materials*
- [2] ISO 14971, *Medical devices — Application of risk management to medical devices*
- [3] ISO/TR 13014, *Nanotechnologies — Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment*
- [4] ISO/TR 13121, *Nanotechnologies — Nanomaterial risk evaluation*
- [5] Russell W.M.S., Burch R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, 1959
- [6] Hirsch C., Roessleinm M., Krug H.F., Wick P. Nanomaterial cell interactions: are current in vitro tests reliable? *Nanomedicine (Lond)*. 2011, 6 pp. 837–847
- [7] Puzyn T., Leszczynska D., Leszczynski J. Quantitative Structure–Activity Relationships (QSARs) in the European REACH System: Could These Approaches be Applied to Nanomaterials? In: *Practical Aspects of Computational Chemistry*, (Leszczynski J., Shukla N.K., eds.). Springer Science, 2009a, pp. 201–16.
- [8] Fubini B., Ghiazza M., Fenoglio I. Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology*. 2010, 4 pp. 347–363
- [9] Fourches D., Pu D., Tassa C., Weissleder R., Shaw S.Y., Mumper R.J. et al. Quantitative nanostructure-activity relationship modeling. *ACS Nano*. 2010, 4 pp. 5703–5712
- [10] Burello E., Worth A.P. A theoretical framework for predicting the oxidative stress potential of oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2011, 5 pp. 228–235
- [11] Puzyn T., Rasulev B., Gajewicz A., Hu X., Dasari T.P., Michalkova A. et al. Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles. *Nat. Nanotechnol*. 2011, 6 pp. 175–178
- [12] Sayes C., Ivanov I. Comparative study of predictive computational models for nanoparticle-induced cytotoxicity. *Risk Anal*. 2010, 30 pp. 1723–1734
- [13] Liu R., Rallo R., George S., Ji Z., Nair S., Nel A.E. et al. Classification NanoSAR development for cytotoxicity of metal oxide nanoparticles. *Small*. 2011, 7 pp. 1118–1126
- [14] Epa V.C., Burden F.R., Tassa C., Weissleder R., Shaw S., Winkler D.A. Modeling Biological Activities of Nanoparticles. *Nano Lett*. 2012, 12 pp. 5808–5812
- [15] Feliu N., Fadeel B. Nanotoxicology: no small matter. *Nanoscale*. 2010, 2 pp. 2514–2520
- [16] Fourches D., Pu D., Tropsha A. Exploring Quantitative Nanostructure-Activity Relationships (QNAR) Modeling as a Tool for Predicting Biological Effects of Manufactured Nanoparticles. *Comb. Chem. High Throughput Screen*. 2011, 14 pp. 217–225
- [17] Toropov A.A., Toropova A.P., Benfenati E. SMILES-based optimal descriptors: QSAR modeling of carcinogenicity by balance of correlations with ideal slopes. *Eur. J. Med. Chem*. 2010, 45 pp. 3581–3587
- [18] Winkler D.A., Mombelli E., Pietroiusti A., Tran L., Worth A., Fadeel B. et al. Applying quantitative structure-activity relationship approaches to nanotoxicology: Current status and future potential. *Toxicology*. 2012, 12 pp. 397–406

