جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



# مروری بر روشهای ارزیابی سمیت مواد شیمیایی، گذار از روشهای اینویوو به روشهای نوین اینویترو

شهناز باکند[۱]، احمد عامری[۲]، علی اصغر فرشاد[۳]

## چکیده

تماس با مواد و آلاینده‌های شیمیایی یکی از عوامل مهم در به خطر افتادن سلامتی افراد می‌باشد. علی‌رغم پیشرفت گسترده در زمینه ارزیابی خطر مواد شیمیایی، اطلاعات سم‌شناسی، خصوصاً در زمینه مواد شیمیایی صنعتی بسیار محدود می‌باشد. امروزه بیش از ۸۰۰۰۰ ماده شیمیایی با مصارف تجارتی و تعداد بسیار زیادی ترکیبات شیمیایی وجود دارد. ارزیابی خطرات سمی این مواد با استفاده از مطالعات حیوانی بدلایل مختلف علمی، اقتصادی و اخلاقی مقدور نمی‌باشد. بنابراین، با افزایش روزافزون مواد شیمیایی، ترکیبات و فرآورده‌های جدید ضرورت استفاده از روشهای نوین در سم شناسی که بتواند جایگزین مطالعات حیوانی شود ضرورت بیشتری یافته‌است. تحقیقات اخیر نشان داده‌است که روشهای نوین سم شناسی از جمله روشهای اینویترو دارای قابلیت زیادی در اندازه‌گیری و ارزیابی سمیت مواد شیمیایی بوده و قادر هستند اطلاعات وسیعی را در مدت زمان کوتاهتری فراهم نمایند. در این مطالعه، مروری بر روشهای متداول در ارزیابی سمیت مواد شیمیایی انجام شده و قابلیت روشهای سم شناسی اینویترو در این زمینه مورد بحث و بررسی قرار گرفته است. با وجودیکه روشهای سم شناسی اینویترو نمیتوانند دقیقاً نمایانگر پیچیدگی موجود در یک ارگانیسم زنده باشند، این روشها به همراه دانش مربوط به ساختار مولکولی و سمیت مواد (QSARs) و توکسیکوکینتیک مواد شیمیایی (PBTK) قابلیت این را دارند که بطور گسترده ای در ارزیابی خطر تماس با مواد شیمیایی بکار گرفته شوند.

**کلید واژه‌ها :** آلاینده‌های شیمیایی، ارزیابی خطر، سم شناسی، اینویترو، اینویوو

## مقدمه

گر چه رشد روز افزون در سنتز مواد و فرآورده‌های شیمیایی مانند مواد دارویی، حشره‌کش‌ها و محصولات خانگی کیفیت زندگی انسان را بهبود بخشیده است، تماس با تعداد بیشمار مواد شیمیایی و سنتز شده سلامت انسان و محیط را به مخاطره انداخته است. تماس با مواد شیمیایی در محیطهای کار و محیطهای آزاد یکی از عوامل مهم در به خطر افتادن سلامتی افراد بوده و می‌تواند طیف وسیعی از مشکلات تنفسی، ناراحتیهای پوستی و بیماریهای سیستمیک را ایجاد نماید (۱،۲،۳). در حالیکه ارزیابی سمیت مواد شیمیایی مستلزم داشتن اطلاعات سم شناسی میباشد، در بسیاری از موارد، خصوصاً در مورد مواد شیمیایی صنعتی، دسترسی به این اطلاعات بسیار محدود می‌باشد (۴،۵،۶). روشهای قدیمی و متداول اندازه‌گیری سمیت مواد شیمیایی مبتنی بر استفاده از مطالعات حیوانی می‌باشد. علاوه بر دلایل اخلاقی، استفاده بیش از حد از اطلاعات حیوانی در سم شناسی مورد انتقاد مجامع علمی قرار گرفته است (۷،۸).

