



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران

Iran National Standards Organization



استاندارد ملی ایران
۱۱۰۵۰
چاپ اول
۱۴۰۱

INSO

11050

1st Edition

2023

Identical with
ISO/TS 21633: 2021

فناوری نانو- فناوری امیدانس
(رهبندی) بدون برچسب برای ارزیابی
برون تنی سمیت نانومواد

**Nanotechnologies- Label-free
impedance technology to assess the
toxicity of nanomaterials
in vitro**

ICS: 07.120; 07.080

استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۵۰ (چاپ اول): سال ۱۴۰۱

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک

صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۳۹ تهران - ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۱۰۳ و ۸۸۸۸۷۰۸۰

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۳۱۵۸۵-۱۶۳ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@inso.gov.ir

وبگاه: <http://www.inso.gov.ir>

Iran National Standards Organization (INSO)

No. 2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@inso.gov.ir

Website: <http://www.inso.gov.ir>

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک ماده ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادهای سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)^۱، کمیسیون بین‌المللی الکتروروشن (IEC)^۲ و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استانداردهای کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سامانه‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization

2- International Electrotechnical Commission

3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)

4- Contact point

5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«فناوری نانو - فناوری امیدانس (رهبندی) بدون برچسب برای ارزیابی برون تنی سمیت نانومواد»

رئیس:

مدیرعامل - شرکت نوین فن سنجش آویسا

منتظری، مانی

(کارشناسی ارشد مهندسی مواد)

دبیر:

مدیرعامل - شرکت راهبران توسعه سبز

منهاج‌بناء، رابعه

(دکتری تخصصی سم‌شناسی)

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

کارشناس - گروه استاندارد و ارزیابی ستاد ویژه توسعه فناوری نانو

اسلامی‌پور، الهه

(کارشناسی ارشد زیست‌شناسی)

عضو هیئت علمی - دانشگاه علوم پزشکی ایران

رضوی، شبلم

(دکتری تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی)

عضو انجمن الکترونیک چاپی جمهوری اسلامی ایران و

سراج، محمد

توسعه‌دهنده تکنولوژی الکترونیک چاپی

(کارشناسی ارشد الکترونیک، قدرت و ماشین‌های الکتریکی)

رئیس هیئت مدیره - شرکت راصد توسعه فناوری‌های پیشرفته

سهرابی جهرمی، ابوذر

(دکتری تخصصی نانوفناوری)

مدیر تحقیق و توسعه - شرکت آرال تجهیز آزما

صادق حسنی، صدیقه

(دکتری شیمی تجزیه - الکتروشیمی)

عضو هیئت علمی - دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی

قاضی خوانساری، محمود

درمانی تهران

(دکتری تخصصی سم‌شناسی)

عضو هیئت علمی - دانشگاه تهران

کوهی، محمدکاظم

(دکتری تخصصی سم‌شناسی)

مشاور - گروه استاندارد و ارزیابی محصولات ستاد ویژه توسعه

سیفی، مهوش

فناوری نانو

(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

ویراستار:

مشاور - گروه استاندارد و ارزیابی محصولات ستاد ویژه توسعه

سیفی، مهوش

فناوری نانو

(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
و	پیش‌گفتار
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۲	۳ اصطلاحات و تعاریف
۴	۴ نمادها و کوتاه‌نوشت‌ها
۶	۵ پس‌زمینه
۶	۱-۵ کلیات
۷	۲-۵ روش امیدانس الکتروشیمیایی
۱۰	۶ دستگاه‌ها، اصول پایه
۱۰	۱-۶ پایه روش امیدانس الکتروشیمیایی
۱۰	۲-۶ انواع دستگاه
۱۳	۷ کاربرد برای ارزیابی سمیت برون‌تنی
۱۳	۱-۷ کلیات
۱۷	۲-۷ شاخص سلولی نرمال شده
۱۸	۸ محدودیت‌های فنی
۱۹	پیوست الف (آگاهی‌دهنده) روش‌های اجرایی پایه با استفاده از سامانه xCELLigence
۲۶	پیوست ب (آگاهی‌دهنده) مطالعات موردی با استفاده از روش اجرایی عملیاتی استاندارد برای راه‌اندازی آزمایش xCELLigence با مدل‌های سلولی مختلف
۳۱	کتاب‌نامه

پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو- فناوری امیدانس (رهبندی) بدون برچسب برای ارزیابی برون‌تنی سمیت نانومواد» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی / منطقه‌ای به‌عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره‌شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شماره ۵ تهیه و تدوین‌شده، در یکصد و بیست و پنجمین اجلاس کمیته ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۴۰۱/۱۱/۲۵ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران براساس استاندارد ملی ایران شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوه نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط، مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی زیر به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین‌شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می‌باشد و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی مزبور است:

ISO/TS 21633: 2021, Label-free impedance technology to assess the toxicity of nanomaterials in vitro

فناوری نانو- فناوری امیدانس (رهبندی) بدون برچسب برای ارزیابی برون تنی سمیت نانومواد

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، توصیف روش آشکارسازی بدون برچسب و در لحظه^۱ برای سنجش‌های مبتنی بر سلول به منظور پایش غیرتهاجمی^۲ ارزیابی سمیت نانومواد در سلول‌های یوکاریوتی^۳ (هسته‌ای) و پروکاریوتی^۴ (پیش‌هسته‌ای) است.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به صورت الزامی به آنها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مرجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آنها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

2-1 ISO/TS 80004-1, Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms

یادآوری- استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو- واژه‌نامه- قسمت ۱: اصطلاحات اصلی، براساس استاندارد ISO/TS 80004-1: 2015 تدوین شده است.

2-2 ISO/TS 80004-2, Nanotechnologies — Vocabulary — Part 2: Nano-objects

یادآوری- استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو- واژه‌نامه- قسمت ۲: نانو اشیاء، براساس استاندارد ISO/TS 80004-2: 2015 تدوین شده است.

2-3 ISO/TS 10993-1, Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۴۳۰۰: سال ۱۳۷۶، راهنمای گزینش آزمون جهت ارزیابی بیولوژیک یا زیست‌شناسی وسایل پزشکی، براساس استاندارد ISO/TS 10993-1: 1992 تدوین شده است.

1- Real-time
2- Non-invasive
3- Eukaryotic
4- Prokaryotic

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات با تعاریف زیر به کار می‌رود.^۱

۱-۳

نانومقیاس

nanoscale

گستره اندازه بین تقریباً ۱ نانومتر تا ۱۰۰ نانومتر است.
یادآوری - خواصی که از اندازه‌های بزرگتر برون‌یابی نمی‌شوند، غالباً در این گستره اندازه نشان داده می‌شوند.

[منبع: زیربند ۲-۱، استاندارد ملی ایران - ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۲-۳

نانوماده

nanomaterial

ماده‌ای که هر بُعد خارجی آن یا ساختار داخلی یا ساختار سطحی آن نانومقیاس (۱-۳) است.

یادآوری - این اصطلاح عمومی شامل نانوشیء (۳-۳) و ماده نانوساختاریافته (۴-۳) است.

[منبع: زیربند ۲-۴، استاندارد ملی ایران - ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۳

نانوشیء

nano-object

ماده‌ای که یک، دو و یا سه بُعد خارجی آن نانومقیاس (۱-۳) است.

[منبع: زیربند ۳-۲، استاندارد ملی ایران شماره ۴-۱۸۳۹۲: سال ۱۳۹۳]

۴-۳

ماده نانوساختاریافته

nanostructured material

۱- اصطلاحات و تعاریف به کاررفته در استانداردهای ISO و IEC در وبگاه‌های www.iso.org/obp و www.electropedia.org قابل دسترس است.

استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۵۰ (چاپ اول): سال ۱۴۰۱

ماده‌ای که دارای نانوساختار داخلی و یا نانوساختار سطحی است.

[منبع: زیربند ۲-۷، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۵-۳

نانوذره

nanoparticle
NP

نانوشیء (۳-۳) با تمام ابعاد خارجی در مقیاس نانو (۱-۳) که در آن طول بلندترین و کوتاه‌ترین محورهای نانوشیء به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت نداشته باشد.

[منبع: زیربند ۴-۴، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵- یادآوری حذف شده‌است]

۶-۳

نمونه موردآزمون

test sample

ماده، دستگاه، بخشی از دستگاه، قطعه، عصاره یا بخشی از آن که تحت آزمون یا ارزشیابی زیستی یا شیمیایی قرار می‌گیرد.

۷-۳

شاخص سلولی

cell index

CI

پارامتر بدون بعد به‌دست آمده از اندازه‌گیری امپدانس الکتروشیمیایی است.

۸-۳

امپدانس الکتروشیمیایی

electrochemical impedance

مقاومت موثر مدار یا قطعه الکتریکی در برابر جریان متناوب، ناشی از اثرات ترکیبی مقاومت اهمی و واکنایی (راکتانس)^۱ است.

1- Reactance

فلوسایتومتری بر پایه امپدانس (یاخته‌سنجی شارشی)

impedance-based flow cytometry

IFC

روشی که برای آشکارسازی و اندازه‌گیری مشخصه‌های فیزیکی و شیمیایی جمعیتی از سلول‌ها یا ذرات استفاده می‌شود.

یادآوری- نمونه حاوی سلول یا ذرات، در سیالی معلق شده و به دستگاه فلوسایتومتر تزریق می‌شود.

طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی

electrochemical impedance spectroscopy

EIS

روشی که امپدانس وابسته به بسامد پتانسیل‌های جریان متناوب یک سامانه را اندازه‌گیری کرده و بنابراین خواص مقاومتی و خازنی (دی‌الکتریک) مواد را تعیین می‌کند.

توموگرافی (برش‌نگاری) امپدانس الکتریکی

electrical impedance tomography

EIT

روشی که در آن از اندازه‌گیری‌های الکتریکی بین بسیاری از جفت الکترودهای سطح با موقعیت مناسب، برای تولید تصاویری از «ساختارهای زیرین»^۱ بدن استفاده می‌شود.

۴ نمادها و کوتاه‌نوشت‌ها

کوتاه نوشت‌ها	معادل انگلیسی	معادل فارسی
AC	Alternating current	جریان متناوب
AgNPs	Silver nanoparticles	نانوذرات نقره
AuNPs	Gold nanoparticles	نانوذرات طلا
BSA	Bovine serum albumin	آلبومین سرم گاوی
CB	Carbon black	کربن سیاه

1- Underlying body structures

معادل فارسی	معادل انگلیسی	کوتاه نوشتها
شاخص سلولی	Cell index	CI
سرب اکسید	Cerium oxide	CeO ₂
مس اکسید	Copper oxide	CuO
تباین تداخل تفاضلی	Differential interference contrast	DIC
محیط کشت ایگل اصلاح شده دآلبکو	Dulbecco's modified Eagle's medium	DMEM
دی متیل سولفو کسید	Dimethylsulfoxide	DMSO
حسگری امپدانس سلول-بستره الکتریکی	Electric cell-substrate impedance sensing	ECIS
ماتریس خارج سلولی	Extracellular matrix	ECM
اتیلن دی آمین تترا استیک اسید	Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA
طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی	Electrochemical impedance spectroscopy	EIS
برش نگاری امپدانس الکتریکی	Electrical impedance tomography	EIT
محیط کشت ضروری کمینه ایگل	Eagle's minimum essential medium	EMEM
فریک اکسید	Ferric oxide	Fe ₂ O ₃
سرم جنین گاوی	Fetal bovine serum	FBS
سامانه پربازده	High throughput system	HTS
غلظت مهارکنندگی نیمه بیشینه	half-maximal inhibition concentration	IC ₅₀
فلوسایتومتری برپایه امپدانس	Impedance-based flow cytometry	IFC
میکروالکترودهای درهم تنیده	Interdigitated microelectrodes	IMEs
منگنز اکسید	Manganese oxide	Mn ₂ O ₃
CI نرمال شده (بهنجار شده)	Normalized CI	NCI
نیکل	Nickel	Ni
فسفات بافرسالین	Phosphate buffered saline	PBS
نقطه کوانتمی	Quantum dot	QD
تحلیلگر سلولی در لحظه	Real-time cell analyzer	RTCA
محیط کشت موسسه یادبود پارک رازول	Roswell park memorial institute medium	RPMI
سیلیکون دی اکسید	Silicon dioxide	SiO ₂
تشدید پلاسمون سطحی	Surface plasmon resonance	SPR
تیتانیوم دی اکسید	Titanium dioxide	TiO ₂
زیر کونیم اکسید	Zirconium oxide	ZrO ₂
روی اکسید	Zinc oxide	ZnO

۱-۵ کلیات

سامانه‌های سنجش برون‌تنی متعددی که برای ارزیابی سمیت ترکیب‌های شیمیایی مختلف توسعه یافته‌اند، می‌توانند برای ارزیابی سمیت نانومواد نیز پیاده‌سازی شوند. نانومواد به دلیل خواص فیزیکوشیمیایی، ممکن است رفتار متفاوتی نسبت به ترکیبات شیمیایی که این سامانه‌های سنجش برای آنها ایجاد شده‌اند، داشته باشند. بنابراین، زمانی که ترکیبات شیمیایی با NMs استفاده می‌شوند، اغلب مغایرت‌هایی در نتایج بین این سنجش‌ها مشاهده خواهد شد [1]. در نتیجه، از پژوهشگران خواسته می‌شود تا برهم‌کنش NMs با سامانه‌های سنجش را به‌عنوان منبع احتمالی مغایرت‌های مشاهده‌شده، در نظر گیرند.

