

PACS numbers: 61.05.cp, 61.43.Gt, 75.50.Tt, 75.60.Ej, 81.07.Wx, 87.50.wf, 87.85.jj

Синтез, биологическая активность и цитотоксичность нанопорошков на основе Fe_3O_4

В. В. Кирошка, Н. В. Репин, В. М. Надутов*, А. Е. Перекос*,
В. З. Войнаш*, Ю. О. Тищенко, Т. П. Бондаренко

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
ул. Переяславская, 23,
61015 Харьков, Украина*

**Институт металлофизики им. Г. В. Курдюмова НАН Украины,
бульв. Акад. Вернадского, 36,
03680, ГСП, Киев-142, Украина*

В данной работе получен нанопорошок Fe_3O_4 , определены его фазовый состав, дисперсность частиц и магнитные характеристики. Выполнен анализ способности магнетита Fe_3O_4 адсорбировать белковые компоненты культуральных сред, а также исследованы цитотоксичность наночастиц и характер их взаимодействия с культурой альвеолярных макрофагов (АМ) в зависимости от концентрации и времени инкубации. Анализ микроструктуры наночастиц в среде, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС), показал, что наличие белкового компонента в среде культивирования приводит к образованию вокруг наночастиц тонкой оболочки. Установлено, что при инкубации АМ с наночастицами наблюдается их внутриклеточная локализация, плотность которой определяется концентрацией наночастиц и временем экспозиции. Снижение жизнеспособности клеток до 75% при их взаимодействии с исследуемым наноматериалом отмечено при использовании максимальной концентрации Fe_3O_4 в течение 24-х часов. Предполагается, что адсорбция белковых молекул культуральной среды на поверхности наночастиц облегчает их проникновение внутрь клеток путём эндоцитоза, а также снижает реакционную способность поверхности наночастиц, что и проявляется в их низкой цитотоксичности. Высокая степень биоактивности и биосовместимости наночастиц Fe_3O_4 при взаимодействии с культурой макрофагов даёт право рассматривать полученные нанопорошки с точки зрения их применения в биологии и медицине для магнитоуправляемого транспорта лекарственных препаратов.

У даній роботі одержано нанопорошок Fe_3O_4 , визначено його фазовий склад, дисперсність частинок і магнетні характеристики. Виконано аналіз здатності магнетиту Fe_3O_4 адсорбувати білкові компоненти культуральних середовищ, а також досліджено цитотоксичність наночастинок і хара-

ктер їх взаємодії з культурою альвеолярних макрофагів (АМ) залежно від концентрації та часу інкубації. Аналіза мікроструктури наночастинок у середовищі, що містить 10% ембріональну телячу сироватку (ЕТС), показала, що наявність білкової компоненти в середовищі культивування призводить до утворення навколо наночастинок тонкої оболонки. Встановлено, що при інкубації АМ з наночастинами спостерігається їх внутрішньоклітинна локалізація, густина якої визначається концентрацією наночастинок і часом експозиції. Зниження життєздатності клітин до 75% при їх взаємодії з досліджуваним наноматеріалом відзначено при використанні максимальної концентрації Fe_3O_4 упродовж 24-х годин. Передбачається, що адсорбція білкових молекул культурального середовища на поверхні наночастинок полегшує їх проникнення усередину клітин шляхом ендоцитозу, а також знижує реакційну здатність поверхні наночастинок, що й проявляється в їх низькій цитотоксичності. Таким чином, висока ступінь біоактивності і біосумісності наночастинок Fe_3O_4 при взаємодії з культурою макрофагів дає право розглядати одержані нанопорошки з точки зору їх застосування в біології та медицині для магнетокерованого транспорту лікарських препаратів.

