

УДК 615.46, 617.3, 617.8

Effect of Biomaterials of Medical Purpose on the Structural and Functional Features of Monocytes

**Natalia G. Menzyanova^{a*},
Elena D. Nikolaeva^a, Daria V. Vinokurova^a,
Alexandr V. Shabanov^b, Anna M. Shershneva^a,
Ekaterina I. Shishatskaya^a and Kristina V. Sukhova^a**

^a*Siberian Federal University*

79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia

^b*Kirensky Institute of Physics of SB RAS,*

38 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia

Received 14.06.2015, received in revised form 26.10.2015, accepted 09.02.2016

The morphological and functional features of the monocytes in a short-term in vitro cultivation on substrates of biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA) in the presence of nanodiamonds (ND) and fullerene (F) were studied. It has been shown that ND and F in the studied concentrations did not affect the viability of monocytes in the short-term culture. The ratio of morphological classes in the presence of ND and F significantly different from the control group of cultivation. Effects of NA and F were characterized by dose-dependent. The formation of a protein corona on the surface of NA and F led to significant changes in the effects of nanoparticles and the formation of new quantitative relationships between morphological classes of monocytes in culture in vitro. The results allow to consider a short-term culture of monocytes in vitro as a model system for adequate assessment of the impact of new materials on the processes of differentiation of monocyte subpopulations.

Keywords: biomaterials for medical uses, polyhydroxyalkanoates, monocytes, nanodiamonds, fullerenes.

DOI: 10.17516/1997-1389-2015-9-1-33-42.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: mennage@mail.ru

Влияние биоматериалов медицинского назначения на структурно-функциональные особенности моноцитов

**Н.Г. Мензянова^а, Е.Д. Николаева^а,
Д.В. Винокурова^а, А.В. Шабанов^б,
А.М. Шершнева^а, Е.И. Шишацкая^а, К.В. Сухова^а**

^аСибирский федеральный университет

Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

^бИнститут физики им. Л.В. Киренского СО РАН

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 38

*Изучены морфофункциональные особенности моноцитов в условиях кратковременного культивирования *in vitro* на носителях из биополимера полигидроксиалканоата (ПГА) в присутствии наноалмазов (НА) и фуллеренов (Ф). Показано, что НА и Ф в исследованных концентрациях не влияли на жизнеспособность моноцитов в кратковременной культуре. Соотношение морфологических классов моноцитов в присутствии НА и Ф существенно отличалось от контрольного варианта культивирования. Влияние НА и Ф характеризовалось дозовой зависимостью. Воздействие наночастиц на культуру моноцитов значительно изменялось при формировании белковой короны на поверхности НА и Ф, что приводило к возникновению новых количественных соотношений между морфологическими классами моноцитов в культуре *in vitro*. Полученные результаты позволяют рассматривать кратковременную культуру моноцитов *in vitro* как адекватную модельную систему для оценки влияния новых материалов на процессы дифференцировки субпопуляций моноцитов.*

Ключевые слова: биоматериалы медицинского назначения, полигидроксиалканоаты, моноциты, наноалмазы, фуллерены.

Введение

В настоящее время наночастицы и наноструктурированные материалы рассматриваются как перспективные «инструменты» целенаправленной регуляции дифференцировки и функциональной активности клеток. В огромном потоке экспериментальных исследований влияния наноматериалов на биологические системы (от клеток до экосистем) выделяются два направления, которые могут сыграть решающую роль в развитии технологий управления дифференцировкой клеток *in vitro* и *in vivo*.

Первое направление связано с изучением нерецепторных систем взаимодействия клеточной мембраны с наноматериалами, систем нерецепторного сигналинга и его эффекторных мишеней. Рецепторнезависимый сигналинг – механохимическая трансляция сигнала, зависящая от кривизны биомембраны (Galic et al., 2014; Echarri et al., 2015). Физические силы, которые возникают в плазматической мембране в процессе интернализации частиц, запускают наноразмерные деформации мембраны, которые затем транслируются в химический сигнал, активирующий каскад

трансдукции (Bharde et al., 2013; Lee et al., 2014; Curtis et al., 2014; Henstock et al., 2014, 2015; Kilinc et al., 2016).

Второе направление связано с модификацией влияния наноматериалов через формирование белковой короны: сорбции различных белков на поверхности наночастиц. Особенности белковой короны определяют пути интернализации, системы внутриклеточного сигналинга и эффекторные мишени: системы липидного метаболизма, окислительно-восстановительного гомеостаза, провоспалительных и противовоспалительных реакций (Fleischer et al., 2014; Mortimer et al., 2014; Hata et al., 2014; Shannahan et al., 2015; Matczuk et al., 2015; Di Silvio et al., 2015; Zanganeh et al., 2016; Polyak et al., 2016).