سامانه‌های آشکارسازی این سنجش‌های سمیت اغلب طبیعت مبتنی بر نور داشته و برای تعیین کمیت محصولات، این سامانه‌های سنجش (مثلاً نمک‌های تترازولیم) به جذب، درخشایی یا فلورسانس متکی هستند. بنابراین NMs ممکن است با تغییر در جذب، درخشایی یا فلورسانس محصولات این سامانه‌های سنجش، مستقیماً در بازخوانی سنجش تداخل داشته باشند [2]. بسته به نوع مواد، شکل و اندازه آنها، NMs خاصی ممکن است نور را در طول موج سنجش، آشکارسازی، جذب، پراکنده و ساطع کنند. نانوذرات پایه کربنی، به‌عنوان مثال: CB، برای جذب نور در طیف مرئی شناخته شده‌است، درحالی که اکسیدهای فلزی، هیدروکسیدهای فلزی و نانوذرات کربنات فلزی به‌عنوان پراکنده‌کننده نور شناخته می‌شوند [3]. نانوذرات طلا با SPR قوی، نور بیشتری را نسبت به نانوذرات آهن اکسید جذب می‌کنند و نانوذرات بزرگ‌تر، نور بیشتری نسبت به نانوذرات کوچک‌تر جذب می‌کنند [1]. نانوذرات نقره مشابه با نانوذرات طلا، همچنین دارای تشدیدهای پلاسمونی^۱ قوی هستند [4]. بنابراین توانایی‌های جذبی این نانوذرات ممکن است با خواص جذبی محصولات به‌دست آمده از سامانه‌های سنجش مختلف تداخل یابد. NMs همچنین ممکن است از طریق برهم‌کنش با محصول واکنش شیمیایی، مستقیماً در سنجش‌ها تداخل ایجاد کند. ممکن است NMs در مقایسه با ذرات بزرگ، به دلیل مساحت سطح بزرگ در واحد جرم و واکنش‌پذیری سطح، یک ظرفیت جذبی افزایش‌یافته‌ای را در نتیجه افزایش برهم‌کنش احتمالی بین نانوذرات و اجزای سنجش، از خود نشان دهند [3][5]. در نهایت، NMs همچنین ممکن است تبدیل بستره به محصول را کاتالیز کنند. مساحت سطح بزرگ در واحد جرم و واکنش‌پذیری سطح ممکن است منجر به افزایش^۲ انرژی سطح و متعاقب آن افزایش فعالیت کاتالیزوری NMs شود [6].

بنابراین، این استاندارد براساس اطلاعات فعلی در مورد روش امپدانس الکتروشیمیایی است که بر اندازه‌گیری‌های نوری برای تعیین درجه زنده‌مانی یا سمیت سلولی تکیه نمی‌کند و همچنین اطلاعات کینتیکی غیرتهاجمی و با وضوح زمانی بالا را از طریق منحنی‌های رشد ثبت‌شده، ارائه می‌کند. بنابراین، روش امپدانس الکتروشیمیایی می‌تواند به‌عنوان یک سامانه سنجش جایگزین برای مطالعه زنده‌مانی و سمیت

1- Plasmon resonances

2- Excess

NMs در شرایط برون‌تنی بدون هیچ تداخلی، استفاده شود. همچنین این استاندارد مطالعات بیشتری را به‌سوی حالت عمل (سمیت) یک نانوماده هدایت می‌کند.

۲-۵ روش امیدانس الکتروشیمیایی

روش ECIS در دهه ۱۹۸۰ برای مطالعه فرایندهای سلولی در زمان واقعی^۱، توسعه یافت [7][8][9]. در این سنجش، سلول‌ها در چاهک‌هایی کشت می‌شوند که حاوی یک الکتروود مرجع بزرگ و همچنین تعدادی الکتروود آشکارساز هستند که ۸۰ درصد از سطح کف هر چاهک را پوشش می‌دهند. با استفاده از پتانسیل سینوسی با دامنه کم، امیدانس الکتروشیمیایی بین الکتروودها اندازه‌گیری می‌شود. سلول‌ها همانطور که به سطح الکتروود متصل شده و پخش می‌شوند، مساحت موثر در دسترس شارش جریان^۲ را تغییر می‌دهند و باعث می‌شوند امیدانس سامانه افزایش یابد [10]. افزایش در امیدانس احتمالاً به دلیل خواص عایقی^۳ غشاهای دولایه لیپیدی^۴ سلولی که به‌عنوان اجسام دی‌الکتریک عمل می‌کنند، بوده و بنابراین باید با تعداد سلول‌های روی الکتروودها مرتبط باشد. متعاقباً، این روش برای ارزیابی سمیت سلولی [11] [12] [13] [14] و همچنین قدرت جنیندگی^۵ [7] [10] [15] استفاده می‌شود. طیف‌سنجی امیدانس فعالیت سلولی نیز براساس همین روش امیدانس [12] [16] [17] [18] [19] [20] توسعه یافته است.

براساس روش ECIS، یک حسگری الکترونیکی جدید RTCA با پیشرفت‌هایی در ساختار الکتروودی توسعه یافته است تا امکان آشکارسازی تقریباً همه انواع سلول‌ها در یک چاهک کشت فراهم شود [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28]. در این حالت، سلول‌ها اجازه رشد و اتصال به الکتروودها را داشته و با تغییر در شارش جریان در اطراف و از میان سلول‌ها، ممکن است هم‌زمان منجر به افزایش امیدانس شود و بنابراین اطلاعاتی در مورد تعداد، ریخت‌شناسی^۶ و زنده‌مانی^۷ آنها فراهم می‌شود. پس از افزودن یک ماده موردآزمون، سلول‌ها ممکن است جدا شده^۸ و باعث یک کاهش امیدانسی شوند که نشان‌دهنده سمیت از طریق کاهش زنده‌مانی سلولی است [11] [12] [29]. برای اطمینان از جدا نشدن سلول‌ها به دلیل «ازدحام بیش از حد»^۹، توصیه می‌شود پیش از آزمایش، ارزیابی تکثیر سلولی انجام شود تا غلظت کشت ایدئال^{۱۰} برای نوع سلول موردبررسی تعیین شود. همچنین، توصیه می‌شود سلول‌های کنترل تیمارنشده در کنار سلول‌های تیمار شده برای پایش تلافی‌ها^{۱۱} مورد سنجش قرار گیرند.

-
- 1- Real time
 - 2- Current flow
 - 3- Insulating
 - 4- Bilipid
 - 5- Motility
 - 6- Morphology
 - 7- Viability
 - 8- Detach
 - 9- Overcrowding
 - 10- Ideal seeding
 - 11- Confluency

در گذشته، یک روش اندازه‌گیری امیدانس برای پایش کمی تعداد سلول و زنده‌مانی سلولی در کشت‌های تک‌لایه از طریق اندازه‌گیری امیدانس‌های مختلف در پاسخ‌های سلولی، مانند تکثیر^۱ و سمیت، به‌صورت در لحظه و بدون برچسب به‌کار می‌رفته است [30][31][32][33][34][35][36][37][38][39]. با این روش، ارزیابی، تمایز سلولی^۲، مهاجرت^۳ و مهاجرت^۴ سلولی، برهم‌کنش سلول-سلول^۵ با استفاده از کشت‌های هم‌زمان^۶ و بررسی مکانیستیک^۷ سلولی مانند سطوح کلسیم داخل‌سلولی^۸ و آسیب DNA امکان‌پذیر است [40][41][42][43]. روش امیدانس الکتروشیمیایی نیز با موفقیت برای پایش در جای^۹ سمیت سلولی ناشی از نانوماده و سایر جنبه‌های کاراندام‌شناسی (فیزیولوژی)^{۱۰} سلولی مانند تکثیر، ریخت‌شناسی، اتصال^{۱۱} و «چسبندگی بین‌سلولی»^{۱۲} استفاده می‌شود [44]. به‌عنوان مثال، پایش مبتنی بر امیدانس الکتروشیمیایی برای بررسی اثرات سمیت سلولی^{۱۳} NMs مختلف با پایه کربن با رده‌های سلولی^{۱۴} مختلف، در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱ - انواع سلول‌های مورد استفاده برای ارزیابی سمیت نانومواد با روش امیدانس

مرجع	نانومواد	نوع سلول
[45][46][47]	نانولوله‌های کربنی	سلول‌های اندوتلیال ^۱ EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™)
		فیبروبلاست ^۲ L929 (ATCC® CCL-1™)
		و فیبروبلاست‌های V79-4 (ATCC® CCL-93™)
		رده سلولی GC-2spd(ts) مشتق شده از اسپرماتوسیت ^۳ (زامیخته) نامیراشده ^۴ موشی (ATCC® CRL-2196™)
		سلول‌های مونوسیت ^۵ انسانی THP-1 (ATCC® TIB-202™)
[48]	گرافن	گلیوبلاستوما ^۶ انسانی U87-MG

- 1- Proliferation
- 2- Differentiation
- 3- Invasion
- 4- Migration
- 5- Interaction
- 6- Co-cultures
- 7- Mechanistic
- 8- Intracellular
- 9- In situ
- 10- Physiology
- 11- Attachment
- 12- Intercellular adhesion
- 13- Cytotoxic effects
- 14- Cell lines

جدول ۱- (ادامه)

مرجع	نانومواد	نوع سلول
		(ATCC® HTB-14 TM)
		سلول‌های آستروسیت ^۷ رت (CRL-2006) و سلول‌های اندوتلیال ^۸ موش
[49]		(ATCC® CRL-2583 TM) سلول‌های هپاتوما ^۹ C3A (ATCC® CRL-10741 TM)
[50]	TiO ₂ و CuO	رده سلول پوششی ریه، A549 (ATCC® CCL-185 TM)
[51]	CeO ₂ , SiO ₂ , Fe ₂ O ₃ , Mn ₂ O ₃ , ZnO, ZrO ₂	16HBE14o، چسبنده، رده سلول پوششی نایژک انسانی نامیراشده ^{۱۰}
[52]	SiO ₂	رده سلول پوششی روده انسانی HT-29 (ATCC® HTB-38 TM)
[53]	AgNPs	رده سلولی روده انسانی Caco-2 (ATCC® HTB-37 TM)
[54]	AuNPs	رده سلول پوششی نایژک BEAS-2B (ATCC® CRL-9609 TM) رده سلولی تخمدان هامستر چینی ^{۱۱} CHO (CRL-12023) رده سلولی کلیه جنین (رویان) ^{۱۲} انسانی HEK 293 (ATCC® CRL-1573 TM)
[55]	Ni NPs	سلول‌های کبد سرطانی ^{۱۳} (SMMC-7721)
[56]	نانوذرات بسیاری (پلیمری)	هلا ^{۱۴} ، رده سلولی پوشش دهانه رحم ^{۱۵} انسانی (ATCC® CCL-2 TM)
1- Endothelial 2- Fibroblasts 3- Spermocyte 4- Immortalized 5- Monocytic 6- Glioblastoma 7- Astrocytes 8- Endothelial 9- Hepatoma 10- Immortalized human bronchial epithelial cell line 11- Chinese hamster ovary cell line 12- Human embryonic kidney cell line 13- Hepatocellular carcinoma cells 14- HeLa 15- Human cervix epithelia cell line		

۶ دستگاه‌ها، اصول پایه

۱-۶ پایه روش امیدانس الکتروشیمیایی

در سامانه EIS، یک مدار معادل الکتریکی برای برازش^۱ منحنی داده‌های تجربی استفاده می‌شود. برای آشکارسازی سلولی، تعدادی مدار معادل الکتریکی پیشنهاد می‌شود (مرجع [57] و طیف امیدانس آن برای IMEs در مرجع [58] گزارش شده است). در یک مدار معادل الکتریکی ساده شده، پیشنهاد می‌شود که دو ظرفیت خازنی^۲ لایه دوگانه یکسان^۳ در هر الکترو^۴ (C_{di}) به صورت سری^۵ به مقاومت محیط کشت^۶ (R_{sol}) متصل شوند، جایی که ظرفیت خازنی دی‌الکتریک محیط کشت (C_{di}) به موازات این عناصر سری وارد می‌شود [30]. در این مدار معادل، دو شاخه موازی به نام‌های C_{di} و $C_{di} + R_{sol} + C_{di}$ وجود دارد که امیدانس Z_1 و Z_2 در هر شاخه را می‌توان با فرمول (۱) برای شاخه $C_{di} + R_{sol} + C_{di}$ و با فرمول (۲) برای شاخه C_{di} بیان کرد:

$$|Z_1| = \sqrt{R_{sol}^2 + \frac{1}{(\pi f C_{di})^2}} \quad (1)$$

$$|Z_2| = \sqrt{\frac{1}{(2\pi f C_{di})^2}} \quad (2)$$

از آنجایی که سلول‌های زیستی رسانایی بسیار ضعیفی در بسامدهای زیر ۱۰ kHz دارند [32]، حضور غشاهای سلولی که عایق الکتریکی هستند، سبب تغییر C_{di} می‌شود. در حالی که رسانندگی داخلی یک سلول می‌تواند به اندازه ۱ S/m باشد، رسانندگی غشای سلولی در حدود 10^{-7} S/m است [59]. بنابراین، تکثیر سلولی می‌تواند با امیدانس کل در بسامدهای پایین تخمین زده شود [30].

