

PACS numbers: 61.48.De, 68.37.Lp, 68.55.ap, 81.05.U-, 87.15.-v, 87.19.xj, 87.64.-t

Дослідження впливу мікроструктури наноматеріалів на утворення пухлинними клітинами багатоклітинних сфероїдів

О. М. Якимчук, О. М. Перепелиціна, О. Д. Рудь*, І. М. Кір'ян*,
М. В. Сидоренко

ДУ «Відділення біотехнічних проблем діагностики
Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України»,
вул. Васильківська, 45,
03022 Київ, Україна
**Інститут металофізики ім. Г. В. Курдюмова НАН України,*
бульв. Акад. Вернадського, 36,
03680, МСП, Київ-142, Україна

В роботі досліджується вплив різних концентрацій надструктурних матеріалів, а саме, цибулиноподібного вуглецю (оніонів), ультрадисперсних алмазів (УДА) та фуллеренів (C_{60}) на утворення багатоклітинних сфероїдів. Хімічний склад та ступінь очищення наноматеріалів контролюється за допомогою ІЧ-Фур'є-спектроскопії. Сила та напрямок впливу наноматеріалів на клітинну популяцію було визначено за допомогою Пірсонового коефіцієнта кореляції. Продемонстровано, що оніони й УДА знижують адгезійні та когезійні якості клітин та стимулюють утворення великої кількості клітинних сфероїдів об'ємом біля 10^{-3} мм³. Натомість вплив фуллеренів, понижуючи адгезію клітин до субстрату, спричиняє утворення клітинних агрегатів, більших за $4 \cdot 10^{-3}$ мм³. Одержані дані можуть бути використаними для спрямованого росту клітин у тривимірній культурі.

The effect of different concentrations of superstructural materials, namely, onion-like carbon (onions), ultradispersed diamonds (UDD), and fullerenes (C_{60}), on the formation of multicellular spheroids is investigated. Chemical composition and purity of nanomaterials are controlled by the Fourier IR spectroscopy. The strength and direction of the impact of nanomaterials on the cell population are determined, using the Pearson's correlation coefficient. The results demonstrate that the UDD and onions reduce adhesion and cohesive abilities of cells and stimulate fabrication of high number of cell spheroids of about 10^{-3} mm³. The fullerenes reduce cell adhesion to the substrate and cause the formation of cell aggregates larger than $4 \cdot 10^{-3}$ mm³. These results can be useful for achievement of the directed cell growth in three-dimensional culture.

В работе исследуется влияние различных концентраций наноструктурных материалов, а именно, луковичеобразного углерода (онионы), ультрадисперсных алмазов (УДА) и фуллеренов (C_{60}) на образование многоклеточных сфероидов. Химический состав и степень чистоты наноматериалов контролируются с помощью ИК-Фурье-спектроскопии. Сила и направление влияния наноматериалов на клеточную популяцию оцениваются с помощью коэффициента корреляции Пирсона. В результате продемонстрировано, что онионы и УДА снижают адгезионные и когезионные качества клеток и стимулируют образование большого числа клеточных сфероидов объёмом около 10^{-3} мм³, а фуллерены, снижая адгезию клеток к субстрату, вызывают образование клеточных агрегатов объёмом более $4 \cdot 10^{-3}$ мм³. Полученные данные могут быть использованы для направленного роста клеток в трёхмерной культуре.

Ключові слова: ультрадисперсні алмази, фуллерени, оніони, багатоклітинні сфероїди.

(Отримано 22 листопада 2013 р.; після доопрацювання — 27 листопада 2013 р.)

1. ВСТУП

Останнім часом у літературі з'являється досить багато робіт, присвячених використанню наноструктурних матеріалів для біологічних та медичних цілей [1–5]. Створення біологічно подібних нанопристроїв з життєво необхідними якостями вимагає міждисциплінарних дослідницьких зусиль, які можуть бути переведені безпосередньо в нові технології і продукти для біомедичних застосувань. Тому метою даної роботи було порівняння цитологічного впливу нанорозмірних матеріалів з різною структурою. В дослідженні було використано ультрадисперсні алмази (УДА), фуллерени C_{60} та вуглецеві наноматеріали сфероїдальної форми — оніони.