In a given work, Fe_3O_4 nanopowder was fabricated. Its phase composition, particle dispersity, and magnetic characteristics are determined. Ability of magnetite (Fe_3O_4) to adsorb protein components of culture media is analysed; nanoparticles cytotoxicity and character of their interaction with alveolar macrophage (AM) culture depending on concentration and incubation time are studied. The analysis of nanoparticles microstructure in a media containing 10% of Fetal Bovine Serum (FBS) shows that presence of a protein component in cultural medium leads to the formation of thin coat around nanoparticles. During incubation of AM with nanoparticles, their intercellular localization is observed; its density is determined by both the concentration of nanoparticles and the exposure time. Cells viability reduction down to 75% during their interaction with the studied nanomaterial is revealed, when the maximum concentration of Fe_3O_4 for 24 hrs. is used. It is supposed that adsorption of protein molecules of culture medium on the surface of nanoparticles facilitates their penetration inside the cells by endocytosis and reduces the reaction ability of the nanoparticles surface that results in their low cytotoxicity. Thus, a high rate of bioactivity and compatibility of Fe_3O_4 nanoparticles during interaction with the culture of macrophages suggests an application of the obtained nanopowders in biology and medicine for magnetically controlled transport of drugs.

Ключевые слова: наночастицы, альвеолярные макрофаги, биосовместимость, цитотоксичность.

(Получено 19 октября 2010 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время показана принципиальная возможность применения наночастиц в области биологии и медицины для клинической ди-

агностики, магнитной сепарации биологического материала, направленной доставки лекарственных препаратов, тканевой инженерии, лечения онкологических заболеваний гипертермией, а также для исследования структуры ДНК и изготовления биосенсоров [1, 2]. Активный интерес к наноматериалам обусловлен тем, что при переходе в наноразмерное состояние происходит изменение ряда фундаментальных свойств вещества. Основным фактором, определяющим уникальные физико-химические характеристики наноразмерных объектов, является высокое отношение площади их поверхности к объёму, что обеспечивает её высокую реакционную способность [2, 3, 4].

Биосовместимость, токсичность и способность проникать в клетку — это основные критерии, которые будут определять эффективность применения наночастиц в биологических и медицинских целях.

Предполагается, что наноструктурные материалы могут проявлять токсичность при взаимодействии с биологическими материалами, обусловленную несколькими факторами: большой реакционной способностью, собственной токсичностью материала и неспецифичностью взаимодействия с биологическими объектами, определяемой их формой, размерами и структурой [5, 6, 7, 8]. Значительное внимание в литературе уделяется механизму проникновения наночастиц в клетку путём фагоцитоза либо другим неспецифическим способом [9, 10, 11, 12, 13].

Одними из широко изучаемых и применяемых в настоящее время наноматериалов являются нанопорошки на основе Fe_3O_4 , обладающие низкой токсичностью и стабильностью магнитных характеристик. Однако данных о механизме проникновения наночастиц Fe_3O_4 в ткани, органы и опухоли, а также о степени их токсичности недостаточно, что во многом определяет границы их применения.

Таким образом, актуальными являются синтез, а также изучение биоактивности и биосовместимости нанопорошков на основе Fe_3O_4 , их распределения и локализации на поверхности и во внутреннем объёме клеток в зависимости от концентрации и времени инкубации с культурой клеток.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовление порошков. Нанопорошки получали термическим восстановлением оксалата железа $\text{FeC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ по методике, описанной в [14, 15]. Восстановление выполняли в углеродосодержащей газовой среде при температуре 230°C . Фазовый состав продуктов восстановления определяли при помощи рентгеновской дифрактометрии с использованием дифрактометра ДРОН-3.0 с кобальтовым анодом. Размеры областей когерентного рассеяния определяли по уширению наиболее интенсивных линий на дифрактограмме методом аппроксимаций в приближении Вильямсона–Холла [16].

Выделение и культивирование альвеолярных макрофагов. Альвеолярные макрофаги для экспериментальных исследований были получены из лёгких морских свинок. Все манипуляции с животными выполняли в соответствии с положениями «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и иной научной целью» (г. Страсбург, 1985) и были одобрены Комитетом по биоэтике ИПКиК НАН Украины [17].