۲-۶ انواع دستگاه

۱-۲-۶ دستگاه‌های مبتنی بر امیدانس الکتروشیمیایی برای آنالیز برون‌تنی سمیت روی تک‌لایه‌های سلولی

سامانه‌های $xCELLigence^{\circledR}$ ، CellSine و ECIS (ECIS Z θ)^۸ نمونه‌هایی از دستگاه‌های تجاری در دسترس و در حال استفاده مبتنی بر امیدانس الکتروشیمیایی برای آنالیز برون‌تنی سمیت هستند که در آن

- 1- Fit
- 2- Capacitances
- 3- Two identical double layer capacitances
- 4- Dielectric capacitance
- 5- Series
- 6- Medium resistance
- 7- Solution resistance

۸- $xCELLigence^{\circledR}$ ، CellSine و ECIS (ECIS Z θ) نمونه‌هایی از محصولات تجاری در دسترس هستند. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده است و به منزله تأیید این محصولات توسط سازمان ملی استاندارد ایران نیست.

از تک‌لایه‌های سلولی برای پایش تغییرات خواص امپدانس سلول‌ها پس از مواجهه با عوامل زیست‌فعال^۱ از جمله NMs استفاده می‌شود.

طراحی پلیت کشت سلول با الکترودهای آبرکاری‌شده با طلا^۲ متصل به کف چاهک‌ها که در قالب HTS اجرایی شده‌است، امکان مشاهده در لحظه تغییرات سلولی را در طول آزمایش بدون نیاز به نمونه‌برداری مخرب از سلول‌ها، فراهم می‌سازد [14] [15] [29] [60]. بنابراین ممکن است اطلاعاتی در مورد تکثیر سلولی و واکنش آنها به عامل زیست‌فعال از جمله NMs مورد بررسی تامین شود [61].

یک حسگر سمیت خودکار^۳ قابل حمل^۴ و رومیزی^۵، مبتنی بر سلول پستانداران که از به‌هم پیوستن تراشه‌های زیستی^۶ ضمیمه‌شده به سیال^۷، حاوی سلول‌های اندوتلیال که با روش ECIS پایش می‌شوند نیز برای ارزیابی سمیت آب آشامیدنی، توسعه داده شده‌است [62].

۲-۲-۶ فلوسایتومتری بر پایه امپدانس

علاوه بر روش امپدانس الکتروشیمیایی بر پایه سلول متصل به سطح، یک سامانه IFC، یک IFC مبتنی بر تراشه^۸ ریزسیال^۹، می‌تواند امپدانس سلول منفرد را بدون نیاز به آماده‌سازی خاصی بر روی نمونه، آنالیز کند [63]. این روش همچنین قادر به تامین اطلاعات در مورد اندازه و تعداد سلول‌ها و نیز ظرفیت غشایی و رسانایی سیتوپلاسمی آنها است.

۳-۲-۶ طیف‌سنجی بر پایه امپدانس الکتروشیمیایی

روش EIS غیرتهاجمی و بدون برچسب برای اندازه‌گیری خواص دی‌الکتریک نمونه‌ها است. در این روش یک میدان الکتریکی AC با بسامد متغیر به وسیله الکترودها اعمال می‌شود. روش EIS در ابتدا برای تشریح^{۱۰} ظرفیت خازنی لایه دوگانه^{۱۱} توسعه داده شد، اما اکنون برای مشخص کردن فرایندهای الکتروشیمیایی تحت «مدوله‌سازی پتانسیل پیچیده»^{۱۲} استفاده می‌شود [64] [65]. با EIS، علاوه بر پایش نرخ رشد سلولی به صورت غیرتهاجمی، امکان «تصویربرداری با وضوح بالا»^{۱۳} از سلول‌های غیرچسبنده^{۱۴} یا معلق^{۱۵} نیز وجود دارد [66] [67].

-
- 1- Bioactive
 - 2- Gold-plated
 - 3- Automated
 - 4- Portable
 - 5- Bench-top
 - 6- Biochips
 - 7- Fluidic
 - 8- Chip-based
 - 9- Microfluidic
 - 10- Elucidate
 - 11- Double-layer capacitance
 - 12- Complex potential modulation
 - 13- High-resolution imaging
 - 14- Non-adherent
 - 15- Suspended

روش EIS یک روش آنالیز بدون برچسب و غیرتهاجمی برای انواع گسترده‌ای از نمونه‌های زیستی است که می‌تواند شامل سلول‌های منفرد تا انبوه‌های چندسلولی و ارگانیسیم‌ها (اندامگان) باشد. به‌عنوان مثال، زنده‌مانی سلولی در زمان واقعی و سمیت مواد آزمون را می‌توان ارزیابی کرد [16][20]. علاوه بر این، نشان داده شده است که با EIS امکان اندازه‌گیری تغییرات ریخت‌شناسی انبوه‌های سلولی ناشی از نکروزیس (بافت‌مردگی)^۱ و آپوپتوزیس (خزان‌باخته‌ای)^۲ با قراردادن سلول‌های کروی شکل^۳ به صورت هیدرودینامیکی^۴ با خاصیت موئینگی^۵ و تنظیم در اندازه‌گیری چهارالکترودی^۶ وجود دارد [68][69]. اندازه‌گیری‌های EIS در توکسیکولوژی محیط‌زیستی برای مشخص کردن و دستکاری^۷ ارگانیسیم‌های چندسلولی^۸، مانند به‌دام‌انداختن^۹، مرتب‌سازی^{۱۰} و شمارش^{۱۱} کرم الگاس^{۱۲} [73][72][71][70] یا اندازه‌گیری پاسخ جنین‌های ماهی به مواد شیمیایی محافظ سرما^{۱۳}، مانند متانول و دی‌متیل سولفوکسید (DMSO)^{۱۴} است [75][74]. علاوه بر این، اندازه‌گیری‌های EIS همچنین می‌تواند برای تشخیص انگل‌ها^{۱۵} در آب آشامیدنی [76] و برای آزمون داروهای ضد کرم^{۱۶} از طریق پایش جنبندگی انگلی مورد استفاده قرار گیرد [77][78].

با استفاده از EIS، می‌توان سمیت نانوسیم‌های سیلیکا را روی سلول‌های سرطانی اپیتلیال پستان [79] و سمیت QD و AuNPs روی سلول‌های فیبروبلاستیک V79، V794 (مانند ATCC® CCL93™) [80] ارزیابی کرد.

۴-۲-۶ توموگرافی امیدانس الکتریکی

علاوه بر کاربردهای بالینی احتمالی [81]، EIT همچنین برای ارزیابی رشد سلولی و فعالیت سلول در ساختارهای سه بعدی زنده و نیز زنده‌مانی سلول استفاده می‌شود و می‌تواند به صورت فضایی مسئله زنده‌مانی سلولی را در کره‌های سه‌بعدی منفرد حل کند [82].

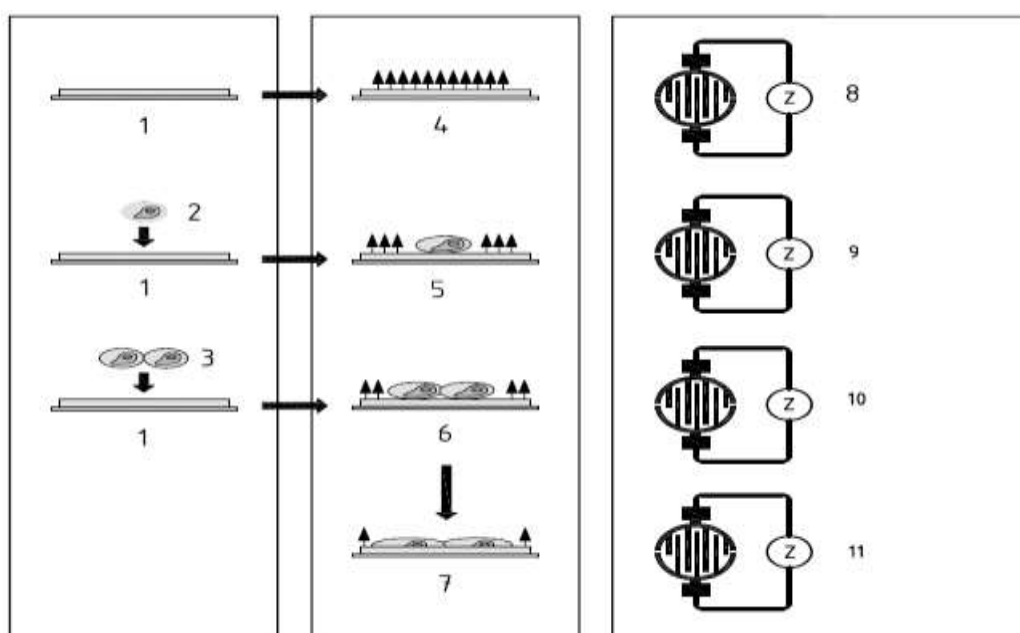
-
- 1- Necrosis
 - 2- Apoptosis
 - 3- Cell spheroids
 - 4- Hydrodynamically
 - 5- Capillary featuring
 - 6- Four-electrode measurement
 - 7- Manipulate
 - 8- Multicellular organisms
 - 9- Trapping
 - 10- Sorting
 - 11- Counting
 - 12- Caenorhabditis elegans
 - 13- Cryoprotective chemicals
 - 14- Dimethyl sulfoxide
 - 15- Parasites
 - 16- Anthelmintic drugs

۱۷- ATCC® CCL93™ نمونه‌ای از محصولات تجاری در دسترس می‌باشند. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده است و به منزله تأییدیه این محصولات توسط سازمان ملی استاندارد ایران نیست.

۷ کاربرد برای ارزیابی سمیت برون تنی

۱-۷ کلیات

امکان استفاده از روش مبتنی بر امپدانس الکتروشیمیایی در ارزیابی سمیت NMs وجود دارد. سلول‌ها کشت می‌شوند و هنگامی که سلول‌های چسبنده، به سطح حسگر الکتروود متصل و گسترده می‌شوند، افزایش‌های امپدانس ثبت می‌شود. برعکس، سلول‌هایی که حتی برای مدت کوتاهی تجمع یافته^۱ یا جدا می‌شوند، باعث کاهش مقادیر امپدانس می‌شوند. وجود سلول‌ها در بالای الکتروودهای «پلیت‌های میکروتیتر الکترونیکی چندچاهکی»^۲ (ای-پلیت)^۳، بر محیط یونی در موضع فصل مشترک الکتروود/محلول تأثیر می‌گذارد و منجر به تغییر امپدانس مدار می‌شود (به شکل ۱ مراجعه شود).



راهنما:

- | | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| ۱- الکتروود | ۷- الکتروود با دو سلول محکم چسبیده |
| ۲- سلول | ۸- خط پایه |
| ۳- سلول‌ها | ۹- امپدانس |
| ۴- الکتروود بدون سلول | ۱۰- امپدانس دوبرابر شده |
| ۵- الکتروودهایی با یک سلول متصل | ۱۱- امپدانس بیشتر افزایش یافته |
| ۶- الکتروود با دو سلول متصل | |

شکل ۱- طرحواره تشریحی اندازه‌گیری امپدانس الکتروشیمیایی سلول زیستی و میکروالکتروودهای یکپارچه در

کف چاهک [83]

- 1- Round up
2- A multiple-well electronic microtiter plates
3- E-Plate

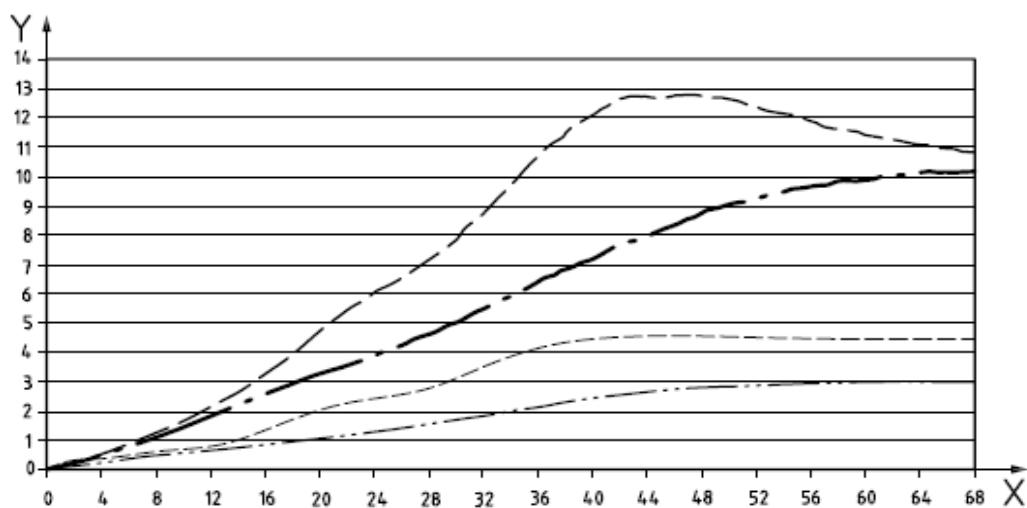
مرگ سلولی، منجر به رهایش سلول‌ها از سطح الکتروود اندازه‌گیری و باعث القاء کاهش امپدانس اندازه‌گیری شده در سراسر الکتروودها می‌شود. ثبت امپدانس در سراسر الکتروودها در پایین پلنت (یک مقاومت پیچیده در قانون/هم) به‌عنوان یک پارامتر در سامانه‌های مختلف در زیربند ۶-۱ شرح داده شده‌است. به‌عنوان مثال، به‌صورت CI در xCELLigence، با $Z_{ie,c}$ (Ω) در CellKey™^۱، با $\Delta|Z|$ (Ω) در CellSine و با امپدانس (Ω) در سامانه ECIS Z θ بیان می‌شود.