Ультрадисперсні алмази [2] мають унікальні фізико-хімічні властивості: високорозвинена поверхня частинок ($270\text{--}280$ м²/г), велика кількість заряджених груп (карбоксильні, карбонільні, гідроксильні, ефірні), вуглецевих фрагментів і мікродомішок металів [6, 7]. У літературі є суперечливі дані про токсичність УДА і можливість їх застосування в біології та медицині. Так, в роботах [8–10] показано, що внутрішньом'язові та підшкірні ін'єкції з стерильних золів наноалмазів не чинять деструктивного впливу на клітини в місцях локалізації, а при внутрішньовенному введенні не відзначається змін у характері серцевої діяльності і стані внутрішніх органів піддослідних тварин. Є дані про протиракову активність і протипроменевий вплив наноалмазів [11, 12]. В той же час, іншими авторами відзначається деструктивний вплив УДА на клітини [13]. Тому дослідження взаємодії наноалмазів з біологічними об'єктами та порівняння їх впливу з біологічними властивостями нанотрубок

та фуллеренів є актуальним завданням фізики і біології.

Фуллерени є класом вуглецевих сполук, алотропна форма яких існує поряд з такими добре відомими як графіт і алмаз. Форма молекули фуллерену є абсолютно унікальною для природних молекул із замкненою симетричною поверхнею [14]. Найбільш стабільною і поширеною сполукою цього класу є молекула C_{60} , яка складається з 60 атомів вуглецю. Діаметр молекули C_{60} становить 0,708 нм, тобто за величиною є порівнянним з діаметром α -спіралі поліпептидів або молекули стероїдів [15]. Незвичайна будова фуллеренів зумовлює їх особливі властивості, що дозволяє розглядати ці сполуки як перспективні для застосування на біологічних об'єктах [16, 17]. Фуллерени C_{60} нерозчинні в полярних розчинниках, таких як вода чи метанол, проте ефективно екстрагуються в толуол та бензол. Завдяки гідрофобності, молекула C_{60} може вбудовуватися в біологічні мембрани та локалізуватися поблизу мембранних фосфоліпідів і білків. З використанням біліпідних мембран (фосфатидилхолін:холестерол) нами показано [18], що фуллерени C_{60} проникають у ліпідний матрикс, змінюючи мембранну проникність [19]. Крім того, фуллерени виявляють відновлювальну здатність, легко приєднуючи до своєї молекули від одного до шести електронів, тому можуть виконувати роль антиоксидантів. Відновлювальний потенціал фуллеренів дозволяє використовувати їх як адсорбенти вільних радикалів, зокрема, активних форм кисню [20], гіперпродукція яких призводить до виникнення багатьох патологій.

Відносно новим класом вуглецевих сполук є оніони — квазисферичні наночастинки, що складаються з фуллереноподібних шарів вуглецю, укладених у концентричні графітові оболонки. Вони мають властивості, відмінні від інших вуглецевих наноструктур, таких як графіт, нанотрубки та наноалмази, оскільки характеризуються високосиметричною структурою. Кілька останніх публікацій показали, що оніони, інкапсульовані в графітоподібні шари можуть знайти застосування як компоненти нанокапсул для систем доставки лікарських засобів — зовнішні шари графіту забезпечують захист речовини та можуть слугувати основою для кріплення необхідних функціональних та рецепторних груп [5].

Отже, ультрадисперсні алмази, фуллерени C_{60} та оніони характеризуються унікальними хімічними, фізичними та просторовими властивостями, що відкриває перспективи їх використання в біологічних дослідженнях.

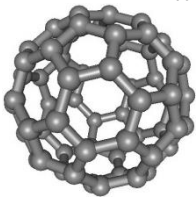
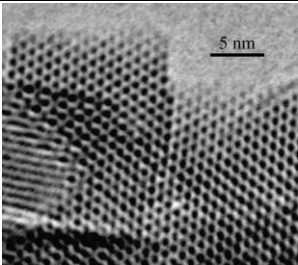