امروزه بیش از ۸۰،۰۰۰ ماده شیمیایی با مصارف تجارتی و تعداد بسیار زیادی ترکیبات شیمیایی وجود دارد (۹) بطوریکه ارزیابی خطرات سمی این مواد با استفاده از مطالعات حیوانی مقدور نمی‌باشد. بنابراین، با افزایش روزافزون مواد شیمیایی، ترکیبات و فرآورده‌های جدید ضرورت استفاده از روشهای نوین در سم شناسی که بتواند جایگزین مطالعات حیوانی شود ضرورت بیشتری یافته‌است. امروزه روشهای نوین سم شناسی از جمله روشهای اینویترو (*In vitro*) قادر

۱- (نویسنده مسئول)، استادیار دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی ایران (email: bakand183@yahoo.com)
۲- عضو هیات علمی گروه بهداشت حرفه ای دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی ایران
۳- دانشیار گروه بهداشت حرفه ای دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی ایران

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



هستند اطلاعات وسیعی را در زمان کوتاهتری فراهم نمایند. با این وجود در تدوین دستورالعملهای استاندارد هنوز هم در جایگزین نمودن این روشها با احتیاط عمل می‌شود. در این مطالعه، مروری بر روشهای متداول در ارزیابی سمیت مواد شیمیایی صورت گرفته و قابلیتهای روشهای سم‌شناسی اینویترو در ارزیابی سمیت مواد شیمیایی مورد بررسی قرار گرفته است.

## روش بررسی

با وجودیکه اطلاعات بدست آمده از مطالعات انسانی در ارزیابی اثرات سمی مواد و آلاینده‌های شیمیایی بسیار ارزشمند می‌باشند، اطلاعات انسانی همواره موجود و در دسترس نمی‌باشند. به علاوه، تجربیات ناخوشایند گذشته انسان مانند تماس با مواد دارویی چون تالیدومید و یا مواد صنعتی و آلاینده‌هایی نظیر آزبست، سرب و بی فنیل های پلی کلرینه (PCBs) ثابت نموده است که اثرات مواد شیمیایی و فرآورده های جدید باید به موقع و پیش از بروز عوارض نامطلوب بر انسان مشخص گردد (۱۰).

بنابراین، به عنوان یک استراتژی مهم در پیشگیری، ایجاد و ارتقاء روشهای نوین در سم شناسی که بتوانند اطلاعات ضروری را در شناسایی خطرات مواد شیمیایی فراهم نموده واز نظر زمان و هزینه نیز مقرون بصرفه باشند از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. هیچ روشی به تنهایی نمی‌تواند تأمین کننده اطلاعات کامل سم شناسی در زمینه شناسایی مواد شیمیایی و ارزیابی اثرات آنها بر روی انسان باشد (۱۱). بطور کلی، این اطلاعات با استفاده از روشهای مختلف نظیر مطالعات سم شناسی، اپیدمیولوژیکی، ارتباط ساختار مولکولی و سمیت مواد (Quantitative structure activity relationships; QSARs) و روشهای توکسیکوکینتیک (toxicokinetics; PBTK; Physiologically based) قابل حصول می‌باشد.

از سالیان گذشته مطالعات سم شناسی نقش مهمی را در فراهم نمودن اطلاعات سمیت مواد شیمیایی داشته است. سم شناسی (Toxicology) علم شناسایی مواد سمی، یا بطور دقیقتر، مطالعه اثرات نامطلوب مواد شیمیایی بر روی سیستمهای بیولوژیکی می‌باشد. امروزه در سم شناسی از ارزیابی ریسک (Assessment Risk) به عنوان یک روش سیستماتیک و علمی برای شناسایی و اندازه‌گیری پتانسیل خطر مواد شیمیایی استفاده می‌شود (۱۲). سم شناسی دانشی است که پیوسته در حال تحول بوده، بطوریکه در سم شناسی مدرن پاسخهای سلولی و مولکولی به عنوان نشانگرهای اولیه در تماس با مواد شیمیایی خارجی مورد بررسی قرار می‌گیرد. امروزه روشهای سم‌شناسی اینویترو، با استفاده از تکنیکهای کشت سلول به همراه دانش مربوط به ساختار مولکولی و سمیت مواد و روشهای توکسیکوکینتیک در سم شناسی مدرن ارتقا یافته و بکار گرفته میشوند. پیشرفتهای علم سم شناسی ناشی از گسترش دانش و ارتقاء تکنیکهای آزمایشگاهی در زمینه علوم مختلف مانند بیولوژی، شیمی، ریاضی و فیزیک می‌باشد. سم شناسی علمی با دامنه های بسیار وسیع از نظر دیسیپلین، کاربردها و روشها می‌باشد. از نقطه نظر متدولوژیکی سم‌شناسی از مطالعات حیوانی یا اینویو تا روشهای نوین اینویترو متفاوت می‌باشد.