موضوع زیر مثالی از نحوه محاسبه و استفاده سامانه xCELLigence از شاخص سلولی^۲ را ارائه می‌دهد. سیگنال امپدانس الکتروشیمیایی همانطور که سلول‌ها با سطح میکروالکتروود زیست‌سازگار^۳ در چاهک «ای-پلنت» برهم‌کنش دارند، با کمک نرم‌افزار تخصصی، به پارامتر خاصی به نام CI تبدیل می‌شود.

پایش زنده‌مانی سلول بسیار مهم است و سامانه امپدانس سلولی، اندازه‌گیری پیوسته و کمی‌سنجی زنده‌مانی سلول‌ها را امکان‌پذیر می‌کند [84][85]. پارامتر CI، زنده‌مانی سلول را منعکس می‌کند که به‌ترتیب تعداد سلول، کیفیت اتصال و نوع سلول را اندازه‌گیری می‌کند [25][26]. CI، یک پارامتر مشتق‌شده و بدون یکا است و برای نشان‌دادن وضعیت سلول براساس تغییرات نسبی مقادیر اندازه‌گیری‌شده امپدانس است که در حضور و یا عدم حضور سلول‌ها در چاهک‌ها رخ می‌دهد [13][86]. در شکل ۲ نشان داده شده‌است که چهار رده سلول مختلف، منحنی‌های تکثیر متفاوت با شاخص‌های سلولی متفاوتی را نشان می‌دهند. در نتیجه، شکل نشان می‌دهد که شاخص سلولی به نوع سلول مربوط است که در آن، هر منحنی دارای یک فاز تاخیر^۴ نسبتاً منحصربه‌فرد، فاز نمایی^۵ و فاز ثابت^۶ است.

۱- CellKey™ نمونه ای از یک محصول مناسب در دسترس تجاری است. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده‌است و به منزله تأیید این محصول توسط سازمان ملی استاندارد ایران نیست.

- 2- Cell index
- 3- Biocompatible
- 4- Lag phase
- 5- Exponential phase
- 6- Stationary phase



راهنما:

زمان (h)	X
شاخص سلولی	Y
MCF 7 (۳۰,۰۰۰ سلول)	---
COS 7 (۶۲۵۰ سلول)	—
HT 29 (۵۰۰۰۰ سلول)
PC3 (۶۲۵۰ سلول)	-.-.-

یادآوری- رده‌های سلولی در سه تکرار برای محاسبه متوسط و \pm SD مقادیر CI متناظر با رده‌های سلولی، کاشته شده‌اند [83].

شکل ۲- منحنی‌های تکثیر سلولی چهار رده سلولی مختلف، نمایش داده شده به عنوان شاخص سلولی در سامانه امیدانس سلولی

نرم افزار دستگاه، امیدانس را بر حسب اهم (Ω) به یک مقدار CI تبدیل می‌کند که در آن $CI = \Omega/15$ است. امیدانس با مقادیر CI نمایش داده می‌شود و می‌توان از آن برای نظارت بر زنده‌مانی سلول، تکثیر، درجه چسبندگی سلول، تعداد سلول و ریخت‌شناسی استفاده کرد. مقادیر CI پایین، در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، نشان‌دهنده سمیت سلولی است در حالی که مقادیر بالای CI نشان‌دهنده چسبندگی و تکثیر سلولی است. نشان داده شده است که تغییر امیدانس ممکن است بسته به دو عامل ایجاد شود:

الف- تعداد سلول‌های متصل به الکترودها که در صورت عدم وجود سلول روی سطح الکتروده، شاخصه الکترونیکی حسگر تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد و تغییر امیدانس صفر (۰) است.

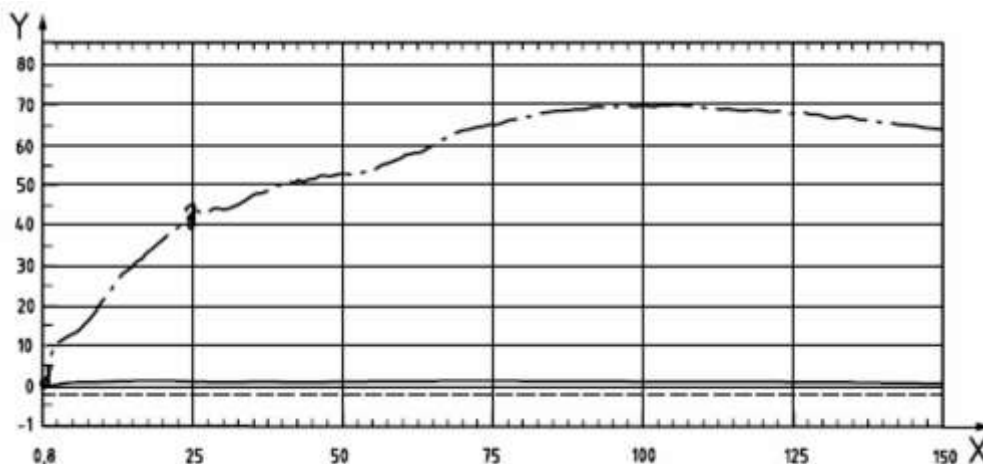
ب- تغییر ابعاد سلول‌های متصل روی الکترودها که با وجود تعداد سلول‌های یکسان، تغییرات ابعادی مانند افزایش در چسبندگی سلول یا پخش سلول‌های متصل روی الکترودها، منجر به مقدار CI بالاتری می‌شود [87].

از طرف دیگر، کاهش مقدار CI نشان‌دهنده جدا شدن سلول به دلیل کاهش مقاومت اندازه‌گیری شده با الکترودها است.

مقادیر CI به صورت زیر محاسبه می شوند [88]:

$$I_{CI} = \max_{i=1, \dots, N} \left[\frac{R_{cell}(f_i)}{R_b(f_i)} - 1 \right] \quad (3)$$

که در آن:



$R_{cell}(f_i)$: امیدانس الکتروود وابسته به بسامد است؛

$R_b(f_i)$: امیدانس پس‌زمینه که در زمان اولیه، بدون سلول اندازه‌گیری می‌شود؛

N : تعداد نقاط بسامد است که امیدانس در آنها اندازه‌گیری می‌شود.

راهنما:

	X	زمان (h)
	Y	شاخص سلولی
-----	BEAS-2B	(۱۰۰۰۰ سلول)
—————	کنترل ذرات	(فقط محیط کشت و ذرات)
-----	کنترل محیط کشت	(فقط چاهک‌های محیط کشت)

یادآوری - منحنی زنده‌مانی سلول‌های اپیتلیال نایژک انسانی (BEAS-2B)، کنترل محیط کشت و کنترل ذرات به‌عنوان شاخص سلولی پس از مواجهه با ۱۴ nm AuNPs، نمایش داده شده است [89].

شکل ۳ - پایش^۱ در لحظه زنده‌مانی سلول

همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، جایی که هیچ سلولی وجود ندارد یا فقط نانوذرات اضافه شده است، مقدار CI صفر است زیرا $R_{cell}(f_i) = R_b(f_i)$ در فرمول (۳)، نشان‌دهنده عدم تداخل با نانوذرات آزمون شده است. از سوی دیگر، هنگامی که اتصال سلولی افزایش می‌یابد، مقادیر CI بزرگتر است. بنابراین،

مقدار CI با تعداد سلول موجود در یک چاهک، ارتباط دارد. علاوه بر این، تغییرات در مقادیر CI نشان‌دهنده تغییرات در ریخت‌شناسی سلولی، چسبندگی سلولی یا زنده‌مانی سلولی است [36].

۲-۷ شاخص سلولی نرمال شده

به منظور امکان مقایسه بین تیمارهای مختلف، لازم است CI چاهک‌ها نرمال شود تا تغییرپذیری^۱ بین چاهکی^۲ دقیقاً در نقطه زمانی قبل از افزودن NP کمینه شود. مقدار NCI مطابق فرمول (۴) محاسبه می‌شود:

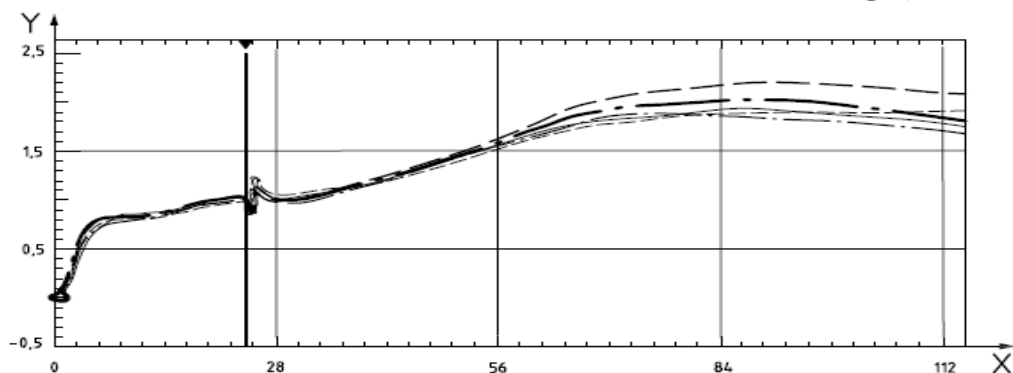
$$I_{CI,N} = \frac{I_{CI}(t)}{I_{CI}(t_{of\ dose})} \quad (۴)$$

که در آن :

$C_{CI}(t)$ CI در هر زمان است؛

$I_{CI}(t_{of\ dose})$ CI در زمان دُزدهی نانوذرات است.

بنابراین NCI برای همه چاهک‌ها همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، در نقطه زمانی نرمال‌سازی، روی عدد یک تنظیم می‌شود.



راهنما:

زمان (h)	X
شاخص سلولی نرمال شده	Y
رده سلولی ۱
رده سلولی ۲	-----
رده سلولی ۳	-----
رده سلولی ۴	————
رده سلولی ۵	-----

یادآوری- همانطور که با خط عمودی سیاه نشان داده شده، نقطه زمانی نرمال‌سازی دقیقاً قبل از زمان افزودن NPs انتخاب شده است [54].

شکل ۴ - NCI سلول‌های BEAS-2B تیمار شده با AuNP

یک روش اجرایی برای استفاده از سامانه xCELLigence در پیوست الف و مطالعات موردی با استفاده از روش اجرایی استاندارد برای راه‌اندازی آزمایش xCELLigence با مدل‌های مختلف سلولی در پیوست ب ارائه شده‌است.

۸ محدودیت‌های فنی

برای به‌کاربردن روش امپدانس، چسبندگی سلولی ضروری است. چسبندگی سلول‌ها در تعلیق با استفاده از یک ECM مناسب برای تسهیل این اتصال حاصل می‌شود که عبارتند از کلاژن^۱ ([90])، فیبرونکتین^۲ [91] یا پلی-ال-لیزین^۳ [92].

با این حال، گفته شد که محدودیت روش ECIS شامل شرط متوسط اندازه‌گیری تغییرات چسبندگی در تمام سلول‌های موجود در سطح میکروالکتروود بدون هیچ اطلاعاتی در مورد ماهیت دقیق^۴ چسبندگی یا تغییرات ریخت‌شناسی در سطح سلول‌های مجزا است. بنابراین پیشنهاد شد که میکروسکوپی سلول زنده DIC و تحلیل تصویر، به‌عنوان یک اندازه‌گیری تکمیلی برای تغییرات چسبندگی انجام شود تا تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های مجزا نشان داده شود [91].

همچنین مهم است که الکتروودها بیش از حد بارگذاری نشوند و بنابراین ارزیابی تداخل NMs آزمون‌شده با انجام آزمایشات رسانایی بدون سلول، در غلظت‌های NMs مورد استفاده برای ارزیابی سمیت سلول‌های مختلف، همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده‌است، انجام شود.