- [19] Nel A., Xia T., Meng H., Wang X., Lin S., Ji Z. et al. Nanomaterial Toxicity Testing in the 21st Century: Use of a Predictive Toxicological Approach and High-Throughput Screening. *Acc. Chem. Res.* 2012
- [20] ISO/DTR 16196, Compilation and Description of Sample Preparation and Dosing Methods for Engineered and Manufactured NMs
- [21] Locascio E.L., Reipa V., Zook J.M., Pleus R.C. Nanomaterial Toxicity: Emerging Standards and Efforts to Support Standards Development. In: *Nanotechnology Standards*, (Murashov V., Howard J., eds.). Springer Science, 2011, pp. 179–208.
- [22] No. 24 Preliminary Guidance Notes on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured NMs, available at <http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282010%2925&doclanguage=en>
- [23] United States National Research Council (2007), 'Toxicity Testing in the 21st Century: A vision and a strategy'
- [24] Roebben G., Rasmussen K., Kestens V., Linsinger T.P.J., Rauscher H., Emons H. et al. Reference materials and representative test materials: the nanotechnology case. *J. Nanopart. Res.* 2013, 15 p. 1455
- [25] Oostingh G.J., Casals E., Italiani P., Colognato R., Stritzinger R., Ponti J. et al. Problems and challenges in the development and validation of human cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects. *Part. Fibre Toxicol.* 2011, 8 p. 8
- [26] McNeil S.E. Challenges for nanoparticle characterization. *Methods Mol. Biol.* 2011, 697 pp. 9–15
- [27] 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 (2) pp. 222–235
- [28] Rushton E.K., Jiang J., Leonard S.S., Eberly S., Castranova V., Biswas P. et al. Concept of assessing nanoparticle hazards considering nanoparticle dosemetric and chemical/biological response metrics. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2010, 73 pp. 445–461
- [29] Sayes C.M., Reed K.L., Warheit D.B. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol. Sci.* 2007, 97 pp. 163–180
- [30] Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schürch S., Kreyling W., Schulz H. et al. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ. Health Perspect.* 2005, 113 pp. 1555–1560
- [31] Rothen-Rutishauser B., Mueller L., Blank F., Brandenberger C., Muehlfeld C., Gehr P. A newly developed in vitro model of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of nanoparticles. *ALTEX.* 2008, 25 pp. 191–196
- [32] Jones C.F., Grainger D.W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61 pp. 438–456
- [33] Petri-Fink A., Rothen-Rutishauser B. Nanoparticles and cells: an interdisciplinary approach. *Chimia (Aarau).* 2012, 66 pp. 104–109
- [34] Han X., Corson N., Wade-Mercer P., Gelein R., Jiang J., Sahu M. et al. Assessing the relevance of in vitro studies in nanotoxicology by examining correlations between in vitro and in vivo data. *Toxicology.* 2012, 16 pp. 1–9

- [35] Dix D.J., Houck K.A., Martin M.T., Richard A.M., Setzer R.W., Kavlock R.J. The ToxCast program for prioritizing toxicity testing of environmental chemicals. *Toxicol. Sci.* 2007, 95 pp. 5–12
- [36] Li N., Xia T., Nel A.E. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic. Biol. Med.* 2008, 44 pp. 1689–1699
- [37] Ayres J.G., Borm P., Cassee F.R., Castranova V., Donaldson K., Ghio A. et al. Evaluating the toxicity of airborne particulate matter and nanoparticles by measuring oxidative stress potential — A workshop report and consensus statement. *InhToxicol.* 2008, 20 pp. 75–99
- [38] Dobrovolskaia M.A., Aggarwal P., Hall J.B., McNeil S.E. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol. Pharm.* 2008, 5 pp. 487–495
- [39] Mudunkotuwa I.A., Grassian V.H. Citric Acid Adsorption on TiO₂ Nanoparticles in Aqueous Suspensions at Acidic and Circumneutral pH: Surface Coverage, Surface Speciation, and Its Impact on Nanoparticle-Nanoparticle Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132 pp. 14986–14994
- [40] Hirano A., Uda K., Maeda Y., Kasaka, T., Shiraki, K. One-Dimensional Protein-Based Nanoparticles Induce Lipid Bilayer Disruption: Carbon Nanotube Conjugates and Amyloid Fibrils. *Langmuir.* 2010, 26 pp. 17256–17259
- [41] Powers K.W., Palazuelos M., Moudgil B.M., Roberts S.M. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology.* 2007, 1 pp. 42–51
- [42] Oberdorster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2001, 74 pp. 1–8
- [43] Poland C.A., Duffin R., Kinloch, Maynard, A., Wallace, W.A.H., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., MacNee, W., Donaldson, K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3 pp. 423–428
- [44] De Jong W.H., Van Loveren H., eds. *Animal models in immunotoxicology. Methods*, Vol. 41, January 2007
- [45] OECD 429, Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay
- [46] Butz T., Reinert T., Pinheiro T., Moretto P., Pallon J., Kiss A.Z. et al. NANODERM: Quality of skin as barrier to ultra-fine particles QLK4-CT-2002-02678. 2007. http://www.uni-leipzig.de/~nanoderm/Downloads/Nanoderm_Final_Report.pdf
- [47] Monteiro-Riviere N.A., Larese Filon F. Skin. In: *Adverse effects of engineered nanomaterials. Exposure, toxicology and impact on human health.* (Eds. Fadeel, F., Pietroiusti, A. Shvedova, A.A). Chapter 11. Academic Press. London-Waltham-San Diego, 2012
- [48] Monteiro-Riviere N.A., Riviere J.E. Interaction of nanomaterials with skin: aspects of absorption and biodistribution. *Nanotoxicology.* 2009, 3 pp. 288–293
- [49] Sadrieh N., Wokovich A.M., Gopee N.V., Zheng J., Haines D., Parmiter D. et al. Lack of Significant Dermal Penetration of Titanium Dioxide from Sunscreen Formulations Containing Nano- and Submicron-Size TiO₂ Particles. *Toxicol. Sci.* 2010, 115 pp. 156–166
- [50] International Conference on Harmonization 2005, available at http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3_R2/Step4/M3_R2_Guideline.pdf.