### مطالعات حیوانی یا روشهای اینویوو (*In vivo*)

روشهای قدیمی سم شناسی مبتنی بر مطالعه اثرات مواد سمی بر روی حیوانات آزمایشگاهی بوده و بطور کلی بر این فرض استوار است که یک ماده شیمیایی اگر قادر به ایجاد اثرات سمی بر روی حیوانات آزمایشگاهی باشد می‌تواند همان اثرات یا اثرات مشابهی را روی انسان نیز ایجاد نماید. بنابراین می‌توان اطلاعات بدست آمده روی حیوانات را با روشهای مختلف برای انسان برون یابی نموده و تعمیم داد. اینگونه مطالعات برای اولین بار در سال ۱۹۲۷ توسط فردی به نام تروان (Trevan) آغاز شد. وی برای اولین بار تست $LD_{50}$ (Lethal Dose %۵۰) را معرفی نمود (۱۳).

دوز کشنده یا $LD_{50}$ عبارتست از غلظتی از یک ماده شیمیایی است که قادر است ۵۰٪ از حیوانات در معرض تماس را بکشد. از آنجا که این تست می‌تواند اطلاعات مفیدی را از سمیت یک ماده بدست دهد این آزمایش معمولاً در مورد مواد شیمیایی جدید انجام می‌گیرد. این تست شامل تجویز دوزهای متفاوت و فزاینده یک ماده شیمیایی به حیوانات آزمایشگاهی بوده و در نهایت دوزی که قادر است ۵۰٪ از حیوانات مورد مطالعه را بکشد تعیین می‌گردد (۱۴). در گزارش نمودن $LD_{50}$ معمولاً باید راه تماس (خوراکی یا پوستی) حیوان مورد مطالعه و واحد اندازه‌گیری دوز (معمولاً mg/kg وزن بدن) مشخص گردد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



به همین ترتیب، به منظور شناسایی اثرات سمی آلاینده های هوا، باید تستهای سمیت از راه استنشاقی روی حیوانات صورت گیرد. بدین منظور حیوانات مورد آزمایش درتماس با غلظتهای متفاوت ماده شیمیایی قرار داده‌شده و پس از استنشاق هوای آلوده، غلظتی که موجب مرگ و میر ۵۰ ٪ از آنها می شود را تحت عنوان غلظت کشنده یا $LC_{50}$ (Lethal Dose %۵۰) مشخص می نمایند.

اطلاعات بدست آمده از اینگونه مطالعات معمولاً برای طبقه بندی، برچسب گذاری و ارزیابی ریسک مواد شیمیایی بکار برده میشود. اخیراً، یک سیستم جهانی هماهنگ (GHS)، بر اساس سمیت حاد مواد شیمیایی، برای طبقه‌بندی مواد شیمیایی ارائه شده است (۱۵). در این سیستم، بر حسب مقادیر $LD_{50}$ یا $LC_{50}$ ، معیارهایی برای طبقه بندی مواد شیمیایی در پنج گروه مختلف تعیین گردیده است (جدول ۱). به کارگیری سیستم طبقه بندی GHS موجب ارتقاء سطح سلامت انسان و محیط خواهد شد.

درسالهای اخیر مطالعات حیوانی، خصوصاً استفاده از تستهایی نظیر $LD_{50}$، بدلایل مختلف علمی، اخلاقی و اقتصادی مورد انتقاد قرار گرفته و جوابگوی تعداد بیشمار مواد و ترکیبات شیمیایی نمی باشند. به همین دلیل سازمان ارتقاء اقتصاد و تعاون (OECD) ۳ روش جدید را برای جایگزین کردن روش قدیمی سمیت حاد از راه خوراکی [۴۰۱] و به منظور کاهش تعداد حیوانات برای تست یک ماده شیمیایی ارائه نموده است (OECD, 2001a). این روشها شامل روش دوز ثابت [۴۲۰]، روش سمیت حاد [۴۲۳] و روش بالا و پائین [۴۲۵] میباشد.

استفاده بیش از حد از اطلاعات حیوانی در مطالعات سم شناسی توسط جوامع علمی مورد انتقاد قرار گرفته است. پیش بینی عملکرد بیولوژیکی ماده سمی در بدن انسان با استناد به اطلاعات حیوانی همواره با یک سری فاکتورهای عدم اطمینان همراه می باشد که ناشی از تفاوتهای بیولوژیکی میان انسان و حیوان می‌باشد (۷). علاوه بر این، اعتبار برون‌یابی از دوز یا غلظتهای بالا به غلظتهای واقعی و پایین تماس، خصوصاً در مواردیکه این برون یابی توسط اطلاعات مربوط به مکانیسم سمیت حمایت نشده‌اند مورد سؤال واقع می شوند (۱۶). گرچه شدت یک اثر سمی معمولاً متناسب است با میزان تماس، اختلافات بیولوژیکی بین دوزهای بالا و پایین باید مورد توجه قرار گیرند. از گذشته سم شناسان سعی کرده‌اند که با بکارگیری فاکتورهای عدم اطمینان (Uncertainty factors) در تدوین استانداردهای مواد شیمیایی تا حدودی بر این مشکلات فایق آیند (۱۲،۱۶).