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что исследования в этих двух направлениях будут способствовать дальнейшему развитию представлений о механизмах влияния наноматериалов на биологические системы.

В работе изучали морфофункциональные особенности клеток крови в условиях культивирования *in vitro* на наноструктурированных подложках из ПГА в присутствии наночастиц углерода – наноалмазов (НА) и фуллеренов (Ф).

Выбор НА и Ф в качестве модельных наночастиц был обусловлен следующими причинами. С учетом известной зависимости биологических эффектов наночастиц от их размеров использование частиц конкретного класса позволяет определить конкретные эффекторные мишени и обеспечивает хорошую воспроизводимость результатов в стандартных условиях.

Высокая биосовместимость полигидроксисилканоатов (ПГА) показана в многолетних экспериментальных и клинических исследованиях на всех уровнях ответа биологических

систем (Volova et al., 2013), тогда как биосовместимость НА и Ф остается под вопросом, что и определило подход, используемый в работе. На поверхности НА и Ф в результате адсорбции различных белков в физиологических условиях формируется белковая корона. Кроме того, размерные особенности НА (размеры НА были соизмеримы с размерами некоторых крупных белков) и Ф позволяют предположить нерцепторную интернализацию этих частиц и ожидать специфические морфологические изменения клеточных мембран.

Материалы и методы

Образцы ПГА получены на основе микробного синтеза в Институте биофизики СО РАН (ИБФ СО РАН) и Сибирском федеральном университете (СФУ) (Volova et al., 2013). Стабильные водные растворы наноалмазов (НА) и фуллеренов (Ф) (С60) предоставлены лабораторией нанобиотехнологии и биолюминесценции ИБФ СО РАН (Бондарь, 2004). Средний диаметр НА (54,07±0,35) нм, индекс PdI = 0,225±0,005. Средний диаметр Ф составлял (94,64±3,12) нм, индекс PdI = 0,482±0,031.

Использовали полимерные подложки в виде пленок, полученные методом полива раствора ПГА на обезжиренную поверхность тефлона с последующим полным высушиванием растворителя в боксе-ламинаре.

Варианты культивирования моноцитов:

1. Подложка из ПГА, среда DMEM с фетальной сывороткой (контроль).
2. Подложка из ПГА, среда DMEM с фетальной сывороткой, НА в различной концентрации (конечная концентрация 5, 25, 50 мкг/мл).
3. Подложка из ПГА, среда DMEM с фетальной сывороткой, Ф в различной концентрации (конечная концентрация 5, 25, 50 мкг/мл).

4. Подложка из ПГА, среда DMEM с фетальной сывороткой, НА в различной концентрации (конечная концентрация 5, 25, 50 мкг/мл). НА предварительно 5 мин инкубировали в фетальной сыворотке для образования белковой «короны».
5. Подложка из ПГА, среда DMEM с фетальной сывороткой, Ф в различной концентрации (конечная концентрация 5, 25, 50 мкг/мл). Ф предварительно инкубировали 5 мин в фетальной сыворотке для образования белковой короны.

Моноциты выделяли из периферической крови здоровых доноров на градиенте плотности фиколл-урографин по методу H.R. Recalde (1984). Выделенные моноциты суспендировали в среде DMEM с фетальной сывороткой. Клеточные суспензии моноцитов вносили в пластиковые 96-луночные культуральные планшеты (10⁴ клеток на лунку, объем 80 мкл), на дне лунок находились стерильные пленочные подложки. Растворы НА и Ф готовили на среде DMEM с 10%-ной фетальной сывороткой. В экспериментальные варианты вносили по 80 мкл растворов НА и Ф разной концентрации, в контрольный вариант – 80 мкл среды DMEM с 10%-ной фетальной сывороткой. Клетки культивировали 36 ч в CO₂-инкубаторе. После завершения инкубации удаляли культуральную среду и фиксировали клетки 2,5 % глутаровым альдегидом на фосфатном буфере, pH=7,4. После фиксации клеточные образцы по общепринятым методам (Parameswaran, 2011) готовили для электронно-микроскопического анализа с помощью сканирующего микроскопа Quanta FEI 200 (США). Жизнеспособность клеток в различных экспериментальных вариантах определяли с помощью МТТ-

теста с [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромидом] (Sigma).