- [51] Aggarwal P., Hall J.B., McLeland C.B., Dobrovolskaia M.A., McNeil S.E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61 pp. 428–437
- [52] Dobrovolskaia M.A., Patri A.K., Zheng J., Clogston J.D., Ayub N., Aggarwal P. et al. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine.* 2009, 5 pp. 106–117
- [53] Lacerda S.H., Park J.J., Meuse C., Pristinski D., Becker M.L., Karim A. et al. Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. *ACS Nano.* 2010, 4 pp. 365–379
- [54] Chen F., Castranova V., Shi X.L., Demers L.M. New insights into the role of nuclear factor-kappa B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem.* 2001, 45 pp. 7–17
- [55] Gilmour P.S., Ziesenis A., Morrison E.R., Vickers M.A., Drost E.M., Ford I. et al. Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004, 195 pp. 35–44
- [56] Mitchell L.A., Lauer F.T., Burchiel S.W., McDonald J.D. Mechanism for how inhaled multiwalled carbon nanotubes suppress systemic immune function in mice. *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4 pp. 451–456
- [57] Ryan J.J., Bateman H.R., Stover A., Gomez G., Norton S.K., Zhao W. et al. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response. *J. Immunol.* 2007, 179 pp. 665–672
- [58] Schöler N., Zimmerman E., Katzfey U., Hahn H., Muller R.H., Leisenfeld O. Effect of solid lipid nanoparticles (SLN) on cytokine production and viability of murine peritoneal macrophages. *J. Microencapsul.* 2000, 17 pp. 639–650
- [59] Nel A., Xia T., Madler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 2006, 311 pp. 622–627
- [60] Xia T., Kovochich M., Brant J., Hotze M., Sempf J., Oberley T. et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett.* 2006, 6 pp. 1794–1807
- [61] Lewicka Z.A., Yu W.W., Oliva B.L., Contreras E.Q., Colvin V.L. Photochemical behavior of nanoscale TiO₂ and ZnO sunscreen ingredients. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 2013, 263 pp. 24–33
- [62] Grum-Tokars V., Ratia K., Begaye A., Baker S.C., Mesecar A.D. Evaluating the 3C-like protease activity of SARS-Coronavirus: Recommendations for standardized assays for drug discovery. *Virus.* 2007, 133 pp. 63–73
- [63] Van Maanen J.M., Borm P.J., Knaapen A., van Herwijnen M., Schilderman P.A., Smith K.R. et al. In vitro effects of coal fly ashes: hydroxyl radical generation, iron release, and DNA damage and toxicity in rat lung epithelial cells. *Inhal. Toxicol.* 1999, 11 pp. 1123–1141
- [64] Park M.V.D.Z., Neigh A.M., Vermeulen J.P., De La Fonteyne L.J.J., Verharen H.W., Briede J.J. et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials.* 2011, 32 pp. 9810–9817
- [65] Yang H., Liu C., Yang D., Zhang H., Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J. Appl. Toxicol.* 2009, 29 pp. 69–78
- [66] Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In vitro.* 2005, 19 pp. 975–983