### روشهای سم شناسی اینویترو (*In vitro*)

از اواسط دهه ۱۹۸۰ روشهای سم شناسی حیوانی بتدریج جای خود را به روشهای نوین سم شناسی از جمله روشهای اینویترو داد (۱۷). در این روشها با استفاده از بکارگیری روشهای بیوتکنولوژی و استفاده از کشت سلول، بافت یا ارگان اثرات سمی مواد شیمیایی مورد مطالعه قرار می‌گیرد. بطور کلی در تکنیک کشت سلول شرایط طوری فراهم می شود که سلول یا بافت بتواند خارج از بدن زنده مانده، رشد نموده و عملکرد طبیعی خود را نیز حفظ نماید. این شرایط آزمایشگاهی اوایل در شیشه یا لوله آزمایش و اخیراً در پلاستیک یا فلاسکهای کشت سلول ایجاد می‌گردد. به کاربرد روشهای کشت سلول در مطالعات سم شناسی روشهای اینویترو گفته میشود. به موازات گسترش روشهای کشت سلول طی دو دهه گذشته روشهای سم شناسی اینویترو نیز گسترش و کاربرد روزافزون پیدا کرده است (۱۱،۱۸). گذشته از پیشرفتهای علمی، عوامل دیگری نظیر جلوگیری از آزار و اذیت حیوانات بمنظور حمایت از آنها، افزایش روز

| نحوه تماس | | طبقه بندی ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | خوراکی mg/kg | ۵ | ۵۰ | ۳۰۰ | ۲۰۰۰ | ۵۰۰۰ |
| | پوستی mg/kg | ۵۰ | ۲۰۰ | ۱۰۰۰ | ۲۰۰۰ | N/A |
| استنشاقی | گازها (ppm) | ۱۰۰ | ۵۰۰ | ۲۵۰۰ | ۵۰۰۰ | N/A |
| | بخارات (mg/l) | ۰/۵ | ۲/۰ | ۱۰ | ۲۰ | N/A |
| | گردوغبار / میست (mg/l) | ۰/۰۵ | ۰/۵ | ۱/۰ | ۵ | N/A |

Not Applicable = N/A

جدول ۱- سیستم GHS برای طبقه‌بندی سمیت حاد مواد شیمیایی

افزون استفاده از مواد شیمیایی و لزوم ارزیابی خطرات این مواد از عوامل مؤثر در گسترش روشهای اینویترو بوده است.

در سال ۱۹۵۹ دو دانشمند انگلیسی به نامهای راسل و برچ (Russel & Bruch) اصولی را تحت عنوان 3Rs مطرح نمودند که پایه‌ای برای تجدید نظر در بکارگیری حیوانات آزمایشگاهی در مطالعات و تحقیقات آزمایشگاهی بود (۱۹). این اصول عبارتند از کاهش تعداد حیوانات در تحقیقات آزمایشگاهی (Reduction)، تصفیه (Refinement) و تجدید نظر دستورالعملها به منظور کاهش آزار و اذیت حیوانات و جایگزینی (Replacement) مطالعات حیوانی با سایر روشها از جمله روشهای اینویترو می‌باشد. در ابتدا اصول معرفی شده توسط این دو دانشمند مورد توجه قرار نگرفت ولی با گسترش تشکلات حمایت از حیوانات در اواسط دهه ۱۹۷۰ استفاده از مطالعات حیوانی بدلایل اخلاقی مورد انتقاد قرار گرفت و اهمیت توجه به اصول 3Rs بیش از پیش مشخص گردید.