Эктомию трахеи лабораторных животных выполняли под эфирным наркозом [18]. Выделенную трахею канюлировали. Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) получали путём промывания лёгких охлаждённой средой 199, содержащей в 100 мл среды 25 МЕ гепарина и антибиотики (пенициллин 500 ед./мл и каномидин 500 ед./мл). Для чего в лёгкие через канюлю четыре раза вводили среду (по 15 мл) и выдерживали 10 мин, конечный объём собранной жидкости составлял 24 мл. Собранный и охлаждённый на льду БАЛ центрифугировали при 1000g 5 мин, после чего клетки ресуспендировали в среде 199 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) и антибиотиками (пенициллин 250 ед./мл и каномидин 250 ед./мл). Концентрацию клеток доводили до 2 млн./мл и разливали по 2 мл в чашки Петри диаметром 35 мм.

Макрофаги отделяли от других альвеолярных клеток способом их осаждения на пластиковой поверхности чашек, при помещении в термостат (37°C), заполненный 5% углекислым газом. Через 1 час неприлипшие к пластику клетки смывали раствором Хенкса, а к осевшим клеткам добавляли 2 мл среды 199 с 10% ЭТС и снова помещали в термостат с 5% углекислым газом на 24 ч.

Приготовление суспензии нанопорошков. Нанопорошки на основе Fe_3O_4 помещали в жидкую фазу (физиологический раствор, среда 199) и озвучивали с помощью ультразвукового диспергатора УЗДН-2 в течение 10 минут. Содержание дисперсной фазы нанопорошка в суспензиях составляло 4 мг/мл.

Электронно-микроскопические исследования. Характер распределения наночастиц в средах различного состава анализировали методом трансмиссионной электронной микроскопии. На сетки — подложки, покрытые тонкой формваровой плёнкой, наносили каплю озвученных (10 мин) ультразвуком наночастиц, взятых из осадка и надосадочной жидкости. После высушивания образцы с наночастицами исследовались в электронном микроскопе ПЭМ-125К при ускоряющем напряжении 75 кВ, снабжённом системой анализа изображений САИ-01А (АО «SELMI», г. Сумы), включающей CCD камеру DX-2 и пакет программ фирмы «КАРРА», Германия.

Определение содержания наночастиц в культуре клеток. В культуру клеток добавляли наночастицы в конечной концентрации 1, 0,2 и 0,06 мг/мл. Время инкубации культуры АМ с наночастицами составляло 2 и 24 часа. После экспозиции клетки были отмыты средой

199 от наночастиц, зафиксированы метанолом в течение 60 мин и высушены на воздухе. Наличие наночастиц в клетках выполняли с помощью специфического окрашивания железа в синий цвет берлинской лазурью [19]. Клетки были помещены на 15 минут в равные количества 2% растворов железистосинеродистого калия (берлинская лазурь) и 0,1 н HCl при температуре 50–56°C, затем промыты в проточной воде 10 минут и докрашены 0,1% раствором эозина в течение 5 минут при комнатной температуре.

Определение среднего объёма альвеолярных макрофагов. Анализ взаимодействия наночастиц (100 нм Fe₃O₄) с культурой АМ выполняли с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z1 при увеличениях объектива 20 и 40 крат. Величину объёма клеток оценивали с помощью компьютерной программы AxioVision Documentation.

Определение цитотоксичности наноматериала (МТТ-тест). МТТ-тест основан на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в формазан, который кристаллизуется внутри жизнеспособной клетки. В каждую чашку Петри с клеточной культурой АМ добавляли по 500 мкл раствора МТТ (5 г/л) и инкубировали 4 ч при 37°C в присутствии 5% CO₂. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли с помощью диметилсульфоксида (ДМСО) для чего по окончании инкубации супернатант осторожно удаляли, а в каждую чашку добавляли по 600 мкл ДМСО. Осадок ресуспендировали и 15 мин инкубировали в темноте при комнатной температуре. Показания оптической плотности измеряли при длине волны 540 нм на фотоколориметре КФК-2-УХЛ-4.2. Результаты эксперимента выражали в % к контролю. Выживаемость клеток (S_c) рассчитывалась по формуле: $S_c = (OD_a/OD_k) \cdot 100\%$, где OD_a — оптическая плотность клеток, инкубированных с наночастицами; OD_k — средняя оптическая плотность контрольных клеток, инкубированных без наночастиц. Интенсивность окраски пропорциональна количеству жизнеспособных клеток в суспензии.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из дифрактограммы, приведённой на рис. 1, нанопорошок содержит две кристаллические фазы: α -Fe в количестве ~5% и Fe₃O₄ в количестве ~95%. Размеры областей когерентного рассеяния, определённые по уширению рентгеновских дифракционных линий и характеризующие дисперсность частиц порошка, находятся в интервале 50–200 нм.