1- Collagen
2- Fibronectin
3- Poly-L-lysine
4- Precise

پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

روش‌های اجرایی پایه با استفاده از سامانه xCELLigence

الف-۱ کلیات

با توجه به مراجع علمی و مقالات، در حال حاضر پرکاربردترین سامانه امپدانس الکتروشیمیایی برای ارزیابی سمیت NMs، دستگاه xCelligence است. بنابراین، توصیف دقیق‌تر روش‌های مورد استفاده در ارزیابی سمیت NMs توجیه‌پذیر است.

الف-۲ صحنه‌گذاری سامانه

سامانه RTCA نمی‌تواند صحنه‌گذاری شود. هرچند، سامانه با یک سلول الکتروشیمیایی ساختگی^۱ می‌تواند تأیید شود.

الف-۳ تأیید سامانه

سامانه xCELLigence دارای یک پلیت مقاومتی است که برای تأیید دستگاه استفاده می‌شود. پلیت مقاومتی دارای اندازه مشابه با «ای-پلیت» متناظر^۲ است، یعنی همان تعداد چاهک را دارد که در آن، به جای یک آرایه میکروچسگر، یک آرایه مقاومت در هر موقعیت چاهک قرار گرفته است، به گونه‌ای که آن حسگر مقادیر مقاومت نزدیک به «ای-پلیت» متناظر را در زمانی که فقط محیط کشت‌های سلولی در هر چاهک قرار دارد، نشان می‌دهد. بنابراین، با این روش، کارکرد سامانه را می‌توان تأیید کرد. پلیت‌های مقاومت خاص این دستگاه نیستند. هر پلیت مقاومتی می‌تواند برای تأیید پلیت مقاومت در ایستگاه دیگر (مکان اختصاصی که پلیت میکروتیتر الکترونیکی «ای-پلیت» از همان نوع را در خود جای می‌دهد) استفاده شود.

الف-۴ سلول‌ها و کشت سلولی - آزمون برای غلظت کاشت

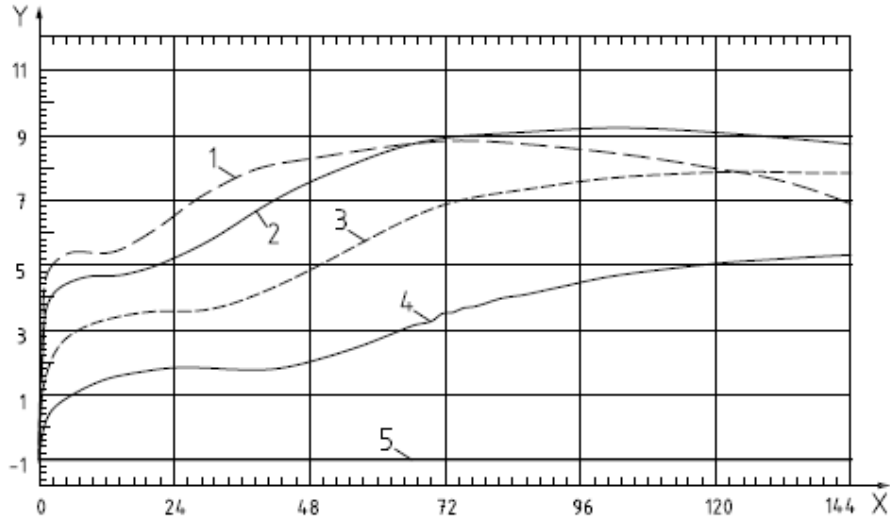
در هر دو پلیت میکروتیتر الکترونیکی ۱۶ چاهکی و ۹۶ چاهکی، حجم هر چاهک ۲۴۳ میکرولیتر است. باین حال توصیه می‌شود محتویات هر چاهک از ۲۰۰ میکرولیتر بیشتر نشود. برای تعیین غلظت بهینه کاشت سلولی و رشد سلولی در این حجم ویژه، آزمایشات اولیه «تیتراسیون سلولی»^۳ باید برای تعیین تراکم بهینه کاشت سلول و نقطه تیمار ترجیحی در مرحله رشدنمایی^۴ انجام شود. هنگامی که تراکم کاشت مشخص شد، این اطلاعات برای ارزیابی سمیت NMs استفاده می‌شود.

1- Dummy
2- Corresponding
3- Cell titration
4- Exponential

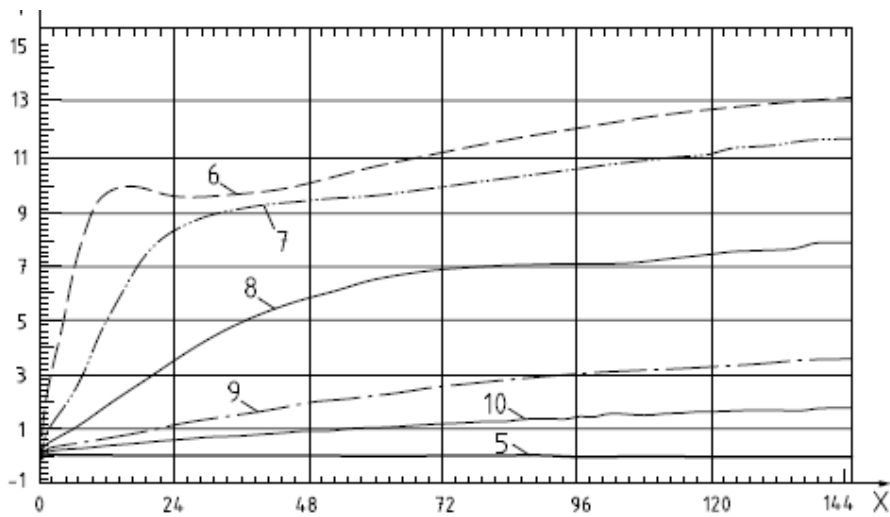
با این حال، در مواردی ممکن است «سلول‌های کنترل تیمار نشده» را نیز شامل شود که رشد سلولی مورد انتظار و پرشدگی کف چاهک^۱ را در طول آزمایش‌های آزمون سمیت، تأیید می‌کند.

توجه به این نکته حائز اهمیت است که تراکم‌های^۲ مختلف کاشت، منحنی‌های تکثیر متفاوتی را ایجاد می‌کنند (به شکل الف-۱ مراجعه شود) و این امر می‌تواند در زمان تیمار سلول‌ها تأثیرگذار باشد [90][93]. همانطور که در شکل الف-۱ نشان داده شده است، پروفایل (رخنمون)^۳ رشد و تراکم بهینه کاشت برای دو رده سلولی متفاوت است. در شکل الف-۱-الف، تراکم ۲۰۰۰۰ سلول می‌تواند برای آزمایش استفاده شود که در آن سلول‌ها در هر چاهک به مدت ۲۴ ساعت فرصت بازیابی^۴ پیدا می‌کنند و سپس تا ۷۲ ساعت تیمار می‌شوند. در شکل الف-۱-ب، تراکم ۶۲۵۰ سلول می‌تواند استفاده شود، سلول‌ها کاشته شده^۵ و فرصت داده می‌شود تا ۲۴ ساعت بازیابی و پس از آن تا ۵ روز تیمار شوند.

-
- 1- Confluency
 - 2- Densities
 - 3- Profile
 - 4- Recover
 - 5- Seeded



الف- چسبندگی سلول‌های اندوتلیال HMEC-1



ب- آستروسیت‌های NTera2/D1 (NT2)

راهنما:

X	زمان (h)
Y	شاخص سلولی
۱	۴۰۰۰۰ سلول
۲	۲۰۰۰۰ سلول
۳	۱۰۰۰۰ سلول
۴	۵۰۰۰ سلول
۵	۰ سلول
۶	۱۲۵۰۰ سلول
۷	۶۲۵۰ سلول
۸	۳۱۲۵ سلول
۹	۱۵۰۰ سلول
۱۰	۷۵۰ سلول

یادآوری- منحنی‌ها نشان‌دهنده میانگین مقدار شاخص سلولی بزرگتر از $4 \pm SD$ چاهک است [90].

شکل الف-۱- بهینه‌سازی مقادیر ایدئال کاشت

الف-۵ واکنشگرها

هر دستگاه به یک پلیت یک‌بار مصرف^۱ خاص برای اندازه‌گیری سلول نیاز دارد. سلول‌های مورد آزمون با استفاده از شرایط رشد و مکمل‌های مورد نیاز برای رده سلولی مورد استفاده و با استفاده از شرایط کشت بهینه، نگهداری می‌شوند. مواد آزمون برای سنجش رشد در صورت نیاز خریداری شده و با حلال‌های کنترل مناسب، استفاده می‌شوند.

به‌عنوان مثال، برای انجام یک آزمایش سمیت یا تیتراسیون سلولی پایه، واکنشگرهای زیر مورد نیاز است:

- رده سلولی مورد نظر، به‌عنوان مثال، سلول‌های BEAS-2B، سلول‌های CHO، سلول‌های HEK 293؛ سلول‌های HepG2، درشتخوارهای^۲ مشتق‌شده از مونوسیت U937؛
- مولکول ECM انتخابی، به‌عنوان مثال فیبرونکتین، کلاژن، پلی-ال-لیزین (در صورت لزوم)؛
- محیط کشت رشد مناسب برای کشت رده سلولی مورد نظر، به‌عنوان مثال، DMEM، EMEM و RPMI؛
- محیط کشت پایه مناسب برای استفاده در آزمایش؛
- ال-گلوتامین^۳ (در صورت نیاز)؛
- PBS؛
- FBS (در صورت نیاز)؛
- Trypsin-EDTA^۴ مناسب برای کشت سلولی؛
- BSA خالص $\leq 96\%$ (در صورت نیاز).

الف-۶ اندازه‌گیری رشد

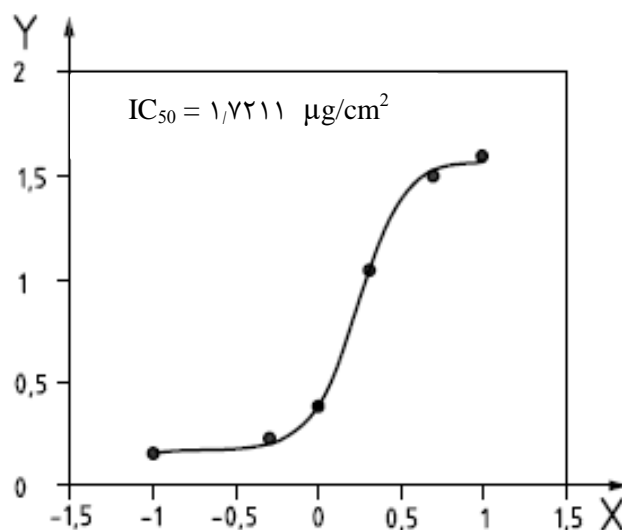
اندازه‌گیری سنجش رشد طبق دستورالعمل سازنده انجام می‌شود. به‌عنوان مثال، اندازه‌گیری با تغییر در مقادیر امپدانس تعیین می‌شود که در آن تکثیر و اتصال سلول‌ها با افزایش CI نمایش داده می‌شوند. اندازه‌گیری‌ها را می‌توان در صفحه «برنامه‌زمانی»^۵ تنظیم کرد. آزمایش‌ها را می‌توان به چند مرحله تقسیم کرد و هر مرحله شامل حداقل یک روبش^۶ است. هر روبش شامل یک اندازه‌گیری در تمام چاهک‌های انتخاب شده است و می‌تواند در یک بازه زمانی دلخواه تنظیم شود.

الف-۷ برآورد IC₅₀

این سامانه امکان محاسبه مقادیر IC₅₀ وابسته به‌زمان را در لحظه فراهم می‌کند (به شکل الف-۲ مراجعه شود) [۲۶]. به‌عنوان مثال، در جایی که هیچ سلولی وجود ندارد یا سلول چسبیده‌ای وجود ندارد، مقدار CI

1- Disposable
2- Macrophages
3- L-Glutamine
4- Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic acid
5- Schedule
6- Sweep

صفر است. از سوی دیگر، هنگامی که اتصال سلولی افزایش می‌یابد، مقادیر CI بزرگتر است. بنابراین، مقدار CI به تعداد سلول موجود در یک چاهک مربوط است. علاوه بر این، تغییرات در مقادیر CI نشانه‌ای از تغییرات در ریخت‌شناسی سلول، چسبندگی سلول یا زنده‌مانی سلولی است (به مرجع [89] مراجعه شود). با استفاده از نرم‌افزار دستگاه، امکان نمایش انحراف معیار CI، در نمونه‌های تکراری و همچنین ترسیم منحنی پاسخ دُز و مقدار IC_{50} وجود دارد.