بطور کلی گسترش روشهای اینویترو تحت تأثیر عوامل مختلفی بوده است که بدون شک حرکتهای اجتماعی به منظور حمایت از حیوانات یکی از عوامل موثر در این زمینه بوده است. عامل دیگر افزایش روزافزون تعداد مواد شیمیایی و فرآورده‌های جدید و لزوم ارزیابی ریسک این مواد می‌باشد. سالیانه هزاران ماده شیمیایی مختلف مانند مواد آرایشی، دارویی، حشره‌کشها، مواد مصرفی وارد بازار مصرف می‌شوند. با در نظر گرفتن حدود ۸۰,۰۰۰ ماده شیمیایی تجاری (۹) و همچنین تعداد بسیار زیاد مواد شیمیایی ترکیبی و تماس با آلاینده‌های توام، ارزیابی سمیت این تعداد با استفاده از مطالعات حیوانی مقدور نبوده و مستلزم آزمایشات بسیار پرهزینه، زمان بر و در بسیاری موارد غیر اخلاقی روی حیوانات آزمایشگاهی می‌باشد. بسیاری از مواد شیمیایی تنها بدلیل هزینه‌ی بسیار بالایی که مطالعات حیوانی در بر دارد هیچگاه مورد آزمایش قرار نگرفته‌اند (۲۰). ضرورت تعیین پتانسیل اثرات سمی این تعداد بیشمار مواد نیاز به ارتقای روشهای نوین سم شناسی را بیش از پیش مشخص می‌نماید.

**آزمایشات سم شناسی اینویترو**

تماس با مواد شیمیایی می‌تواند موجب آسیبهای گوناگون در سطوح مختلف مولکولی، سلولی، بافت و ارگان شده و عملکرد آنها را تحت تأثیر قرار دهد. سمیت سلولی عبارت از اثرات سوء ناشی از یک ماده شیمیایی در ساختار یا فرآیندهای لازم برای ابقاء، رشد و عملکرد سلولی می‌باشد (۲۱). آزمایشات مختلفی برای ارزیابی پتانسیل سمیت مواد شیمیایی با استفاده از روشهای اینویترو بوجود آمده است که با استفاده از هر یک می‌توان شاخصهای مختلفی را اندازه‌گیری نمود (جدول ۲)، (۸،۲۲).

در سالهای اخیر، تحقیقات در زمینه مرگ برنامه ریزی شده (Apoptosis) بطور شگرفی دانش انسان را در زمینه مرگ سلولی متحول نموده که نهایتاً منجر به ارتقاء شاخصهای سم شناسی مبتنی بر مکانیسم سمیت گردیده است. بسیاری از تغییرات ساختاری و بیولوژیکی که ممکن است در سطح غشاء سلولی، پروتئآزهای بخصوص و DNA اتفاق بیفتد می‌تواند به عنوان شاخصهای بیولوژیکی برای اندازه‌گیری آپوپتوزیس مورد استفاده قرار گیرد (۲۳،۲۴).

**کاربرد روشهای سم شناسی اینویترو**

در ابتدا روشهای اینویترو برای مطالعه مکانیسم عمل مواد شیمیایی در سطح سلولی و مولکولی بوجود آمدند (۲۵). به مرور، این روشها در سایر فیلدها نظیر بیولوژی کانسر، کشف داروها و سم شناسی نیز بکار گرفته شدند. در سم شناسی اولین بار برای شناسایی خواص جهش زایی مواد شیمیایی از روشهای اینویترو استفاده شد (۲۶،۲۷). در حال حاضر روشهای اینویترو شامل طیف وسیعی بوده که می‌تواند برای مطالعه سمیت حاد موضعی و سیستمیک مواد بکار رود. سمیت سلولی، تولید مثل، جهش زایی، تست تحریک پذیری، ایمونولوژی و سمیت ارگان هدف، اصلی‌ترین قلمروهای سم شناسی اینویترو می‌باشند (۲۸).

کاربرد روشهای اینویترو با یک سری محدودیتها و مشکلات نیز توام می‌باشد. یکی از محدودیتها این است که سلولهای کشت داده شده سیستمهای زنده بسیار ساده‌ای هستند که نمی‌توانند بطور کامل پیچیدگی موجود در یک ارگانیسم زنده را نشان دهند. بدلیل فقدان مسیر بیوترانسفورماسیون یک سیستم اینویترو نمی‌تواند بطور دقیق بیودینامیک موجود در بدن انسان را تقلید نماید. به هر حال، به کارگیری ابزارهای پیش بینی

کننده مانند روشهای توکسیکوکینتیک با اتکا به دانش ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excerption) یعنی اطلاع از مراحل جذب، انتشار، متابولیسم و دفع می‌تواند به برون یابی نتایج اینویترو کمک نماید(۸،۲۵). استفاده از روشهای QSARs با توجه به ساختار مولکولی مواد شیمیایی نیز گاهی میتواند اطلاعات مفیدی را در ارزیابی پتانسیل سمیت مواد بدست دهد.