Анализ полевых зависимостей удельной намагниченности нанопорошка выполняли в интервале полей 0–800 кА/м (0–10 кЭ), одна из которых представлена на рис. 2. Получены следующие значения магнитных характеристик: удельной намагниченности насыщения

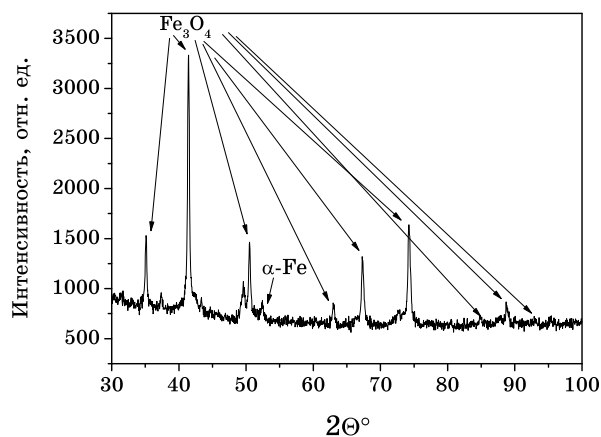


Рис. 1. Дифрактограмма нанопорошка магнетита.

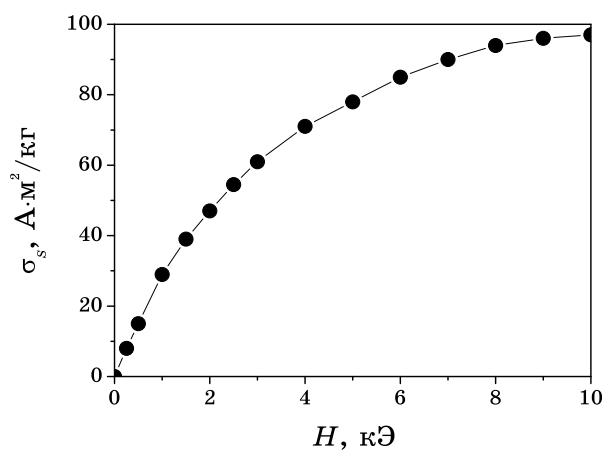


Рис. 2. Полевая зависимость удельной намагниченности нанопорошка магнетита, измеренной в интервале полей 0–800 кА/м (0–10 кЭ).

$\sigma_s = 77 \text{ А}\cdot\text{м}^2/\text{кг}$, коэрцитивной силы $H_c = 1,6 \text{ кА/м}$, остаточной индукции $B_r = 0,125 \text{ Тл}$.

Электронно-микроскопические исследования наночастиц Fe_3O_4 в жидкой фазе после ультразвукового диспергирования показали (рис. 3), что в анализируемом материале наночастицы организованы в неоднородные агрегаты, размером от 250 до 1000 нм, состоящие из отдельных частиц.

Как видно из рис. 3, наночастицы Fe_3O_4 плотно контактируют между собой и имеют форму, близкую к сферической. В представленном образце можно выделить три популяции наночастиц, средний диаметр которых составлял 20–30 нм, 50–70 нм и 90–110 нм со-