راهنما:

X لگاریتم غلظت ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Y شاخص سلولی نرمال شده

شکل الف-۲- منحنی دُز-پاسخ و مقدار IC_{50} سلول‌های BEAS-2B تیمار شده با نانوذرات نقره [26]

این نرم‌افزار قادر است از داده‌های به‌دست‌آمده، مقادیر IC_{50} را محاسبه و نمایش دهد، جایی که سلول‌ها با یک ترکیب در غلظت‌های مختلف تیمار شده‌اند و می‌توانند با استفاده از روش‌های مختلف، به‌دست آیند.

- از منحنی پاسخ دُز می‌توان مقادیر IC_{50} را با استفاده از «معادله دُز-پاسخ سیگموئیدی»^۱ و اعمال برازش-منحنی^۲ به نقاط داده، محاسبه کرد.
- داده‌های کینتیکی در مورد اثربخشی^۳ و قدرت^۴ یک ترکیب (به‌عنوان مثال سمیت سلولی ناشی از ترکیب) از تغییرات مقادیر IC_{50} وابسته به زمان در یک بازه زمانی پس از تیمار با ترکیب موردنظر، تامین می‌شود.

1- Sigmoidal dose-response equation
2- Curve-fitting
3- Effectiveness
4- Potency

الف-۸ آزمون

هنگام افزودن یک ترکیب آزمون (به عنوان مثال NM)، پراکنه^۱ را با غلظت مطلوب آماده کنید و سپس محیط کشت قدیمی را با دقت برداشته و با محیط کشت تازه حاوی ترکیب آزمون جایگزین کنید.

توصیه می‌شود دمای نمونه مورد آزمون از قبل با دمای اتاق به تعادل رسیده باشد تا زمان کار^۲ به حداقل برسد (ترجیحاً کمتر از ۵ دقیقه)، زیرا سرد شدن سلول‌ها تا دمای اتاق بر رفتار سلولی و مقادیر CI تأثیر می‌گذارد. حجم محلول در چاهک‌ها نباید از ۲۰۰ $\mu\text{l}/\text{well}$ بیشتر شود.

الف-۹ طراحی آزمایش پایه

- قبل از هر آزمایش توصیه می‌شود کنترل چاهک‌ها شامل ارزیابی این موضوع باشد که آیا نانوذرات و نانوالیاف باعث تغییرات مستقیم در خوانش‌ها می‌شوند یا خیر، یعنی بدون سلول‌ها.
 - چاهک‌ها فقط با محیط کشت؛
 - چاهک‌هایی با محیط کشت و محیط کشت پراکنه (اگر محیط کشت رشد نباشد)؛
 - چاهک با محیط کشت و نانوماده پراکنش یافته (در بالاترین غلظت).
- قبل از کاشت سلول، با افزودن ۵۰ μl محیط کشت تکمیلی به هر چاهک در «ای-پلیت»، یک خط پایه خوانش برای دستگاه مشخص کنید.
- مدل‌های مختلف سلولی در یک حجم نهایی ۱۵۰ μl از محیط کشت کامل، کاشت شوند.
- اجازه دهید سلول‌ها حدود ۳۰ دقیقه پیش از قرار گرفتن در ایستگاه RTCA در یک گرم‌خانه^۳، به تعادل برسند.
- سپس به سلول‌ها اجازه داده شود تا قبل از تیمار در مدت زمان مناسبی تکثیر/بالغ شوند (تعداد سلول‌های بهینه با آزمایش تیتراسیون سلول تعیین می‌شود)، در این مدت، لازم است روبش‌های CI هر ۱۵ دقیقه به دست آورده شود.
- تیمار سلول‌ها با نانوذرات، در محدوده غلظت انتخاب شده، باید در محیط کشت‌های کامل تازه تهیه شده (حداکثر حجم ۲۰۰ μl) انجام شود.
- «ای-پلیت» را به ایستگاه RTCA در دمای ۳۷ °C، ۵٪ CO₂ و یک جو مرطوب شده، برگردانده شود.
- خوانش‌ها هر ۵ دقیقه برای ۲۴ ساعت اول و هر ۱۵ دقیقه برای بقیه آزمایش انجام شود.
 - سلول‌های تیمار نشده فقط محیط کشت‌های کامل تازه تهیه شده دریافت می‌کنند.
 - خوانش‌ها باید شامل چاهک‌های کنترل حاوی محیط کشت‌های کامل باشد.
- توصیه می‌شود مقادیر CI در نقطه تیمار نرمال شود تا تغییرپذیری بین چاهکی به حداقل برسد و امکان مقایسه بین چاهک‌ها برای تحلیل داده فراهم شود.

1- Dispersion
2- Handling
3- Incubator

الف-۱۰ خروجی داده

برخی از پارامترهایی که می‌توانند از سنجش‌ها برپایه سلول به‌دست آیند عبارتند از:

- متوسط CI (گراف خطی - CI برحسب زمان)؛
- انحراف استاندارد CI؛
- مقادیر IC₅₀ برای داده آزمایش، شامل روش‌های مختلف برای به‌دست آوردن مقادیر IC₅₀؛
- مقدار IC₅₀ وابسته به زمان؛
- منحنی‌های دُز-پاسخ؛
- نمایش نموداری تمام داده‌های نشان داده‌شده.

الف-۱۱ نگهداری و تمیزکاری

توصیه می‌شود دستورالعمل‌های سازنده دستگاه برای نگهداری و تمیزکاری این دستگاه خاص رعایت شود.

پیوست ب

(آگاهی‌دهنده)

مطالعات موردی با استفاده از روش‌های عملیاتی استاندارد برای راه‌اندازی آزمایش
xCELLigence با مدل‌های سلولی مختلف

ب-۱ سلول‌های اپیتلیال برونش انسان (BEAS-2B) - طراحی آزمایش پایه

- قبل از کاشت سلول، با افزودن ۵۰ μl محیط کشت مکمل به هر چاهک «ای-پلیت»، یک خوانش خط‌پایه برای دستگاه مشخص کنید.

- کاشت مدل‌های سلولی مختلف در یک حجم نهایی ۱۵۰ μl محیط کشت کامل: سلول‌های BEAS-2B در ۱۰۰۰۰ cells/well (5×10^4 cells/cm²) کاشته می‌شوند.

- قبل از قرار گرفتن در ایستگاه RTCA در یک گرم‌خانه، اجازه دهید تقریباً ۳۰ دقیقه دمای سلول‌ها با دمای محیط به تعادل برسد.

- سپس به سلول‌ها اجازه داده شود تا به مدت ۲۴ ساعت قبل از تیمار تکثیر شوند و در طی این مدت هر ۱۵ دقیقه خوانش‌های CI انجام شود.

- تیمار سلول‌ها با نانوذرات، در محدوده غلظت انتخاب شده، باید در محیط کشت‌های کامل و تازه تهیه‌شده (حجم نهایی ۱۵۰ μl) انجام شود.

- «ای-پلیت» به ایستگاه RTCA در دمای ۳۷ °C، ۵٪ CO₂ و یک جو مرطوب‌شده، برگردانده شود.

- خوانش‌ها هر ۵ دقیقه برای ۲۴ ساعت اول و هر ۱۵ دقیقه برای بقیه آزمایش انجام شود.

- سلول‌های تیمارنشده فقط محیط کشت‌های کامل تازه تهیه‌شده دریافت می‌کنند.

- باید چاهک‌های کنترل حاوی محیط کشت‌های کامل و چاهک‌های حاوی بالاترین غلظت NP حاوی محیط کشت‌های کامل باشند.

- توصیه می‌شود در نقطه تیمار، مقادیر CI نرمال شود تا تغییرپذیری بین‌چاهکی به حداقل برسد و امکان مقایسه بین چاهک‌ها برای تحلیل داده‌ها فراهم شود.

ب-۲ سلول‌های تخمدان هامستر چینی (CHO) - طراحی آزمایش پایه

- قبل از کاشت سلول، با افزودن ۵۰ μl محیط کشت کامل به هر چاهک «ای-پلیت»، یک خوانش پایه برای دستگاه مشخص کنید.

- کاشت مدل‌های سلولی مختلف در یک حجم نهایی $150 \mu\text{l}$ محیط کشت مکمل: سلول‌های CHO در 3000 cells/well ($1/5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$) کاشته می‌شوند.
- قبل از قرار گرفتن در ایستگاه RTCA در یک گرم‌خانه، اجازه دهید تقریباً ۳۰ دقیقه دمای سلول‌ها با دمای محیط به تعادل برسد.
- سپس به سلول‌ها اجازه داده شود تا به مدت ۲۴ ساعت قبل از تیمار تکثیر شوند و در طی این مدت هر ۱۵ دقیقه خوانش‌های CI انجام شود.
- تیمار سلول‌ها با نانوذرات، در محدوده غلظت انتخاب‌شده، باید در محیط کشت‌های کامل و تازه تهیه‌شده (حجم نهایی $150 \mu\text{l}$) انجام شود.
- «ای-پلیت» به ایستگاه RTCA در دمای 37°C ، $5\% \text{ CO}_2$ و یک جو مرطوب‌شده، برگردانده شود.
- خوانش‌ها هر ۵ دقیقه برای ۲۴ ساعت اول و هر ۱۵ دقیقه برای بقیه آزمایش، انجام شود.
- سلول‌های تیمارنشده فقط محیط کشت‌های مکمل تازه تهیه‌شده دریافت می‌کنند.
- باید چاهک‌های کنترل حاوی محیط کشت‌های مکمل و چاهک‌های حاوی بالاترین غلظت NP، حاوی محیط کشت‌های کامل باشند.
- توصیه می‌شود در نقطه تیمار مقادیر CI نرمال شود تا تغییرپذیری بین چاهکی به حداقل برسد و امکان مقایسه بین چاهک‌ها برای آنالیز داده‌ها فراهم شود.

ب-۳ سلول‌های ۲۹۳ کلیه جنین انسانی (HEK 293) - طراحی آزمایش پایه

- قبل از کاشت سلول، با افزودن $50 \mu\text{l}$ محیط کشت کامل به هر چاهک «ای-پلیت»، یک خوانش خط‌پایه برای دستگاه مشخص کنید.
- کاشت مدل‌های سلولی مختلف در یک حجم نهایی $150 \mu\text{l}$ محیط کشت کامل: سلول‌های HEK 293 در 50000 cells/well ($2/5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$) کاشته می‌شوند.
- قبل از قرار گرفتن در ایستگاه RTCA در یک گرم‌خانه، اجازه دهید تقریباً ۳۰ دقیقه دمای سلول‌ها با دمای محیط به تعادل برسد.
- سپس به سلول‌ها اجازه داده شود تا به مدت ۲۴ ساعت قبل از تیمار تکثیر شوند و در طی این مدت هر ۱۵ دقیقه خوانش‌های CI انجام شود.
- تیمار سلول‌ها با نانوذرات، در محدوده غلظت انتخاب‌شده، باید در محیط کشت‌های کامل و تازه تهیه‌شده (حجم نهایی $150 \mu\text{l}$) انجام شود.
- «ای-پلیت» به ایستگاه RTCA با دمای 37°C ، $5\% \text{ CO}_2$ و یک جو مرطوب‌شده، برگردانده شود.

- خوانش‌ها هر ۵ دقیقه برای ۲۴ ساعت اول و هر ۱۵ دقیقه برای بقیه آزمایش، انجام شود.
- سلول‌های تیمارنشده فقط محیط‌کشت‌های کامل تازه تهیه‌شده دریافت می‌کنند.
- باید چاهک‌های کنترل حاوی محیط‌کشت‌های کامل و چاهک‌های حاوی بالاترین غلظت NP، حاوی محیط‌کشت‌های کامل باشند.
- توصیه می‌شود در نقطه تیمار مقادیر CI نرمال شود تا تغییرپذیری بین چاهکی به حداقل برسد و امکان مقایسه بین چاهک‌ها برای آنالیز داده‌ها فراهم شود.

ب-۴ سلول‌های سرطانی کبد انسانی (HepG2)

ب-۴-۱ پوشش پلی-ال-لیزین سکوی^۱ کاشت «ای-پلیت»

سکوی کاشت «ای-پلیت» باید با پلی-ال-لیزین پوشانده شود تا به چسبندگی سلول‌های HepG2 کمک کند.

- با افزودن ۱۰۰ μl از محلول پلی-ال-لیزین $150 \mu\text{g/ml}$ هر چاهک «ای-پلیت» را بپوشانید.
- اجازه دهید پلیت به مدت یک شب در دمای اتاق در یک محفظه زیست‌ایمن^۲ گذاشته شود.
- پس از مرحله پوشش، توصیه می‌شود «ای-پلیت» دو بار با $1 \times \text{PBS}$ شسته شود و قبل از استفاده اجازه داده شود تا یک شب خشک شود.