- [67] Carlson C., Hussain S.M., Schrand A.M., Braydisch-Stolle L.K., Hess K.L., Jones R.L. et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B.* 2008, 112 pp. 13608–13619
- [68] Park E.J., Cho J., Park Y.K., Park K. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology.* 2008, 245 pp. 90–100
- [69] Chang C.C., Hwang J.S., Chan C.C., Wang P.Y., Hu T.H., Cheng T.S. Effects of concentrated ambient particle on heart rate, blood pressure, and cardiac contractility in spontaneously hypertensive rats. *Inhal. Toxicol.* 2004, 16 pp. 421–429
- [70] Vallyathan V., Mentnech M.S., Stettler L.E., Dollberg D.D., Green F.H.Y. Mount St. Helens' volcanic ash: hemolytic activity. *Environ. Res.* 1983, 30 pp. 349–360
- [71] Endo M., Koyama S., Matsuda Y., Hayashi T., Kim Y.A. Thrombogenicity and blood coagulation of a microcatheter prepared from carbon nanotube-nylon-based composite. *Nano Lett.* 2005, 5 pp. 101–105
- [72] Helfenstein M., Miragoli M., Rohr S., Mueller L., Wick P., Mohr M. et al. Effects of combustion-derived ultrafine particles, manufactured nanoparticles on heart cells in vitro. *Toxicology.* 2008, 253 pp. 70–78
- [73] Li S.Q., Zhu R.R., Zhu H., Xue M., Sun X.Y., Yao S.D. et al. Nanotoxicity of TiO₂ nanoparticles to erythrocyte in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46 pp. 3626–3631
- [74] Fabian E., Landsiedel R., Ma-Hock L., Wiench K., Wohlleben W., van Ravenzwaay B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch. Toxicol.* 2007, 82 pp. 151–157
- [75] Landsiedel R., Ma-Hock L., Van Ravenzwaay B., Schulz M., Wiench K., Champ S. et al. Gene toxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UV-protection in cosmetic formulations. *Nanotoxicology.* 2010, 4 pp. 364–381
- [76] Warheit D.B., Webb T.R., Colvin V.L., Reed K.L., Sayes C.M. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol. Sci.* 2007, 95 pp. 270–280
- [77] Aisaka Y., Kawaguchi R., Watanabe S. Hemolysis caused by titanium dioxide particles. *Inhal. Toxicol.* 2008, 20 pp. 891–893
- [78] Lin Y.S., Haynes C.L. Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132 pp. 4834–4842
- [79] Rogers E.J., Hsieh S.F., Organti N., Schmidt D., Bello D. A high throughput in vitro analytical approach to screen for oxidative stress potential exerted by nanomaterials using a biologically relevant matrix: human blood serum. *Toxicol. In vitro.* 2008, 22 pp. 1639–1647
- [80] Warheit D.B., Donner E.M. Rationale of genotoxicity testing of nanomaterials: regulatory requirements and appropriateness of available OECD test guidelines. *Nanotoxicology.* 2010, 4 pp. 409–413
- [81] 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
- [82] Magdolenova Z., Collins A., Kumar A., Dhawan A., Stone V., Dusinska M. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology.* 2013; Epub ahead of print