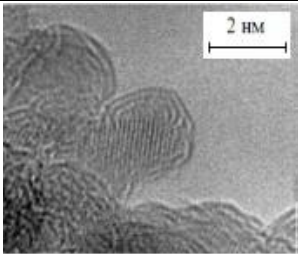
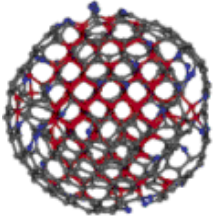
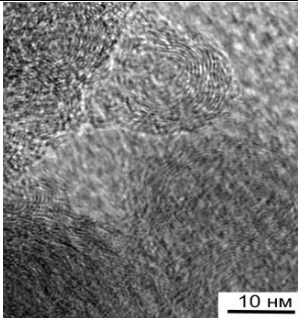
2. МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ НАНОМАТЕРІАЛІВ

Одержання вуглецевого наноматеріалу оніоноподібної структури. Оніоноподібний вуглець одержували високочастотним розрядно-

імпульсним методом, який докладно наведено в роботі [21]. У процесі оброблення відбувається деструкція молекул вуглеводнів на окремі фрагменти, з яких у процесі надшвидкого охолодження синтезується аморфний вуглець. На наступному етапі продукти електророзрядного синтезу було піддано термічному окисненню на повітрі при температурі 300°C протягом 30 хвилин.

ІЧ-Фур'є-спектроскопія. Хімічний склад одержаного наноматеріалу було досліджено за допомогою ІЧ-Фур'є-спектроскопії. ІЧ-спектри було одержано за допомогою FTS 7000e Varian FTIR спектрометра. Зразки для аналізу було одержано шляхом змішування $\cong 1$ мг наноматеріалу з 150 мг KBr спектрального класу в шліфувальному млині. Для виготовлення зразків використовували прес з си-

ТАБЛИЦЯ 1. Порівняльна таблиця просторової структури УДА, оніоноподібного вуглецю та фуллеренів C_{60} за даними літератури.

Просторова структура	ТЕМ-фотографії наноструктур	Джерела інформації
<p>Фуллерени C_{60}</p> 		[22, 23]
<p>Агломерат УДА</p> 		[1, 24]
<p>Оніоноподібний вуглець</p> 		[21]

лою тиску $3,0-3,5 \cdot 10^3$ кг/см². КВг та наноматеріал були зневоднені шляхом прожарювання при температурі 60°C протягом 60 хвилин. Попередньо знімали спектри КВг, потім їх віднімали від спектрів зразків. Для порівняння було використано ультрадисперсні алмази та фуллерени C₆₀ (табл. 1). Всі умови оброблення, приготування зразків та концентрації були однакові для трьох матеріалів.

Приготування стійких водневих суспензій наноматеріалів виконували в два етапи. На першому етапі вуглецеві наноматеріали були піддані ультразвуковому обробленню в дистильованій воді з використанням ультразвукового диспергатора УЗДН-2Т. Для всіх типів наноматеріалів режими оброблення становили $I = 10$ мА, $P = 22$ кГц, тривалість — 10 хв. На другому етапі одержаний гідрозоль по закінченню диспергування піддавався градієнтному центрифугуванню при кімнатній температурі. Процес центрифугування мав кілька циклів, після кожного з яких було відібрано фракцію супернатанта, яка мала дисперсне розчинення. Таким чином було відібрано фракції з гідрофільним розчиненням наноалмазів. Перед додаванням до суспензій культивованих клітин, водні розчини ультрадисперсних наноалмазів стерилізували за допомогою кип'ятіння або прожарювання.

Моделювання 2D- та 3D-росту клітин виконували за методикою, описаною в роботі [25]. Щільність клітинної суспензії підраховували за допомогою трипанового синього та висаджували рівну кількість клітин ($5 \cdot 10^4$ клітин/мл) у кожну лунку планшета. До клітинної культури одразу додавали розчини наноструктурних матеріалів у концентраціях 12,5–25–50–100–150–200 мкг/мл. Для визначення залежності розмірів та кількості багатоклітинних агрегатів від концентрації та виду наноструктурних матеріалів було виконано генерування клітинних сфероїдів у присутності різних концентрацій УДА, оніонів та C₆₀. Генерування виконували згідно з розробленою в нашій лабораторії технології протягом 24 годин у 24-лункових планшетах, вкритих 1% агаром. Подальше культивування виконували 48 годин з постійною ротацією культури. Наступним етапом фотографували всі лунки 24-лункових планшетів методом «темного поля». Загалом було зроблено 75 фотографій. Потім до всіх клітинних агрегатів, що потрапили на фото, було застосовано однакову процедуру оброблення. Для цього використовували формулу Рольфа–Бьєрквіґа: $V = 0,4ab$, де a і b — геометричні розміри сфероїдів [26]. Всі клітинні агрегати було розсортовано на групи за розмірами від $1 \cdot 10^{-4}$ мм³ до $1 \cdot 10^{-2}$ мм³ з кроком $1 \cdot 10^{-3}$ мм³ та підраховано кількість у кожній групі.