ب-۴-۲ طراحی آزمایش پایه

- قبل از کاشت سلول، با افزودن ۵۰ μl محیط‌کشت مکمل به هر چاهک «ای-پلیت»، یک خوانش پایه برای دستگاه ایجاد/مقرر/فراهم کنید.
- کاشت مدل‌های سلولی مختلف در حجم نهایی ۱۵۰ μl محیط‌کشت مکمل: سلول‌های HepG2 در 10000 cells/well ($5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$) کاشته می‌شوند.
- قبل از قرارگرفتن در ایستگاه RTCA در یک گرم‌خانه، اجازه دهید تقریباً ۳۰ دقیقه دمای سلول‌ها با دمای محیط به تعادل برسد.
- سپس به سلول‌ها اجازه داده شود تا به مدت ۲۴ ساعت قبل از تیمار تکثیر شوند و در طی این مدت هر ۱۵ دقیقه خوانش‌های CI انجام شود.
- تیمار سلول‌ها با نانوذرات، در محدوده غلظت انتخاب‌شده، باید در محیط‌کشت‌های کامل و تازه تهیه‌شده (حجم نهایی ۱۵۰ μl) انجام شود.

1- Platform
2- Biosafety cabinet

- «ای-پلیت» را به ایستگاه RTCA با دمای 37°C ، CO_2 ۵٪ و یک جو مرطوب شده، برگردانید.
- خوانش‌ها هر ۵ دقیقه برای ۲۴ ساعت اول و هر ۱۵ دقیقه برای بقیه آزمایش، انجام شود.
- سلول‌های تیمار نشده فقط محیط کشت‌های کامل تازه تهیه شده دریافت می‌کنند.
- چاهک‌های کنترل حاوی محیط کشت‌های کامل و چاهک‌های حاوی بالاترین غلظت NP، باید حاوی محیط کشت‌های کامل باشند.
- توصیه می‌شود در نقطه تیمار مقادیر CI نرمال شود تا تغییرپذیری بین چاهکی به حداقل برسد و امکان مقایسه بین چاهک‌ها برای آنالیز داده‌ها فراهم شود.

ب-۵ درشت‌خوارهای مشتق شده از مونوسیت U937

ب-۵-۱ پوشش فیبرونکتین سکوی کاشت «ای-پلیت»

- سکوی کاشت «ای-پلیت» باید با پلی-ال-لیزین پوشانده شود تا به چسبندگی درشت‌خوارهای U937 (رده سلولی نیمه-چسبنده^۱) کمک کند.
- «ای-پلیت» باید با فیبرونکتین $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ پوشانده شود.
- اجازه دهید پلیت به مدت یک ساعت در دمای اتاق در یک محفظه زیست ایمن گذاشته شود.
- به دنبال مرحله پوشش دهی باید «ای-پلیت» یک بار با $\text{PBS} \times 1$ شسته شود و قبل از استفاده اجازه داده شود تا یک شب خشک شود.

ب-۵-۲ طراحی آزمایش پایه

- قبل از کاشت سلول، با افزودن $50 \mu\text{l}$ محیط کشت کامل به هر چاهک «ای-پلیت»، یک خوانش پایه برای دستگاه مشخص کنید.
- کاشت مدل‌های سلولی مختلف در حجم نهایی $150 \mu\text{l}$ محیط کشت کامل:
- مونوسیت U 937 با 32 nM از محلول PMA^۲ در هر میلی‌لیتر از تعلیق سلولی، تحریک^۳ می‌شوند و در 25000 cells/well ($1.25 \times 10^5 \text{ cells}/\text{cm}^2$) کاشته می‌شوند.
- قبل از قرارگرفتن در ایستگاه RTCA در یک گرم‌خانه، اجازه دهید تقریباً ۳۰ دقیقه دمای سلول‌ها با دمای محیط به تعادل برسد.

1- Semi-adherent cell line
2- Phorbol myristate acetate
3- Stimulated

- سپس به سلول‌ها اجازه داده شود تا به مدت ۷۲ ساعت قبل از تیمار تکثیر شوند و در طی این مدت هر ۱۵ دقیقه خوانش‌های CI انجام شود.
- تیمار سلول‌ها با نانوذرات، در محدوده غلظت انتخاب‌شده، باید در محیط‌کشت‌های کامل و تازه تهیه‌شده (حجم نهایی ۱۵۰ μ l) انجام شود.
- «ای-پلیت» را به ایستگاه RTCA با دمای 37°C ، CO_2 ۵٪ و یک جو مرطوب‌شده، برگردانید.
- خوانش‌ها هر ۵ دقیقه برای ۲۴ ساعت اول و هر ۱۵ دقیقه برای بقیه آزمایش، انجام شود.
- سلول‌های تیمارنشده فقط محیط‌کشت‌های کامل تازه تهیه‌شده دریافت می‌کنند.
- چاهک‌های کنترل حاوی محیط‌کشت‌های کامل و چاهک‌های حاوی بالاترین غلظت NP باید حاوی محیط‌کشت‌های کامل باشند.
- توصیه می‌شود در نقطه تیمار مقادیر CI نرمال شود تا تغییرپذیری بین‌چاهکی به حداقل برسد و امکان مقایسه بین چاهک‌ها برای آنالیز داده‌ها فراهم شود.

کتابنامه

- [1] Oostingh G. J., Casals E., Italiani P., Colognato R., Stritzinger R., Ponti J., Pfaller T., Kohl Y., Ooms D., Favilli F., Leppens H., Lucchesi D., Rossi F., Nelissen I., Thielecke H., Puentes V. F., Duschl A., Boraschi D. 2011. , Problems and challenges in the development and validation of human cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects. Part Fibre Toxicol, **8**, 8.
- [2] Guadagnini R., Halamoda Kenzaoui B., Walker L., Pojana G., Magdolenova Z., Bilanicova D., Saunders M., Juillerat-Jeanneret L., Marcomini A., Huk A., Dusinska M., Fjellsbo L. M., Marano F., Boland S. 2015. , Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic *in vitro* tests. Nanotoxicology, **9** Suppl 1, 13-24.
- [3] Kroll A., Pillukat M. H., Hahn D., Schneidenburger J. 2009. , Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. Eur J Pharm Biopharm, **72**, 370-7.
- [4] Amendola V., Bakr O. M., Stellacci F. 2010. , A Study of the Surface Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles by the Discrete Dipole Approximation Method: Effect of Shape, Size, Structure, and Assembly. Plasmonics, **5**, 85-97.
- [5] Forest V., Figarol A., Boudard D., Cottier M., Grosseau P., Pourchez J. 2015. , Adsorption of lactate dehydrogenase enzyme on carbon nanotubes: how to get accurate results for the cytotoxicity of these nanomaterials. Langmuir, **31**, 3635-43.
- [6] Belyanskaya L., Manser P., Spohn P., Bruinink A., Wick P., 2007. The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction. *45*, 2643-2648.
- [7] Giaever I., Keese C. R. 1991. , Micromotion of mammalian cells measured electrically. Proc Natl Acad Sci U S A, **88**, 7896-900.
- [8] Tiruppathi C., Malik A. B., Del Vecchio P. J., Keese C. R., Giaever I. 1992. , Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. Proc Natl Acad Sci U S A, **89**, 7919-23.
- [9] Alexander F. A. jr, Celestin M., Price D. T., Nanjundan M., Bhansali S. 2013. , Design and validation of a multi-electrode bioimpedance system for enhancing spatial resolution of cellular impedance studies. Analyst, **138**, 3728-34.
- [10] Giaever I., Keese C. R. 1993. , A morphological biosensor for mammalian cells. Nature, **366**, 591-2.
- [11] Xiao C., Luong J. H. 2003. , On-line monitoring of cell growth and cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing (ECIS). Biotechnol Prog, **19**, 1000-5.
- [12] Xiao C., Lachance B., Sunahara G., Luong J. H. 2002. , Assessment of cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing: concentration and time response function approach. Anal Chem, **74**, 5748-53.
- [13] Xing J. Z., Zhu L., Jackson J. A., Gabos S., Sun X. J., Wang X. B., Xu X. 2005. , Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors. Chem Res Toxicol, **18**, 154-61.
- [14] Ceriotti L., Ponti J., Broggi F., Kob A., Drechsler S., Thedinga E., Colpo P., Sabbioni E., Ehret R., Rossi F. 2007a. , Real-time assessment of cytotoxicity by impedance measurement on a 96-well plate. Sensors and Actuators B: Chemical, **123**, 769-778.
- [15] Scrace S., O'Neill E., Hammond E. M., Pires I. M. 2013. , Use of the xCELLigence system for real-time analysis of changes in cellular motility and adhesion in physiological conditions. Methods Mol Biol, **1046**, 295-306.
- [16] Ceriotti L., Ponti J., Colpo P., Sabbioni E., Rossi F. 2007b. , Assessment of cytotoxicity by impedance spectroscopy. Biosens Bioelectron, **22**, 3057-63.
- [17] Han A., Yang L., Frazier A. B. 2007. , Quantification of the heterogeneity in breast cancer cell lines using whole-cell impedance spectroscopy. Clin Cancer Res, **13**, 139-43.
- [18] Gomez R., Bashir R., Sarikaya A., Ladisch M. R., Sturgis J., Robinson J. P., Geng T., Bhunia A. K., Apple H. L., Wereley S., 2001. Microfluidic Biochip for Impedance Spectroscopy of Biological Species. Biomed Microdev, **3**.
- [19] Heileman K., Daoud J., Tabrizian M. 2013. , Dielectric spectroscopy as a viable biosensing

- tool for cell and tissue characterization and analysis. *Biosens Bioelectron*, **49**, 348-59.
- [20] Zhang X., Li F., Nordin A. N., Tarbell J., Voiculescu I. 2015. , Toxicity studies using mammalian cells and impedance spectroscopy method. *Sensing and Bio-Sensing Research*, **3**, 112-121.
- [21] Solly K., Wang X., Xu X., Strulovici B., Zheng W. 2004. , Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev Technol*, **2**, 363-72.
- [22] Irelan J. T., Wu M. J., Morgan J., Ke N., Xi B., Wang X., Xu X., Abassi Y. A. 2011. , Rapid and quantitative assessment of cell quality, identity, and functionality for cell-based assays using real-time cellular analysis. *J Biomol Screen*, **16**, 313-22.
- [23] Pan T., Huang B., Zhang W., Gabos S., Huang D. Y., Devendran V. 2013a. , Cytotoxicity assessment based on the AUC50 using multi-concentration time-dependent cellular response curves. *Anal Chim Acta*, **764**, 44-52.
- [24] Pan T., Khare S., Ackah F., Huang B., Zhang W., Gabos S., Jin C., Stampfl M. 2013b. , *In vitro* cytotoxicity assessment based on KC(50) with real-time cell analyzer (RTCA) assay. *Comput Biol Chem*, **47**, 113-20.
- [25] Keogh R. J. 2010. , New technology for investigating trophoblast function. *Placenta*, **31**, 347-50.
- [26] Urcan E., Haertel U., Styllou M., Hickel R., Scherthan H., Reichl F. X. 2010. , Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent Mater*, **26**, 51-8.
- [27] [27] Atienza J. M., Yu N., Kirstein S. L., Xi B., Wang X., Xu X., Abassi Y. A. 2006. , Dynamic and label-free cell-based assays using the real-time cell electronic sensing system. *Assay Drug Dev Technol*, **4**, 597-607.
- [28] [28] Atienzar F. A., Gerets H., Tilmant K., Toussaint G., Dhalluin S. 2013. , Evaluation of impedance-based label-free technique as a tool for pharmacology and toxicology investigations. *Biosensors (Basel)*, **3**, 132-56.
- [29] Yeon J. H., Park J. K. 2005. , Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip. *Anal Biochem*, **341**, 308-15.
- [30] Lei K. F. 2014. , Review on impedance detection of cellular responses in micro/nano environment, *Micromachines*, **5**, 1-12.
- [31] Giaever I., Keese C. R. 1984. , Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 3761-3764.
- [32] Ehret R., Baumann W., Brischwein M., Schwinde A., Stegbauer K., Wolf K. B. 1997. , Monitoring of cellular behavior by impedance measurements on interdigitated electrode structures, *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 29-41.
- [33] Lei K. F., Tseng H. P., Lee C. Y., Tsang N. M., 2016. Quantitative study of cell invasion process under extracellular stimulation of cytokine in a microfluidic device, *Sci. Rep.*, **6**, 25557 (8pp).
- [34] Liu L., Xiao X., Lei K. F., Huang C. H., 2015. Quantitative impedimetric monitoring of cell migration under the stimulation of cytokine or anti-cancer drug in a microfluidic chip, *Biomicrofluidics*, **9**, 034109 (11pp).
- [35] Darbre P. D., Bakir A., Iskakova E. 2013. , Effect of aluminium on migratory and invasive properties of MCF-7 human breast cancer cells in culture, *J. Inorg. Biochem.*, **128**, 245-249.
- [36] Dowling C. M., Herranz Ors C., Kiely P. A., 2014. Using real time impedance-based assays to monitor the effects of fibroblast-derived media on the adhesion, proliferation, migration and invasion of colon cancer cells, *Biosci. Rep.*, **34**, e00126 (17pp).
- [37] Moela P., Choene M. M. S., Motadi L. R. 2014. , Silencing RBBP6 (retinoblastoma binding protein 6) sensitizes breast cancer cells MCF7 to staurosporine and camptothecin-induced cell death, *Immunobiology*, **219**, 593-601.
- [38] Lei K. F., Wu M. H., Hsu C. W., Chen Y. D. 2014. , Real-time and non-invasive impedimetric monitoring of cell proliferation and chemosensitivity in a perfusion 3D cell culture microfluidic chip, *Biosens. Bioelectron.*, **51**, 16-21.