- [83] 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.* 2011, 745 pp. 104–111
- [84] Kumar A., Dhawan A. Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: an update. *Arch. Toxicol.* 2013, 87 pp. 1883–1900
- [85] Karlsson H.L. The comet assay in nanotoxicology research. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 398 pp. 651–666
- [86] OECD TG 471, Bacterial reverse mutation test
- [87] OECD TG 473, In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test
- [88] OECD TG 476, In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test
- [89] OECD TG 487, In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test
- [90] Tsuda H., Xu J., Sakai Y., Futakuchi M., Fukamachi K. Toxicology of engineered nanomaterials – a review of carcinogenic potential. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2009, 10 pp. 975–980
- [91] Nagai H., Toyokuni S. Biopersistent fiber-induced inflammation and carcinogenesis: lessons learned from asbestos toward safety of fibrous nanomaterials. *Arch. Biochem. Biophys.* 2010, 502 pp. 1–7
- [92] Ferin, J. and Oberdorster, G. Translocation of particles from pulmonary alveoli into the interstitium. *Journal of Aerosol Medicine – Deposition Clearance and Effects in the Lung*, 5, 1992, pp. 179-187
- [93] Oberdorster G., Ferin J., Gelein R., Soderholm S.C., Finkelstein J. Role of the alveolar macrophage in lung injury – Studies with ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 1992, 97 pp. 193–199
- [94] Computational Toxicology Research. Tox21, Chemical Testing in the 21st Century, available at <http://epa.gov/ncct/Tox21/>
- [95] Huang S., Wiszniewski L., Constant S., Roggen E. Potential of in vitro reconstituted 3D human airway epithelia (MucilAir™) to assess respiratory sensitizers. *Toxicol. In vitro.* 2013 Apr, 27 (3) pp. 1151–1156
- [96] Ren D., Daines D.A. Use of the EpiAirway model for characterizing long-term host-pathogen interactions. *J. Vis. Exp.* 2011 Sep 2, (55) p. e3261
- [97] Clift M.J., Foster E.J., Vanhecke D., Studer D., Wick P., Gehr P. et al. Investigating the interaction of cellulose nanofibers derived from cotton with a sophisticated 3D human lung cell coculture. *Biomacromolecules.* 2011, 10 pp. 3666–3673
- [98] Alfaro-Moreno E., Nawrot T.S., Vanaudenaerde B.M., Hoylaerts M.F., Vanoirbeek J.A., Nemery B. et al. Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban PM10. *Eur. Respir. J.* 2008, 32 pp. 1184–1194
- [99] Roten-Rutishauser B., Brown D.M., Piallier-Boyles M., Kinloch I.A., Windle A.H., Gehr P. et al. Relating the physicochemical characteristics and dispersion of multiwalled carbon nanotubes in different suspension media to their oxidative reactivity in vitro and inflammation in vivo. *Nanotoxicology.* 2010, 4 pp. 331–342
- [100] Könczöl M., Ebeling S., Goldenberg E., Treude F., Gminski R., Gieré R. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK, and NF-κB. *Chem. Res. Toxicol.* 2011 Sep 19, 24 (9) pp. 1460–1475 Epub 2011 Jul 18. DOI:10.1021/tx200051s