Статистичне оброблення, Пірсонів коефіцієнт. Для мікростатистичних оцінок нормально розподілених випадкових величин використовували Стьюдентів розподіл для малих величин. Для визначення взаємозв'язку між впливом і реакцією експериментальної бі-

ологічної системи й усунення недоліків коваріації було використано Пірсонів коефіцієнт кореляції. Коефіцієнт було розраховано для медіани розміру клітинного сфероїда в культурі та концентрації наноструктурного матеріалу (УДА, C_{60} , оніони) за формулою [27].

Коефіцієнт кореляції змінюється від мінус одиниці до плюс одиниці. При цьому для незалежних параметрів він складає 0, а для тісно пов'язаних наближається до модуля одиниці.

3. ВИЗНАЧЕННЯ ХІМІЧНОЇ СТРУКТУРИ ТА БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОМАТЕРІАЛІВ

Для визначення хімічної структури та ступеня очищення одержаних наноструктурних матеріалів використовували ІЧ-Фур'є-спектроскопію. Результати було порівняно з літературними даними FTIR-спектрів згаданих наноматеріалів. Перед виконанням вимірювань наповнювач (KBr) прожарювали на повітрі при температурі 300°C . Внаслідок втрачалася адсорбована вода (табл. 2). Як і очікувалося, напівширина смуг, що відповідають групам O–H, розтягувалася ($3400\text{--}3200\text{ см}^{-1}$), а амплітуда коливання (1619 см^{-1}) знижувалася. Аміногрупи ($-\text{NH}_2$) демонстрували сильний сигнал при 3431 см^{-1} в УДА та оніонах (рис. 1, 2). Також у цих зразках спостерігалися низькі вібрації піків метильних (2924 см^{-1}), метиленових (2851 см^{-1}) та ароматичних C–H (792 см^{-1}) груп. Натомість досить інтенсивним є коливання вуглеводних зв'язків у районі 1717 см^{-1} , що свідчить про присутність карбоксильних груп. Спостерігався також зсув та зниження інтенсивності валентних коливань C–O

ТАБЛИЦЯ 2. Відповідність типів хімічного зв'язку у вуглецевих сполуках довжинам хвиль на піках поглинання (за даними [1, 29]).

Хімічні групи	Довжина хвилі на піках абсорбції, см^{-1}
O–H вільні, O–H гідроксильні групи	3573, дуже слабкий сигнал
$-\text{NH}_2, =\text{NH}, >\text{NH}$	3432, сильний сигнал
Метил асиметричний	2924, дуже слабкий
Метилен асиметричний	2851, дуже слабкий
$R_2\text{--C}_2\text{O}_3$	1717, сильний сигнал
$-\text{NH}_2, >\text{C}=\text{C}<$	1619,6, сильний сигнал
5-, 6-гранні циклічні вуглеводні	1182–1427, сильний сигнал
C–OH, абсорбовані CO, CO_2	1102,2, 1247, середній сигнал
Циклічні ангідриди	1800–1000, сильний сигнал
C–H ароматичні	792, слабкий
Радіальний рух вуглецевих атомів	527–576, сильний сигнал

групи з центром у точці 1616 см^{-1} . Хоча деякі карбонільні групи можуть з'являтися з адсорбованого CO і CO_2 ($1102, 1247\text{ см}^{-1}$).