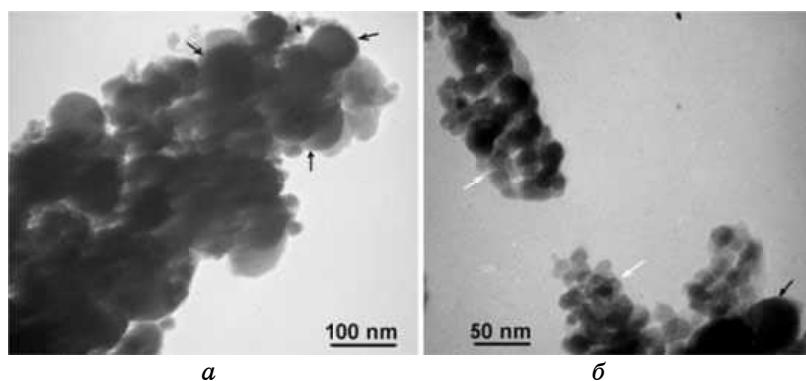


Рис. 3. Характер организации наночастиц магнитной жидкости в неоднородные агрегаты после ультразвукового диспергирования. Микроструктура наночастиц Fe_3O_4 в различных агрегатах. Темными стрелками (*a*) обозначены крупные (90–110 нм), светлыми (*б*) частицы размером менее 50 нм.

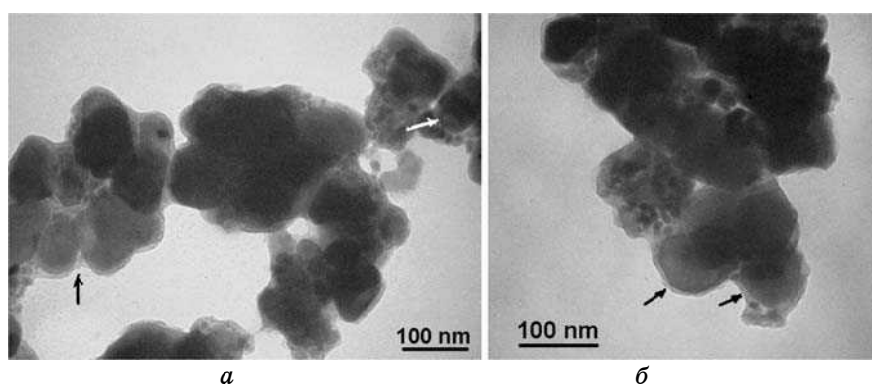


Рис. 4. Структура наночастиц магнитной жидкости в присутствии 10% ЭТС. Характер взаимодействия наночастиц Fe_3O_4 с белковыми компонентами культуральных сред (*a*, *б*). Стрелками обозначены оболочки вокруг наночастиц.

ответственно (рис. 3).

Указанные значения размеров областей когерентного рассеяния и достаточно низкие значения коэрцитивной силы, высокие значения удельной намагниченности насыщения и остаточной индукции, а также анализ микроструктуры в жидкой фазе свидетельствуют о том, что полученные нанопорошки могут быть использованы в биологии и медицине для магнитоуправляемого транспорта лекарственных препаратов [13, 20, 21].

Для исследования взаимодействия наночастиц с биологическими объектами мы использовали культуру альвеолярных макрофагов.

Учитывая, что процесс культивирования предполагает наличие в среде инкубации 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и, следовательно, содержание белков различной молекулярной массы будет достаточно велико и сравнимо с их концентрацией в плазме крови, мы выполнили анализ микроструктуры наночастиц в среде 199 с содержанием 10% ЭТС. Показано, что наличие белкового компонента в культуральной среде приводило к образованию вокруг наночастиц тонкой, 4–5 нм, оболочки (рис. 4, стрелки), что, по всей видимости, определялось адсорбцией белков на поверхности наночастиц.

Согласно данным литературы [12, 22] адсорбция белков на поверхности наночастиц определяется, с одной стороны, электростатическими взаимодействиями заряженных групп белковых молекул. С другой стороны, гидрофобная часть белка имеет высокую степень сродства к поверхности наночастиц, что и определяет взаимодействие наноматериала с белковыми компонентами культуральных сред в течение секунд.

Изучение механизма взаимодействия наночастиц с клетками является одним из центральных вопросов для применения нанотехнологий в биологии и медицине. Наличие наночастиц в клетках было определено с помощью специфического окрашивания частиц железа в синий цвет железистосинеродистым калием (берлинская лазурь) [19]. На рисунке 5 представлены данные взаимодействия ферромагнитных наночастиц с клетками культуры альвеолярных макрофагов в зависимости от времени их инкубации с частицами (2 и 24 часа) и конечной концентрации (0,06, 0,2 и 1,0 мг/мл).