- [101] Diabate S., Mueulhopt S., Paur H.R., Krug H.F. The response of a co-culture lung model to fine and ultrafine particles of incinerator fly ash at the air-liquid interface. *Altern. Lab. Anim.* 2008, 36 pp. 285–298
- [102] Lademann J., Knorr F., Richter H., Blume-Peytavi U., Vogt A., Antoniou C. et al. Hair follicles – an efficient storage and penetration pathway for topically applied substances. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2008, 21 pp. 150–155
- [103] Kiss B., Biro T., Czifra G., Toth B., Kertesz Z., Szikszai Z. et al. Investigation of micronised titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. *Exp. Dermatol.* 2008, 17 pp. 659–667
- [104] OECD TG 428, Skin Absorption: In vitro Method
- [105] Mavon A., Miquel C., Lejeune O., Payre B., Moretto P. In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and mineral sunscreen. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2007, 20 pp. 10–20
- [106] Baroli B., Ennas M., Loffredo F., Isola M., Pinna R., Lopez-Quintela M.A. Penetration of metallic nanoparticles in human Full thickness skin. *J. Invest. Dermatol.* 2007, 127 pp. 1701–1712
- [107] Wissing S., Mueller R. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *J. Control. Release.* 2002, 81 pp. 225–233
- [108] OECD 431, In vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method
- [109] OECD 435, In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion
- [110] OECD 430, In vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER)
- [111] OECD TG 439, In vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method
- [112] Jírová D., Basketter D., Liebsch M., Bendová H., Kejlová K., Marriott M. et al. Comparison of human skin irritation patch test data with in vitro skin irritation assays and animal data. *Contact Dermat.* 2010 Feb, 62 (2) pp. 109–116
- [113] Lee T.L., Raitano J.M., Rennert O.M., Chan S.W., Shan W.Y. Accessing the genomic effects of naked nanocerium in murine neuronal cells. *Nanomedicine.* 2012, 8 pp. 599–608
- [114] Fingerhann I.M., McDaniel L., Zhang X.A., Ratzat W., Hassan T., Jiang Z.F. et al. NCBI Epigenomics: A new public resource for exploring epigenomics data sets. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39 pp. D908–D912
- [115] Roh J., Umh H.N., Sung H.K., Lee B.C., Kim Y. Repression of photomediated morphological changes of silver nanoplates. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2012, 415 pp. 449–453
- [116] Lu W., Tan Y.Z., Jiang X.G. Establishment of coculture model of blood-brain barrier in vitro for nanoparticle's transcytosis and toxicity evaluation. *Yao Xue Xue Bao.* 2006, 41 pp. 296–304
- [117] Myllynen P.K., Loughran M.J., Howard C.V., Sormunen R., Walsh A.A., Vähäkangas K.H. Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta. *Reprod. Toxicol.* 2008, 26 pp. 130–137
- [118] Peters A.K., Wouwer G.V., Weyn B., Verheyen G.R., Vanparys P., Gompel J.V. Automated analysis of contractility in the embryonic stem cell test, a novel approach to assess embryotoxicity. *Toxicol. In vitro.* 2008, 22 pp. 1948–1956