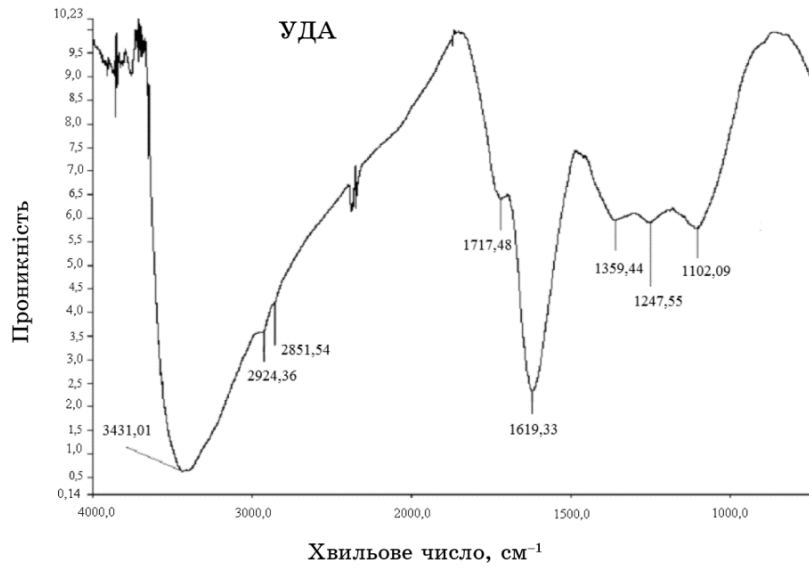


Рис. 1. FTIR-спектри УДА.

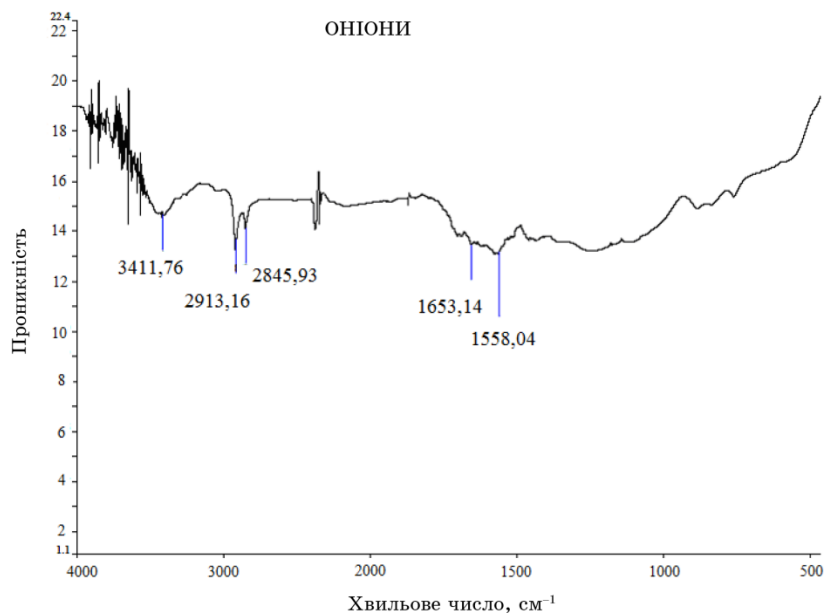


Рис. 2. FTIR-спектри оніонів.

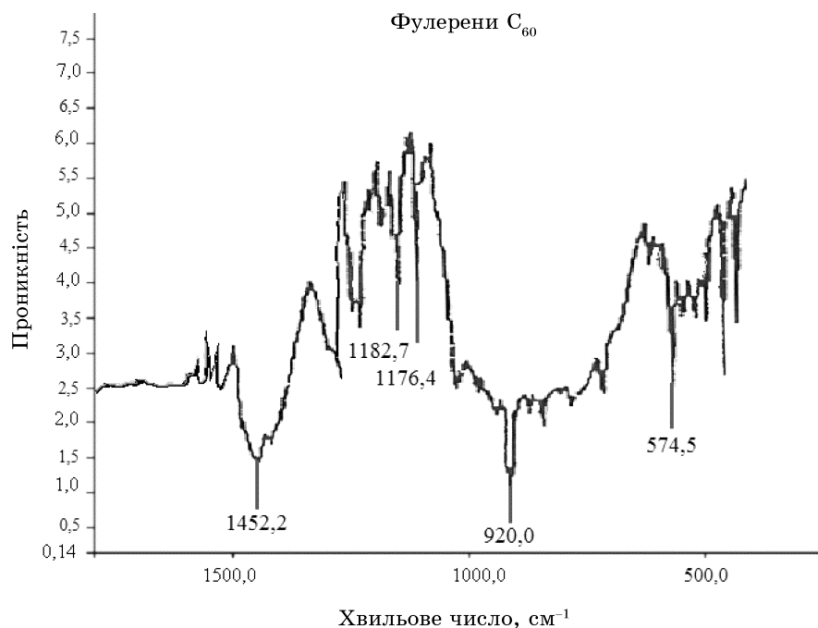


Рис. 3. FTIR-спектри фуллеренів C_{60} .