Так, при использовании 1,0 мг/мл Fe_3O_4 мы наблюдали высокую плотность взаимодействия наночастиц с альвеолярными макрофагами как в течение 2-х, так и 24-х часов инкубации. При снижении концентрации наночастиц до 0,2 мг/мл интенсивность окраски АМ железистосинеродистым калием оставалась практически такая же, как и при концентрации 1,0 мг/мл. Снижение концентрации наночастиц до 0,06 мг/мл приводило к возрастанию количества клеток, несодержащих Fe_3O_4 . Следует отметить, что визуально мы не наблюдали зависимости в интенсивности окрашивания железистосинеродистым калием от времени экспозиции. Однако при анализе среднего объема АМ выявлен факт его незначительного (до 10–15%) увеличения (табл.) при 24-часовой инкубации для всего диапазона концентраций, что, по всей видимости, свидетельствует о проникновении их внутрь клеток.

В современной литературе обсуждается механизм проникновения наночастиц в клетки с помощью эндоцитоза [23], однако прямых доказательств этого процесса не существует. Известно, что культура АМ обладает способностью поглощать структуры эндогенного происхождения различными типами эндоцитоза [7, 24]. Можно предположить следующий механизм проникновения нано-

ТАБЛИЦА. Объём (мкм^3) АМ в зависимости от времени их инкубации с частицами и конечной концентрации.

Время инкубации культуры АМ с наночастицами	Концентрация наночастиц, мг/мл		
	0,06	0,2	1
2 часа	120±25	122±51	131±49
24 часа	130±42	145±44	153±46

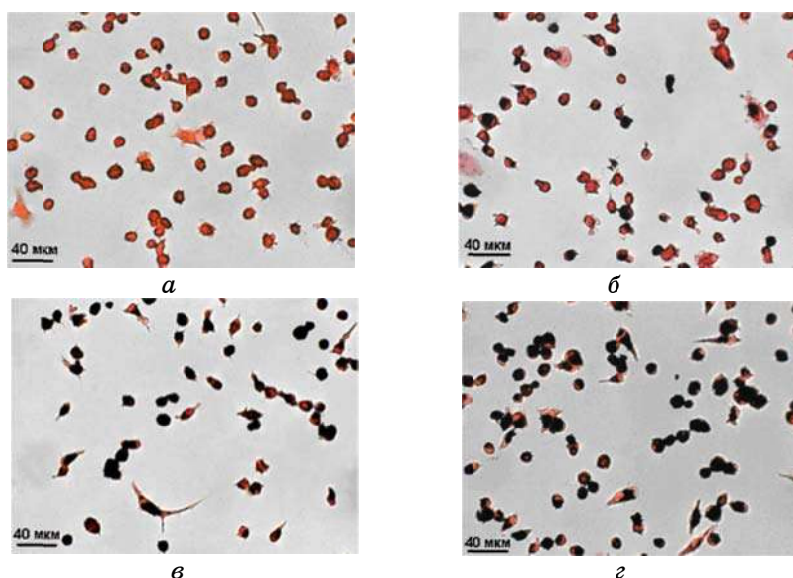


Рис. 5. Культура клеток АМ после 24-часового взаимодействия с наночастицами. Окрашивание железистосинеродистым калием. *а* — культура АМ без добавления наночастиц, *б–г* — культура АМ при экспозиции с наночастицами концентрацией 0,06, 0,2 и 1 мг/мл соответственно.

частиц в клетку: покрытые белковыми молекулами наночастицы адсорбируются на поверхности клеточной мембраны, что приводит к локальному впячиванию мембраны, образованию эндосомы и её проникновению внутрь клетки (рис. 6).