روشهای سم شناسی اینویترو در مقایسه با روشهای قدیمی مطالعات حیوانی دارای قابلیتهای زیر می‌باشند (۸):

– در این روشها در صورت بکارگیری سلولها و بافتهای انسانی نیازی به برون یابی از حیوان به انسان (Inter-species extrapolation) نبوده، بنا بر این میتواند اطلاعات واقعی تری برای ارزیابی خطر مواد شیمیایی بدست دهد.

- نسبتا ساده‌تر بوده و در مدت زمان کمتری انجام می‌گیرند.

- از نظر اقتصادی بیشتر مقرون به صرفه هستند.

- برای مطالعه مکانیسم های سم شناسی مناسب می‌باشند.

- برای مطالعه سمیت توام مواد شیمیایی (Chemical mixture toxicity) دارای قابلیت بسیار زیادی میباشند.

با توجه به قابلیتهای فوق روشهای سم شناسی اینویترو کاربردهای بسیار گسترده‌ای داشته و می‌توانند در غربالگری مواد (Screening) درجه بندی سمیت مواد شیمیایی (Toxicity ranking) و بطور کلی در ارزیابی ریسک (Risk assessment) مواد شیمیایی و فرآورده های مختلف بکارگرفته شوند. این روشها قابلیت

| شاخص بیولوژیک | روش شناسایی |
|---|---|
| مرفولوژی سلول | شکل و اندازه سلول |
| | تماس سلولها |
| | تعداد هسته، اندازه، شکل و محتویات آن |
| | واکولاسیون هسته و سیتوپلاسم |
| حیات سلول | برون داری رنگ تریپن آبی |
| | آبشام دی استیل فلورسین |
| | شمارش سلول |
| | راندمان کشت مجدد |
| متابولیسم سلول | یکپارچگی میتوکندری (آزمایشات نمک تترازولیوم مانند MTT, MTS , XTT) |
| | فعالیت لیزوزوم و دستگاه گلژی (آبشام رنگ قرمز خنثی) |
| | کاهش فعال کننده ها (مانند میزان ATP) |
| نشت از غشاء سلول | از دست رفتن آنزیمها (مانند LDH)، یونها یا فعال کننده ها (مانند $Ca^{2+}$, $K^{+}$, NADPH ) |
| | نشت مارکرهای نشان گذاری شده (مانند کروم $^{51}$ یا فلورسین) |
| تکثیر سلول | شمارش سلول |
| | میزان پروتئین کل (مانند متیلن آبی، کومازی آبی و کناسیک آبی) |
| | میزان DNA (مانند Hoechst 33342) |
| | تشکیل کلونی |
| چسبیدگی سلول | چسبیدگی به سطح کشت |
| | جدایی از سطح کشت |
| | چسبیدگی سلول با سلول |
| الحاق رادیوایزوتوپها | الحاق تیمیدین به DNA |
| | الحاق یوریدین به DNA |
| | الحاق آمینواسیدها به پروتئین ها |

جدول ۲- شاخصهای بیولوژیکی متداول قابل اندازه‌گیری با استفاده از روشهای اینویترو

MTT, MTS, XTT, Tetrazolium salt assays; ATP, Adenosine Triphosphate; LDH, Lactate Dehydrogenaze; NADPH, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate.

کاربرد در زمینه تست مواد مختلف نظیر مواد صنعتی (Industrial chemicals)، دارویی (Pharmaceuticals)، مصرفی (Consumer products)، آرایشی (Cosmetics)، آلاینده های محیط کار (Workplace contaminants)، مخلوط آلاینده ها( Chemical mixtures) و آلاینده های محیطی( Environmental contaminants) را دارا می‌باشند(۲۲، ۸). علاوه بر این در سم شناسی محیط و حرفه ای می‌توان از بیو مارکرها به عنوان وسیله ای برای پیشگیری، از طریق پایش بیولوژیکی مسیر میان تماس و ایجاد اثر استفاده نمود.