Для фуллеренів спостерігалися сильні сигнали в зоні хвильового числа $1182\text{--}1427\text{ см}^{-1}$, що відповідає присутності великої частки карбоциклічних пентагональних сполук (рис. 3). Крім того, судячи з одержаних спектрів, у зразках фуллеренів була мала кількість абсорбованих або ковалентних хімічних домішок. Натомість вираженим є первинний радіальний рух атомів вуглецю ($527\text{--}576\text{ см}^{-1}$).

Одержані спектри аналогічні тим, які представлені іншими авторами [1, 23, 24, 28], що дозволило зробити висновок про відповідність хімічної структури досліджених зразків, їх належний ступінь очищення та можливість використання для подальших біологічних досліджень.

4. АНАЛІЗ ВПЛИВУ НАНОСТРУКТУРНИХ МАТЕРІАЛІВ НА УТВОРЕННЯ БАГАТОКЛІТИННИХ СФЕРОЇДІВ

Для визначення залежності розмірів і кількості багатоклітинних агрегатів від концентрації та виду наноструктурних матеріалів ми виконали генерування клітинних сфероїдів у присутності однакових концентрацій УДА, оніони та C_{60} . Протокол одержання багатоклітинних сфероїдів наведено в розділі «Моделювання 2D- та 3D-росту клітин». Всі клітинні агрегати було розсортовано на групи за розмірами: від $1 \cdot 10^{-4}\text{ мм}^3$ до $1 \cdot 10^{-2}\text{ мм}^3$ з кроком $1 \cdot 10^{-3}\text{ мм}^3$ і підрахо-

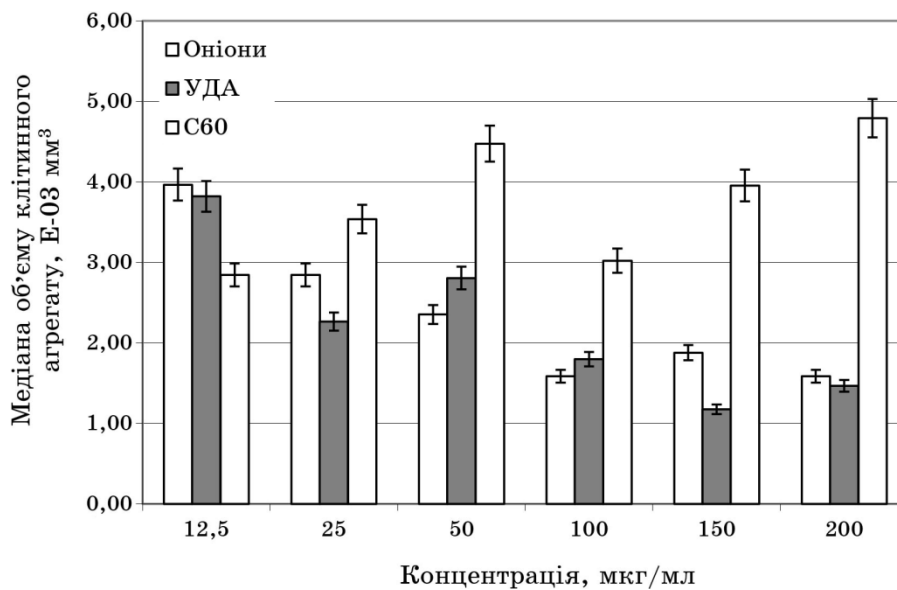


Рис. 4. Залежність медіани об'єму багатоклітинних сфероїдів від концентрації наноструктурних матеріалів. Оніони — цибулиноподібний вуглець; УДА — ультрадисперсні алмази; C₆₀ — фуллерени.