Одним из основных критериев применения наночастиц является их цитотоксичность. На рисунке 7 представлены данные жизнеспособности культуры АМ (ММТ-тест) в зависимости от концентрации и времени инкубации с частицами Fe_3O_4 . Видно, что при экспозиции АМ с наночастицами в течение 2-х часов уровень жизнеспособности клеток оставался достаточно высоким (около 95–100%), тогда как увеличение времени инкубации до 24-х часов приводило к снижению данного показателя до 75% при использовании макси-

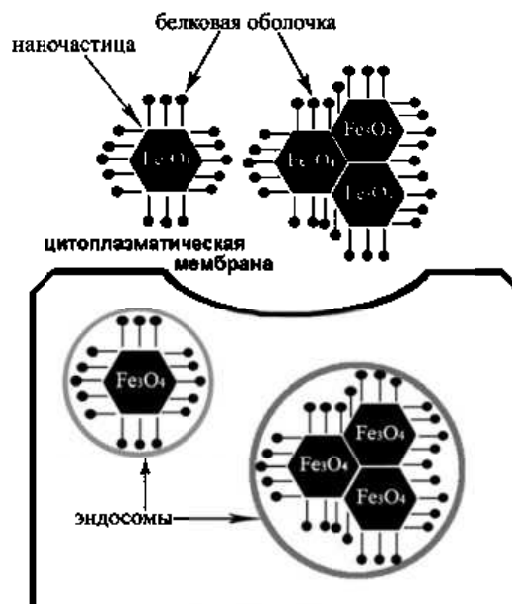


Рис. 6. Возможный механизм проникновения наночастиц в клетку. Впячивание мембраны (М) с адсорбированными на ней частицами (Нч) и образование эндосом (Э).

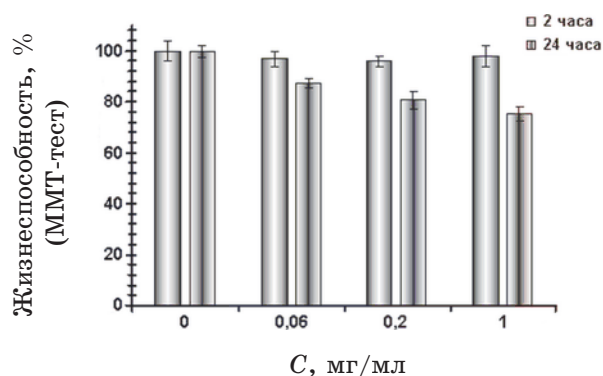


Рис. 7. Жизнеспособность клеток культуры АМ в зависимости от времени экспозиции (2 и 24 часа) и концентрации Fe_3O_4 .

мальной концентрации наночастиц (1 мг/мл 100 нм Fe_3O_4). Согласно данным литературы [11, 13] наночастицы на основе Ni и Co в концентрации 0,02 мг/мл при взаимодействии с культурой эпителиальных клеток в течение 24-х часов приводят к сохранению до 20% их жизнеспособности.

Таким образом, данные наших исследований, выполненные на

клетках культуры альвеолярных макрофагов, свидетельствуют о слабой зависимости цитотоксического действия наночастиц железа от их концентрации и времени экспозиции.

Следует отметить, что адсорбция белковых молекул культуральной среды на поверхности наночастиц, по всей видимости, облегчает их проникновение в клетки путём эндоцитоза, а также снижает реакционную способность поверхности наночастиц, что проявляется в их низкой цитотоксичности. Следовательно, высокая степень биоактивности и биосовместимости наночастиц Fe₃O₄ при взаимодействии с культурой макрофагов даёт право рассматривать данный наноматериал с точки зрения применения в качестве контейнеров по доставке лекарственных препаратов.

4. ВЫВОДЫ

Исследованный порошок содержит ~ 5% α-Fe и ~ 95% Fe₃O₄ с дисперсностью частиц порядка 50–200 нм и уровнем магнитных характеристик, приемлемым для использования в биологии и медицине.

В культуральной среде наночастицы Fe₃O₄ организованы в неоднородные, размером от 250 до 1000 нм, агрегаты, содержащие три группы частиц, средний диаметр которых составлял 20–30, 50–70 и 90–110 нм соответственно. Введение в среду 10% эмбриональной телячьей сыворотки, приводило к образованию вокруг частиц тонкой (в 4–5 нм) оболочки.