- [119] Sin A., Chin K.C., Jamil M.F., Kosto Y., Rao G., Shuler M.L. The design and fabrication of three-chamber microscale cellculture analog devices with integrated dissolved oxygen sensors. *Biotechnol. Prog.* 2004, 20 pp. 338–345
- [120] Walker G.M., Monteiro-Riviere N., Rouse J., O'Neill A.T. A linear dilution microfluidic device for cytotoxicity assays. *Lab Chip.* 2007, 7 pp. 226–232
- [121] Gottwald E., Giselbrecht S., Augspurger C., Lahni B., Dambrowsky N., Truckenmuller R. et al. A chip-based platform for the in vitro generation of tissues in three-dimensional organization. *Lab Chip.* 2007, 7 pp. 777–785
- [122] Huh D., Matthews B.D., Mammoto A., Montoya-Zavala M., Hsin H.Y., Ingber D.E. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science.* 2010, 328 pp. 1662–1668
- [123] Huh, D., Leslie, D.C., Matthews, B.D., Fraser, J.P., Jurek, S., Hamilton, G.A., Thorneloe, K.S., McAlexander, M.A., Ingber, D.E. A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice. *Sci Transl Med.* 4:159ra147 doi: 10.1126/scitranslmed.3004249. 2012
- [124] Kim H.J., Huh D., Hamilton G., Ingber D.E. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip.* 2012, 21 pp. 2165–2174
- [125] Andreasen E.A., Tanguay R.L., Peterson R.E., Heideman W. Identification of a critical amino acid in the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 2002, 277 pp. 13210–13218
- [126] Haendel M.A., Tilton F., Bailey G.S., Tanguay R.L. Developmental toxicity of the dithiocarbamate pesticide sodium metam in zebrafish. *Toxicol. Sci.* 2004, 81 pp. 390–400
- [127] Harper S.L., Dahl J.L., Maddux B.L.S., Tanguay R.L., Hutchison J.E. Proactively designing nanomaterials to enhance performance and minimize hazard. *International Journal of Nanotechnology.* 2008, 5 pp. 124–142
- [128] Harper S.L., Usenko C., Hutchinson J.E., Maddux B.L.S., Tanguay R.L. In vivo biodistribution and toxicity depends on nanomaterial composition, size, surface functionalization and route of exposure. *Journal of Experimental Nanoscience.* 2008, 3 pp. 195–206
- [129] Lein P., Silbergeld E., Locke P., Goldberg A.M. In vitro and other alternative approaches to developmental neurotoxicity testing (dnt). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2005, 19 (3) pp. 735–744
- [130] Mathew L.K., Andreasen E.A., Tanguay R.L. Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits regenerative growth. *Mol. Pharmacol.* 2006, 69 pp. 257–265
- [131] Saili K.S., Simonich M.T., Tanguay R.L. Developmental Neurobehavioral Toxicity of Bisphenol A: Defining the Role of Estrogen Related Receptor Gamma. *Toxicologist.* 2010, 114 p. 1392
- [132] Tal T.L., Franzosa J.A., Menelaou E., Svoboda K., Tanguay R.L. The Developmental Neurotoxicity of MicroRNAs. *Toxicologist.* 2010, 114 p. 172
- [133] Petersen E.J., Huang Q.G., Weber W.J. Bioaccumulation of radio-labeled carbon nanotubes by *Eisenia foetida*. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42 pp. 3090–3095
- [134] Petersen E.J., Huang Q.G., Weber W.J. Ecological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Health Perspect.* 2008, 116 pp. 496–500

- [135] Warheit D.B., Reed K.L., DeLorme M.P. Embracing a Weight-of Evidence Approach for Establishing NOAELs for Nanoparticle Inhalation Toxicity Studies. *Toxicol. Pathol.* 2013, 41 pp. 387–394
- [136] Silva V.M., Corson N., Elder A., Oberdorster G. The rat ear vein model for investigating in vivo thrombogenicity of ultrafine particles (UFP). *Toxicol. Sci.* 2005, 85 pp. 983–989
- [137] Handy R.D., van den Brink N., Chappel M., Mühling M., Behra R., Dusinska M. et al. Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far? *Ecotoxicology.* 2012, 21 pp. 933–972
- [138] Handy R.D., Cornelis G., Fernandes T., Tsyusko O., Decho A., Sabo-Atwood T. et al. Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: practical experiences and recommendations from the bench. *Environ. Toxicol. Chem.* 2012, 31 pp. 15–31
- [139] OECD 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, 3 days
- [140] OECD 202, Daphnia sp, Acute Immobilisation Test, 2 days
- [141] ISO 10872, *Water quality — Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of Caenorhabditis elegans (Nematoda)*
- [142] ASTM E2172-01, *Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity Tests with the Nematode Caenorhabditis elegans*
- [143] Petersen E.J., Henry T.B. Methodological considerations for testing the ecotoxicity of carbon nanotubes and fullerenes [Review]. *Environ. Toxicol. Chem.* 2012, 31 pp. 60–72
- [144] Insam H. A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: *Microbial Communities: Functional Versus Structural Approaches*, (Insam H., Ranggner A., eds.). Springer-Verlag, Berlin, 1997
- [145] OECD TG 209, Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)
- [146] Petersen E.J., Zhang L.W., Mattison N.T., O'Carroll D.M., Whelton A.J., Uddin N. et al. Potential Release Pathways, Environmental Fate, And Ecological Risks of Carbon Nanotubes. *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45 pp. 9837–9856
- [147] Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ. Health Perspect.* 2004, 112 pp. 1058–1062
- [148] Henry T.B., Menn F.M., Fleming J.T., Wilgus J., Compton R.N., Saylor G.S. Attributing effects of aqueous C60 nano-aggregates to tetrahydrofuran decomposition products in larval zebrafish by assessment of gene expression. *Environ. Health Perspect.* 2007, 115 pp. 1059–1065
- [149] Taurozzi J.S., Hackley V.A., Wiesner M.R. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment – issues and recommendations. *Nanotoxicol.* 2010, 5 pp. 711–729
- [150] Unrine J.M., Hunyadi S.E., Tsyusko O.V., Rao W., Shoults-Wilson W.A., Bertsch P.M. Evidence for Bioavailability of Au Nanoparticles from Soil and Biodistribution within Earthworms (*Eisenia fetida*). *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44 pp. 8308–8313
- [151] Judy J.D., Unrine J.M., Bertsch P.M. Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain. *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45 pp. 776–781
- [152] Lin S.J., Reppert J., Hu Q., Hudson J.S., Reid M.L., Ratnikova T.A. et al. Uptake, Translocation, and Transmission of Carbon Nanomaterials in Rice Plants. *Small.* 2009, 5 pp. 1128–1132