- [39] Lei K. F., Wu Z. M., Huang C. H. 2015. , Impedimetric quantification of the formation process and the chemosensitivity of cancer cell colonies suspended in 3D environment, *Biosens. Bioelectron.*, **74**, 878–885.
- [40] Erbaykent-Tepedelen B., Ozmen B., Varisli L., Gonen-Korkmaz C., Debelec-Butuner B., Muhammed Syed H., Yilmazer-Cakmak O., Korkmaz K.S. 2011. , NKX3.1 contributes to S phase entry and regulates DNA damage response (DDR) in prostate cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* **414**:123-8.
- [41] Rahim S., Üren A. 2011. , A real-time electrical impedance based technique to measure invasion of endothelial cell monolayer by cancer cells. *J Vis Exp.* pii: 2792.
- [42] Kim Y.R., Lee S.E., Kang I.C., Nam K.I., Choy H.E., Rhee J.H. 2013. , A bacterial RTX toxin causes programmed necrotic cell death through calcium mediated mitochondrial dysfunction. *J Infect Dis.* **207**(9), 1406-15.
- [43] Szabo C., Coletta C., Chao C., Módis K., Szczesny B., Papapetropoulos A., Hellmich M.R. 2013. , Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine- β -synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **110**(30):12474-9.
- [44] Hondroulis E., Liu C., Li C. Z. 2010. , Whole cell based electrical impedance sensing approach for a rapid nanotoxicity assay. *Nanotechnology*, **21**, 315103.
- [45] Mu Q., Zhai S., Yan B. 2010. , Real-time monitoring of cellular responses to carbon nanotubes. *Methods Mol Biol*, **625**, 85-94.
- [46] [46] Xu C., Liu Q., Liu H., Zhang C., Shao W., Gu A. 2016. , Toxicological assessment of multi-walled carbon nanotubes *in vitro*: potential mitochondria effects on male reproductive cells. *Oncotarget*, **7**, 39270-39278.
- [47] Dekali S., Bachelet C., Maunoir-Regimbal S., Flahaut E., Debouzy J. C., Crouzier D. 2016. , Biological effects of double-walled carbon nanotubes on the innate immune system: An *in vitro* study on THP-1 human monocytes. *Toxicology*, **365**, 1-8.
- [48] Hondroulis E., Zhang Z., Chen C., Li C.-Z., Impedance Based Nanotoxicity Assessment of Graphene Nanomaterials at the Cellular and Tissue Level. *Analytical Letters*, **45**: 272–282, 2012
- [49] Zakrzewska K. E., Samluk A., Wierzbicki M., Jaworski S., Kutwin M., Sawosz E., Chwalibog A., Pijanowska D. G., Pluta K. D. 2015. , Analysis of the cytotoxicity of carbon-based nanoparticles, diamond and graphite, in human glioblastoma and hepatoma cell lines. *PLoS One*, **10**, e0122579
- [50] Seiffert J. M., Baradez M. O., Nischwitz V., Lekishvili T., Goenaga-Infante H., Marshall D. 2012. , Dynamic monitoring of metal oxide nanoparticle toxicity by label free impedance sensing. *Chem Res Toxicol*, **25**, 140-52.
- [51] Otero-Gonzalez L., Sierra-Alvarez R., Boitano S., Field J. A. 2012. , Application and validation of an impedance-based real time cell analyzer to measure the toxicity of nanoparticles impacting human bronchial epithelial cells. *Environ Sci Technol*, **46**, 10271-8.
- [52] Sergeant J. A., Paget V., Chevillard S. 2012. , Toxicity and genotoxicity of nano-SiO₂ on human epithelial intestinal HT-29 cell line. *Ann Occup Hyg*, **56**, 622-30.
- [53] [53] Bohmert L., Niemann B., Thunemann A. F., Lampen A. 2012. , Cytotoxicity of peptide-coated silver nanoparticles on the human intestinal cell line Caco-2. *Arch Toxicol*, **86**, 1107-15.
- [54] Vetten M. A., Tlotleng N., Tanner Rascher D., Skepu A., Keter F. K., Boodhia K., Koekemoer L. A., Andraos C., Tshikhudo R., Gulumian M. 2013. , Label-free *in vitro* toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines. *Part Fibre Toxicol*, **10**, 50.
- [55] Guo D., Wu C., Li J., Guo A., Li Q., Jiang H., Chen B., Wang X. 2009. , Synergistic Effect of Functionalized Nickel Nanoparticles and Quercetin on Inhibition of the SMMC-7721 Cells Proliferation. *Nanoscale Res Lett*, **4**, 1395-402.
- [56] Le T. T. D., Ha P. T., Tran T. H. Y., Nguyen D. T., Nguyen H. N., Bui V. K., Hoang M. N. 2016. , *In vitro* evaluation of Aurora kinase inhibitor—VX680—in formulation of PLA-

- TPGS nanoparticles. Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol. 7 025010.
- [57] Varshney M., Li Y. 2009. , Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells. Biosens. Bioelectron., **24**, 2951–2960.
- [58] Yang L., Li Y., Griffis C. L., Johnson M. G. 2004. , Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*. Biosens Bioelectron, **19**, 1139-47
- [59] Pethig R., Markx R.H. 1997. , Applications of dielectrophoresis in biotechnology. Trends Biotechnol., **15**, 426–432.
- [60] Ke N., Wang X., Xu X., Abassi Y. A. 2011. , The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. Methods Mol Biol, **740**, 33-43.
- [61] Coffman F. D., Cohen S. 2013. , Impedance measurements in the biomedical sciences. Stud Health Technol Inform, **185**, 185-205.
- [62] Curtis T. M., Widder M. W., Brennan L. M., Schwager S. J., Van Der Schalie W. H., Fey J., Salazar N. 2009. , A portable cell-based impedance sensor for toxicity testing of drinking water. Lab Chip, **9**, 2176-83.
- [63] Cheung K. C., Di Berardino M., Schade-Kampmann G., Hebeisen M., Pierzchalski A., Bocsi J., Mittag A., Tarnok A. 2010. , Microfluidic impedance-based flow cytometry. Cytometry A, **77**, 648-66.
- [64] Grahame D. C. 1947. , The electrical double layer and the theory of electrocapillarity. Chemical Reviews, **41**, 441–501.
- [65] Lasia A. 1999. , Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications. Modern Aspects of Electrochemistry, **32**, 143–248.
- [66] Canali C, Heiskanen A., Muhammad H. B., Høyum P., Pettersen F.-J., Hemmingsen M., Wolff A., Dufva M., Martinsen Ø. G., Emnéus J. 2015. , Bioimpedance monitoring of 3D cell culturing—Complementary electrode configurations for enhanced spatial sensitivity. Biosensors and Bioelectronics **63**, 72–79.
- [67] Sarro E., Lecina M., Fontova A., Godia F., Bragos R., Cairo J. J. 2016. , Real-time and on-line monitoring of morphological cell parameters using electrical impedance spectroscopy measurements. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **91**, 1755-1762.
- [68] Thielecke H., Mack A., Robitzki A. A. 2001. , Multicellular spheroid-based sensor for anti-cancer therapeutics. Biosens Bioelectron. **16**:261–269.
- [69] KLOBD., KURZ, R., JAHNKE, H.G., FISCHER, M., ROTHERMEL, A., ANDEREGG, U., SIMON, J.C., ROBITZKI, A.A. 2008. , Microcavity array (MCA)-based biosensor chip for functional drug screening of 3D tissue models. Biosens Bioelectron. **23**:1473–1480.
- [70] Chuang H.-S., Raizen D.M., Lamb A., Dabbish N., Bau H.H. 2011. , Dielectrophoresis of *Caenorhabditis elegans*. Lab Chip. **11**:599–604. [PubMed: 21225036]
- [71] Zhang B., Li Y., He Q., Qin J., Yu Y., Li X., Zhang L., Yao M., Liu J., Chen Z. 2014. , Microfluidic platform integrated with worm-counting setup for assessing manganese toxicity. Biomicrofluidics. **8**:54110
- [72] Hu C., Dillon J., Kearn J., Murray C., O'Connor V., Holden-Dye L., Morgan H., Dupuy D. 2013. , NeuroChip: A Microfluidic Electrophysiological Device for Genetic and Chemical Biology Screening of *Caenorhabditis elegans* Adult and Larvae. PLoS One. **8**:e64297. [PubMed: 23717588]
- [73] Bakhtina N.A., Korvink J.G. 2014. , Microfluidic laboratories for *C. elegans* enhance fundamental studies in biology. RSC Adv.; **4**:4691–4709.
- [74] Wang R.Y., Zhang T., Bao Q., Rawson D.M. 2006. , Study on fish embryo responses to the treatment of cryoprotective chemicals using impedance spectroscopy. Eur Biophys J. **35**:224–230.
- [75] Wang R.Y., Guan M., Rawson D.M., Zhang T. 2008. , Ultrasound enhanced methanol penetration of zebrafish (*Danio rerio*) embryos measured by permittivity changes using impedance spectroscopy. Eur Biophys J. **37**:1039–1044.
- [76] Houssin T., Follet J., Follet A., Dei-Cas E., Senez V., 2009. Label-free analysis of water-polluting parasite by electrochemical impedance spectroscopy. Biosens Bioelectron. 2010.

- 25:1122-9. doi: 10.1016/j.bios.2009.09.039. Epub 2009 Oct 7.
- [77] Smout M.J., Kotze A.C., Mccarthy J.S., Loukas A.2010. , A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility. *PLoS Neglected Trop Dis.* **4**:e885.
- [78] Rinaldi G., Loukas A., Brindley P.J., Irelan J.T., Smout M.J.2015. , Viability of developmental stages of *Schistosoma mansoni* quantified with xCELLigence worm real-time motility assay (xWORM). *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* **5**:141–148.
- [79] Alexander F. A.jr, Huey E. G., Price D. T., Bhansali S.2012. , Real-time impedance analysis of silica nanowire toxicity on epithelial breast cancer cells. *Analyst*, **137**, 5823–5828
- [80] Male K.B., Lachance B., Hrapovic S., Sunahara G., Luong J.H., 2008. Assessment of Cytotoxicity of Quantum Dots and Gold Nanoparticles Using Cell-Based Impedance Spectroscopy Article in *Analytical Chemistry*. **80**, 5487-93.
- [81] Bayford R., Tizzard A.2012. , Bioimpedance imaging: an overview of potential clinical applications. *Analyst*, **137**, 4635-4643
- [82] Hancong W., Yang Y., Bagnaninchi P. O.JIA JI. 2018. , Electrical impedance tomography for real-time and label-free cellular viability assays of 3D tumour spheroids. *Analyst*, **143**, 4189-4198
- [83] ACEA, 2013. Biosciences, The xCELLigence System, San Diego, USA. www.aceabio.com
- [84] Moodley K., Angel C. E., Glass M., Graham E. S.2011. , Real-time profiling of NK cell killing of human astrocytes using xCELLigence technology. *J Neurosci Methods*, **200**, 173-80.
- [85] Golke A., Cymerys J., Slonska A., Dzieciatkowski T., Chmielewska A., Tucholska A., Banbura M. W.2012. , The xCELLigence system for real-time and label-free analysis of neuronal and dermal cell response to equine herpesvirus type 1 infection. *Pol J Vet Sci*, **15**, 151-3.
- [86] ROCHE, 2008. Diagnostics GmbH. Introduction of the RTCA SP Instrument. RTCA SP. Instrument Operator's Manual, A. ACEA Biosciences, Inc., pp. 14–16.
- [87] Xing J. Z., Zhu L., Gabos S., Xie L.2006. , Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity. *Toxicol In Vitro*, **20**, 995-1004.
- [88] Huang L., Xie L., Boyd J. M., Li X. F.2008. , Cell-electronic sensing of particle-induced cellular responses. *Analyst*, **133**, 643-8.
- [89] OECD 2015. *Dossier on Gold Nanoparticles, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials, No. 44, unclassified document ENV/JM/MONO(2015)7*.
- [90] Kho D., Macdonald C., Johnson R., Unsworth C. P., O'Carroll S. J., Du Mez E., Angel C. E., Graham E. S.2015. , Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. *Biosensors (Basel)*, **5**, 199-222.
- [91] Rees M. D., Thomas S. R.2015. , Using cell-substrate impedance and live cell imaging to measure real-time changes in cellular adhesion and de-adhesion induced by matrix modification. *J Vis Exp*.
- [92] Liberio M. S., Sadowski M. C., Soekmadji C., Davis R. A., Nelson C. C.2014. , Differential effects of tissue culture coating substrates on prostate cancer cell adherence, morphology and behavior. *PLoS One*, **9**, e112122.
- [93] Abassi Y. A., Xi B., Zhang W., Ye P., Kirstein S. L., Gaylord M. R., Feinstein S. C., Wang X., Xu X.2009. , Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. *Chem Biol*, **16**, 712-23.