вано кількість у кожній групі (рис. 4). Після створення статистичного вибірки було визначено кореляцію між показниками кількості та розміру клітинних агрегатів від концентрації піддослідних наноматеріалів за допомогою Пірсонового коефіцієнта. Результати наведено в табл. 3. Виявилось, що присутність у культуральному середовищі ЛПВ призводить до зменшення розмірів клітинних сфероїдів і збільшення їх кількості. Така саме тенденція спостерігалася і щодо УДА. Можливо, що оніони й УДА, виступаючи модифікаторами адгезійних властивостей пухлинних клітин, знижують не тільки адгезію клітин до субстрату, а й когезію клітин між собою; тому в культурі спостерігається дуже мала кількість клітинних сфероїдів розмірами більше $1 \cdot 10^{-3} \text{ мм}^3$, навіть порівняно з контролем. Протилежний результат спостерігався при культивуванні клітин у присутності фуллеренів C₆₀. При збільшенні концентрації C₆₀ збільшувалась й кількість сфероїдів розміром більше $3 \cdot 10^{-3} \text{ мм}^3$.

Таким чином, вплив C₆₀ виявлявся як у збільшенні кількості клітинних сфероїдів, так й в стримуванні когезійних тенденцій в клітинній популяції, причому невеликі концентрації C₆₀ збільшували кількість клітинних сфероїдів з розмірами від 3 до $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ мм}^3$. Збільшення концентрації від 100 до 200 мкг/мл призводило до збільшення кількості одержаних клітинних сфероїдів розміром від 4 до $5 \cdot 10^{-3} \text{ мм}^3$ (рис. 4).

ТАБЛИЦЯ 3. Визначення взаємозв'язку між концентрацією наноструктурних матеріалів та розмірами багатоклітинних сфероїдів за допомогою Пірсонівського коефіцієнта кореляції.

Речовина	Медіана V , 10^{-3} мм ³ (при 12,5 мкг/мл)	$V_{\text{exc}}/V_{\text{к}}$, %	Медіана V , 10^{-3} мм ³ (при 200 мкг/мл)	$V_{\text{exc}}/V_{\text{к}}$, %	Пірсонів коефіцієнт кореляції
Контроль	$2,65 \pm 0,06$				
Фуллерени C ₆₀	$3,9 \pm 0,027$	147,2	4,79	180,8	0,50
Онїони	$3,97 \pm 0,029$	149,8	1,59	60	-0,84
УДА	$3,82 \pm 0,03$	144,2	1,46	55,1	-0,74

Позитивну кореляцію підтверджує й статистичне оброблення: Пірсонів коефіцієнт для C_{60} складає 0,5. Одночасно для оніонів та УДА спостерігалася обернена кореляція розмірів клітинних агрегатів з концентрацією — 0,84 та 0,74, відповідно (табл. 3). Зазначені впливи також підтверджуються співвідношенням розміру клітинних агрегатів у контрольних зразках та при інкубуванні з наноструктурами. В таблиці 3 наведено результати при найменшій та найбільшій концентраціях речовин.

4. ВИСНОВКИ

Таким чином, внаслідок виконання роботи було з'ясовано, що нанорозмірна структура оніонів, ультрадисперсних алмазів та фуллеренів C_{60} впливає на адгезію клітин у культурі та утворення багато-клітинних агрегатів і може визначати подальший розвиток клітинної популяції. Оніони та УДА сприяють зменшенню адгезії клітин до субстрату та сприяють збільшенню кількості дрібних клітинних сфероїдів. Фуллерени C_{60} , навпаки, створюють умови для утворення клітинних агрегатів розміром до $5 \cdot 10^{-3}$ мм³. Наведені висновки підтверджуються статистичними підрахунками Пірсонового коефіцієнта кореляції, який для оніонів складає «-0,84», УДА «-0,74», а для фуллеренів «+0,5».

Вочевидь, присутність у культуральному середовищі вуглецевих наноструктур знижує адгезію клітин до культурального субстрату та стимулює утворення великої кількості клітинних сфероїдів. Завдяки модифікації фізико-хімічних властивостей використаних нами наноматеріалів, можливо впливати на біологію клітин залежно від задач біотехнолога. Так, можна одержати спрямований ріст клітинної популяції та клітинних сфероїдів великого об'єму або, навпаки, стимулювати апоптичні процеси, знижуючи виживаність клітинної популяції.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. A. M. Schrand, S. A. Hens Ciftan, and O. A. Shenderova, *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, **34**: 18 (2009).
2. A. Krueger, J. Stegk, Y. Liang, L. Lu, and G. Jarre, *Langmuir*, **24**: 4200 (2008).
3. A. W. Jensen, S. R. Wilson, and D. I. Schuster, *Bioorg. Med. Chem.*, **4**: 767 (1996).
4. S. Yamago, H. Tokuyama, E. Nakamura, K. Kikuchi, S. Kananishi, K. Sueki, H. Nakahara, S. Enemoto, and F. Ambe, *Chem. Biol.*, **2**: 385 (1995).
5. G. Feng, De. E. Jiang, and P. T. Cummings, *J. Chem. Theory Comput.*, **8**: 1058 (2012).
6. S. Osswald, G. Yushin, V. Mochalin, S. O. Kucheyev, and Y. Gogotsi, *J. Am.*