با وجودیکه تاکنون اطلاعات وسیعی از مطالعات حیوانی در مورد سمیت مواد شیمیایی حاصل شده است، اکثر این اطلاعات مربوط به تماس از راههای خوراکی یا پوستی بوده و اطلاعات مربوط به تماس از طریقه استنشاقی بسیار اندک می‌باشد (۵). دلیل اصلی این محدودیت این است که بطورکلی مطالعات استنشاقی از نظر تکنیکی به مراتب پیچیده‌تر و پرهزینه‌تر می‌باشند. علی رغم این مشکلات، تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که روشهای سم شناسی اینویترو می‌توانند نقش بسیار مهمی در ارزیابی سمیت مواد شیمیایی هوابرد و آلاینده های هوا داشته باشند (۳۵-۲۹). به منظور شناسایی قابلیت روشهای اینویترو در این زمینه، روشهای ارتقا یافته برای ارزیابی سمیت آلاینده های هوا مورد بررسی قرار گرفته است .(۲۲، ۸)

## نتیجه گیری

تماس با تعداد فزاینده مواد وآلاینده های شیمیایی در محیطهای کار و محیطهای آزاد یکی از عوامل مهم در به خطر افتادن سلامتی افراد بوده و می‌تواند طیف وسیعی از مشکلات تنفسی، ناراحتیهای پوستی و بیماریهای سیستمیک را ایجاد نماید. در حالیکه ارزیابی سمیت مواد شیمیایی مستلزم داشتن اطلاعات سم شناسی میباشد، در بسیاری از موارد، خصوصاً در مورد مواد شیمیایی صنعتی، دسترسی به این اطلاعات بسیار محدود می‌باشد (۴،۶). علاوه بر این، امروزه گذشته از دلایل اخلاقی و اقتصادی استفاده بیش از حد از اطلاعات حیوانی در سم شناسی مورد انتقاد مجامع علمی قرار گرفته است. ضرورت تعیین پتانسیل اثرات سمی تعداد بیشمار مواد شیمیایی نیاز به ارتقای روشهای نوین سم شناسی را بیش از پیش مشخص می‌نماید.

روشهای نوین سم شناسی از جمله روشهای اینویترو قادر هستند اطلاعات وسیعی را در مدت زمان کوتاهتری فراهم نمایند. با وجودیکه روشهای سم شناسی اینویترو نمیتوانند دقیقاً نمایانگر پیچیدگی موجود در یک ارگانیسم زنده باشند، این روشها به همراه دانش مربوط به ساختار مولکولی و سمیت مواد (QSARs) و توکسیکوکینتیک مواد شیمیایی (PBTK) قابلیت این را دارند که بطور گسترده‌ای در ارزیابی خطر تماس با مواد شیمیایی بکار گرفته شوند. همچنین بکارگیری روشهای توکسیکوکینتیک می‌تواند یک پایه علمی برای برون یابی غلظتهای اینویترو با قابلیت ایجاد سمیت سلولی به دوزهای معادل در شرایط اینویوو را فراهم آورد.

## منابع


1. Klaassen, C.D., editor. Casarett and Doull's oxicology: the Basic Science of Poisons, sixth edition. Mc Graw-Hill, New York. 2001.

2. Greenberg, M.I., Hamilton, R.J., Phillips, S.D., McCluskey, G.J., editors. Occupational, Industrial, and Environmental Toxicology, 2ed. Mosby, Inc, Philadelphia, Pennsylvania. 2003.

3. Winder, C., Stacey, N.H., editors. Occupational Toxicology, 2 ed. CRC Press, Boca Raton. 2004.

4. NTP. Toxicology Testing Strategies to Determine Needs and Priorities. National Toxicology Program, National Research Council, Washington. 1984.

5. Agrawal, M.R., Winder, C. The frequency and occurence of LD50 values for materials in the workplace. Journal of Applied Toxicology, 1996.

6. EPA, Chemical Hazard Availability Study. US Environmental Protection Agency, Office of Pollution Prevention and Toxics, Washington DC. 1998.

7. Blaauboer, B.J., The applicability of in vitro-derived data in hazard identification and characterisation of chemicals. Environmental Toxicology and Pharmacology 11: 213-225, 2002.

8. Bakand, S., Winder, C., Khalil, C. and Hayes, A., Toxicity assessment of industrial chemicals and airborne contaminants; transition from in vivo to in vitro test methods: A Review. Inhalation Toxicology, 17: 13, 775-787, 2005.

9. NTP, The National Toxicology Program Annual Plan Fiscal Year 2001. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, NIH publication No. 02-5092, Washington. 2001.