- [153] Unrine J.M., Hunyadi S.E., Tsyusko O.V., Rao W., Shoultz-Wilson W.A., Bertsch P.M. Evidence for Bioavailability of Au Nanoparticles from Soil and Biodistribution within Earthworms (*Eisenia fetida*). *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44 pp. 8308–8313
- [154] Khodakovskaya M.V., de Silva K., Nedosekin D.A., Dervishi E., Biris A.S., Shashkov E.V. et al. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011, 108 pp. 1028–1033
- [155] Jackson B.P., Pace H., Lanzirotti A., Smith R., Ranville J.F. Synchrotron X-ray 2D and 3D elemental imaging of CdSe/ZnS quantum dot nanoparticles in *Daphnia magna*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 394 pp. 911–917
- [156] Ghafari P., St-Denis C.H., Power M.E., Jin X., Tsou V., Mandal H.S. et al. Impact of carbon nanotubes on the ingestion and digestion of bacteria by ciliated protozoa. *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3 pp. 347–351
- [157] Holbrook R.D., Kline C.N., Filliben J.J. Impact of source water quality on multiwall carbon nanotube coagulation. *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44 pp. 1386–1391
- [158] Bouldin J.L., Ingle T.M., Sengupta A., Alexander R., Hannigan R.E., Buchanan R.A. Aqueous toxicity and food chain transfer of quantum Dots (TM) in freshwater algae and *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2008, 27 pp. 1958–1963
- [159] Zhu X.S., Wang J.X., Zhang X.Z., Chang Y., Chen Y.S. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. *Chemosphere.* 2010, 79 pp. 928–933
- [160] Werlin R., Priester J.H., Mielke R.E., Kramer S., Jackson S., Stoimenov P.K. et al. Biomagnification of cadmium selenide quantum dots in a simple experimental microbial food chain. *Nat. Nanotechnol.* 2011, 6 pp. 65–71

Informasi perumus SNI ISO/TR 16197:2014

[1] Komite Teknis Perumusan SNI

Komite Teknis 07-03 Nanoteknologi

[2] Susunan Keanggotaan Komite Teknis Perumusan SNI

Ketua : Haznan Abimanyu
Wakil Ketua : A. Rachman Mustar
Sekretaris : Teguh Prakosa
Anggota : 1) Arief Udhiarto
 2) Dwi Gustiono
 3) Jimmy Pusaka
 4) Oman Zuas
 5) Pudji Untoro
 6) Pudjiatmoko
 7) Rachmat Wijaya
 8) Setyo Purwanto

[3] Konseptor Rancangan SNI

- Rachmat Wijaya
- Dwi Gustiono

[4] Sekretariat Pengelola Komite Teknis Perumusan SNI

Direktorat Pengembangan Standar Mekanika, Energi, Infrastruktur dan Teknologi Informasi
Badan Standardisasi Nasional