Степень взаимодействия наночастиц с культурой клеток определялась их концентрацией и временем инкубации. Оптимальной концентрацией для насыщения клеток явилась 0,2 мг/мл Fe₃O₄ при времени экспозиции 24 часа. Для всех концентраций наночастиц при 24-х часовой инкубации наблюдалось 10–15% увеличение объёма клеток.

Наночастицы на основе Fe₃O₄ проявили низкую цитотоксичность; при использовании максимальной (1 мг/мл) концентрации наночастиц жизнеспособность АМ составляла 95–100% и 75% для 2-х- и 24-х часовой экспозиции соответственно.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. А. Г. Першина, А. Э. Сазонов, И. В. Мильто, *Бюллетень сибирской медицины*, № 2: 70 (2008).
2. F. Watari, N. Takashi, A. Yokoyama, M. Uo et al., *J. R. Soc. Interface*, 6: 371 (2009).
3. И. П. Суздалев, *Нанотехнология: физикохимия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов* (Москва: КомКнига: 2006).
4. I. Rabiassa, H. Pratsinis, and G. Drossopoulou, *Biomicrofluidics*, 1: 1 (2007).
5. K. Donaldson, L. Tran, L. A. Jimenez et al., *Particle and Fibre Toxicology*, 2: 10 (2005).

6. A. V. Kabanov, *NIH Public Access Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, No. 15: 1597 (2006).
7. C. Uboldi, D. Bonacchi, G. Lorenzi et al., *Particle and Fibre Toxicology*, **6**: 18 (2009).
8. L. Wang, D. K. Nagesha, S. Selvarasah et al., *J. of Nanobiotechnology*, **5**: 61 (2008).
9. P. L. Апора, Y. Qian, R. Shao et al., *Particle and Fibre Toxicology*, **6**, No. 1: 1 (2009).
10. P. J. A. Borm, D. Robbins, S. Haubold et al., *Particle and Fibre Toxicology*, **3**: 11 (2006).
11. B. L'Azou, J. Jorly, D. On et al., *Particle and Fibre Toxicology*, **5**: 22 (2008).
12. A. Verma, O. Uzun, Yu. Irvine et al., *NIH Public Access Nat. Mater.*, **7**, No. 7: 588 (2008).
13. J. Zhao, L. Bowman, X. Zhang et al., *J. of Nanobiotechnology*, **10**, No. 1: 7 (2009).
14. А. П. Шпак, Ю. А. Куницкий, В. Л. Карбовский, *Кластерные и наноструктурные материалы* (Киев: Академперіодика: 2001), т. 1.
15. Н. Ф. Куцевская, *Наносистемы, наноматериалы, нанотехнології*, **3**: 811 (2005).
16. И. В. Иверонова, Г. П. Ревкевич, *Теория рассеяния рентгеновских лучей* (Москва: Изд-во МГУ: 1972).
17. *Protocol of Amendment to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for the Experimentation and Other Scientific Purposes. European Treaty Series. No. 170* (Strasbourg: 1998).
18. B. Guo, R. Zebda, S. J. Drake, and C. M. Sayes, *Particle and Fibre Toxicology*, **6**: 4 (2009).
19. Ar. Beduneau, Ma Zhiya, C. Grotepas, Al. Kabanov, E. Rabinow, N. Gong, R. Mosley, H. Dou, M. Boska, and H. Gendelman, *Nanoparticles and Monocytes PLoS ONE*, **4**, No. 2: 1 (2009).
20. S. Lanone, F. Rogerieux, J. Geys et al., *Particle and Fibre Toxicology*, **6**: 14 (2009).
21. C. W. Schmidt, *Environmental Health Perspectives*, **117**, No. 4: 158 (2009).
22. M. S. Ehrenberg, A. E. Friedman, J. N. Finkelstein, G. Oberdörster, J. L. McGrath, *Biomaterials*, **30**, No. 4: 603 (2009).
23. H. Jin, D. A. Heller, R. Sharma, and M. S. Strano, *ACS Nano*, **3**: 149 (2009).
24. L. C. Renwick, D. Brown, A. Clouter, and K. Donaldson, *Occup. Environ. Med.*, **61**: 442 (2004).