22. Hayes, A., Bakand, S. and Winder, C.. Novel in vitro exposure techniques for toxicity testing and biomonitoring of airborne contaminants. In: Drug Testing In Vitro-Breakthroughs and Trends in Cell Culture Technology, Marx, U. and Sandig, V. (Eds). Wiley-VCH, Berlin, Part 1: Emerging in vitro culture technologies, Chapter 4, 103-124. 2007.

10. Greenberg, M. I. and Phillips, S. D., A brief history of Occupational, Industrial and Environmental Toxicology. In: Occupational, Industrial and Environmental Toxicology. 2ed. Greenberg, M. I., Hamilton, R. J. and Phillips, S. D. (Eds).. Philadelphia, Pennsylvania, Mosby, Inc. 2003. pp. 2-5

11. Barile, F.A. Introduction to in vitro Cytotoxicity, Mechanisms and Methods. CRC Press, Boca Raton. 1994.

12. Faustman, E.M., Omenn, G.S. Risk Assessment. In: Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons, sixth edition. Klaassen, C.D., editor. McGraw-Hill, New York, pp 83-104.

13. Trevan, J.W. Error of determination of toxicity. Proceedings of the Royal Society of London, Series B 101: 483-514. 1927.

14. OECD. Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Organisation for Economic and Cooperative Development, Paris. 2001.

15. UN, Globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GHS). New York, United Nations. 2003.

16. Eisenbrand, G., Pool- Zobel, B. P., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J. C., Pieters, R. and Kleiner, J., 2002. Methods of in vitro toxicology. Food Chem. Toxicol., 40:2-3, 193-236. 2003.

17. Silbergeld, E. K. Toxicology. In: Encyclopaedia of occupational health and safety. Fourth edition. Stellman, J. M. (Ed). Geneva, International labour office. 1998. pp. 33.1-33.74.

18. Gad, S. C. In Vitro Toxicology. New York, Taylor and Francis. 2000.

19. Russell, V. M. S. and Burch, R. L. The Principles of Humane Experimental Techniques. Methuen & Co. Ltd, London. 1959.

20. Marchant, G. E., Genetics and the future of environmental policy. In: Environmentalism and the Technologies of Tomorrow, Shaping the Next Industrial Revolution. Olson, R. and Rejeski, D. (Eds). Island Press, Washington, pp. 61-70. 2005.

21. Ekwall, B. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. Annals of the New York Academy of Sciences, 407:1, 64-77. 1983.

23. Zucco, F., De Angelis, I., Testai, E., Stammati, A., Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. Toxicology In Vitro 18: 153-163. 2004.

24. Wilson, A.P., Cytotoxicity and viability assays. In: Animal Cell Culture, third edition. Masters, J.R.W., editor. Oxford University Press, NY, pp 175-219. 2000.

25. Frazier, J.M. In Vitro Toxicity Testing Applications to Safety Evaluation. Marcel Dekker, Inc, New York.1992.

26. Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D. Carcinogens are mutagens. Simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 70: 2281-2285. 1973.

27. Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research 31: 347-363. 1975.

28. O'Hare, S., Atterwill, C.K. 1995. Methods in Molecular Biology: In vitro Toxicity Testing Protocols. Humana Press, New Jersey.

29. Bakand, S., Hayes, A.J., Winder, C., Khalil, C. Markovic, B. In vitro cytotoxicity testing of airborne formaldehyde collected in serum free culture media. Toxi Indus Health, 21: 7-8, 147-154. 2005.

30. Bakand, S. Winder, C., Khalil, C. and Hayes, A. A novel in vitro exposure technique for toxicity assessment of volatile organic compounds. Journal of Environmental Monitoring, 8: 1, 100-105. 2006.

31. Bakand, S., Winder, C. Khalil, C. and Hayes, A. An experimental in vitro model for dynamic direct exposure of human cells to airborne contaminants. Toxicology Letters, 165: 1, 1-10. 2006.

32. Bakand, S., Hayes, A. and Winder, C. Comparative in vitro cytotoxicity assessment in human alveolar epithelial cells. Toxicology In Vitro, 21: 7, 1341-1347, 2007.

33. Bakand, S., Hayes, A. and Winder, C. An integrated in vitro approach for toxicity testing of airborne contaminants. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 70:1604-1612, 2007.

34. Bakand, S., Hayes, A. and Winder, C. A new approach for testing airborne pollutants. Environmental Health Perspectives. 115: 3, A149-151. 2007.

35. Aufderheide, M., Knebel, J.W., Ritter, D. Novel approaches for studying pulmonary toxicity in vitro. Toxicology Letters 140-141: 205-211, 2003