- Chem. Soc.*, **128**: 11635 (2006).
7. V. Pichot, M. Comet, E. Fousson, C. Baras, A. Senger, F. Le Normand, and D. Spitzer, *Diamond Relat. Mater.*, **17**: 13(2008).
 8. M. Baidakova and A. Vul, *J. Physics D-Appl. Physics*, **40**: 6300 (2007).
 9. A. S. Chiganov, *Phys. Solid State*, **46**: 620 (2004).
 10. V. Y. Dolmatov, M. V. Veretennikova, V. A. Marchukov, *Phys. Solid State*, **46**: 611 (2004).
 11. I. S. Larionova, I. N. Molostov, and L. S. Kulagina, *Method of Purification of Synthetic Ultradispersed Diamonds* (RU Patent (1999) 2168462).
 12. E. V. Pavlov and J. A. Skrjabin, *Method for Removal of Impurities of Non-diamond Carbon and Device for Its Realization* (RU Patent (1994) 2019502).
 13. А. П. Каплун, Д. А. Безруков, А. В. Родина, В. И. Попенко, В. И. Швец, *Современная медицина // Нанотехника. Нанотехнологии для медицины*, **10**, № 2: 3 (2007).
 14. А. В. Елецкий, Б. М. Смирнов, *Успехи физических наук*, **165**: 977 (1995).
 15. A. W. Jensen, S. R. Wilson, and D. I. Schuster, *Bioorg. Med. Chem.*, **4**: 767 (1996).
 16. R. S. Ruoff, D. S. Tse, M. Malhotra, and D. C. Lorents, *J. Phys. Chem.*, **97**: 3379 (1993).
 17. N. Sivaraman, R. Dhamodaran, I. Kaliappan, T. G. Srinivasa, P. R. Vasudeva Rao, and C. K. Mathews, *J. Org. Chem.*, **57**, No. 22: 6077 (1992).
 18. S. V. Prylutska, U. Ritter, P. Scharff, O. P. Matyshevska, and Yu. I. Prylutskyu, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **468**: 617 (2007).
 19. N. Levi, R. Hantagan, M. Lively, D. Carroll, and G. Prasad, *J. of Nanobiotechnology*, **4**: 14 (2006).
 20. A. Djordjevic, G. Bogdanovic, and S. Dobric, *J. Vuon.*, **11**, No. 4: 391 (2006).
 21. Л. З. Богуславский, Н. С. Назарова, А. Д. Рудь, Д. В. Винниченко, И. М. Кирьян, Г. М. Зелинская, *Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии*, **10**, вип. 1: 159 (2012).
 22. A. Goel, Jack B. Howard, and John B. Vander Sande, *Carbon*, **42**: 1907 (2004).
 23. Ю. В. Долматов, *Успехи химии*, **76**, № 4: 375 (2007).
 24. P. Ganesh, P. Kent, and V. Mochalin, *Journal of Applied Physics*, **110**: 73506 (2011).
 25. Л. В. Гарманчук, О. М. Перепелиціна, М. В. Сидоренко, *Способ тестування біологічно активних сполук на придатність як лікарських засобів* (Патент на корисну модель (2008) № 35037).
 26. R. Bjerkgvig, *Spheroid Culture in Cancer Research* (Boca Raton, Florida: CRC Press: 1992).
 27. *Общая теория статистики* (ред. Р. А. Шмойловой) (Москва: Финансы и статистика: 2002).
 28. S. Iglesias-Groth, F. Cataldo, and A. Manchado, *Mon. Not. R. Astron. Soc.*, **4**: 1 (2011).