Результаты и обсуждение

Показано, что Ф (без белковой короны и после предварительного формирования белковой короны) в исследованных концентрациях не влияли на жизнеспособность клеток по сравнению с контрольным вариантом (табл. 1).

При добавлении в среду НА в концентрации 50 мкг/мл количество жизнеспособных и метаболически активных клеток (определяемое с помощью МТТ-теста) было выше по сравнению с контрольным вариантом (табл. 1). Вероятно, это связано с активацией продукции реактивных форм кислорода в митохондриях моноцитов. После предварительного формирования белковой короны на поверхности НА величина экстинкции в МТТ-тесте для варианта с НА в концентрации 50 мкг/мл не отличалась от контроля. Это позволяет говорить, что формирование белковой короны влияет на процессы интернализации НА и их воздействие на клетку.

Процессы интернализации наночастиц и последующие реакции эффекторных систем могут сопровождаться значительными перестройками рельефа плазматической мембраны и морфологии клеток в целом. В связи с этим на следующем этапе работы был проведен морфологический анализ клеток в различных условиях культивирования.

В контрольном варианте было выделено четыре основных морфологических класса моноцитов (табл. 2 и рис. 1). Преобладали сферические клетки с тонким рельефом из микроворсинок – 54 % (рис. 1а, б; класс 1 в табл. 2). Вторым по численности был морфологический класс адгезированных клеток с выраженными мембранными раффлами на поверхности (рис. 1в, г; класс 2 в табл. 2) –

Таблица 1. Жизнеспособность моноцитов (результаты МТТ-теста) при культивировании на подложке из ПГА с добавлением в среду наночастиц. Приведены значения экстинкции для $\lambda=570$ нм

Варианты культивирования	Концентрация наночастиц в среде культивирования		
	2,5 мкг/мл	25 мкг/мл	50 мкг/мл
Контроль	0,051		
Ф	0,048	0,058	0,051
Ф+К	0,055	0,059	0,055
НА	0,053	0,053	0,073
НА+К	0,055	0,051	0,045

Примечание. Контроль – культивирование без добавления наночастиц; Ф – культивирование в присутствии фуллеренов; НА – культивирование в присутствии наноалмазов; Ф+К – культивирование в присутствии фуллеренов с белковой короной; НА+К – культивирование в присутствии наноалмазов с белковой короной.

Таблица 2. Соотношение морфологических классов моноцитов при культивировании на подложке из ПГА с добавлением в среду наночастиц

	Морфологические классы моноцитов, % от общего количества клеток					
	1. Сферические клетки с «микроворсинками» на поверхности	2. Адгезированные клетки с рафлами на поверхности	3. Адгезированные «плоские» клетки со сложным рельефом мембраны	4. Макрофагоподобные клетки	5. Адгезированные «плоские» клетки с гладким краем	6. Макрофагоподобные клетки, «покрытые» тромбоцитами
Контроль	54	21	11	14	0	0
Ф, 25 мкг/мл	8	4	4	4	80	0
Ф+К, 25 мкг/мл	50	33	17	0	0	0
Ф, 50 мкг/мл	25	1	11	13	0	50
НА, 25 мкг/мл	55	10	20	5	10	0
НА+К, 25 мкг/мл	40	13	47	0	0	0
НА, 50 мкг/мл	50	43	2	5	0	0
НА+К, 50 мкг/мл	70	11	15	4	0	0

Примечание. Контроль – культивирование без добавления наночастиц; Ф – культивирование в присутствии фуллеренов, конечная концентрация 25 и 50 мкг/мл; НА – культивирование в присутствии наноалмазов, конечная концентрация 25 и 50 мкг/мл; Ф+К – культивирование в присутствии фуллеренов с белковой короной, конечная концентрация 25 мкг/мл; НА+К – культивирование в присутствии наноалмазов с белковой короной, конечная концентрация 25 и 50 мкг/мл.

21 %. 3-й класс (11 %) был представлен плоскими, распластанными клетками со сложным рельефом плазматической мембраны по периметру (рис. 1д, е; класс 3 в табл. 2). Для этого типа клеток были характерны контакты с одиночными тромбоцитами и группами

агрегированных тромбоцитов. Макрофагоподобные клетки (рис. 1ж, з, и; 4-й класс в табл. 2) были немногочисленны – 14 % от всей клеточной популяции. Морфологическая гетерогенность популяции моноцитов в культуре связана с существованием различных

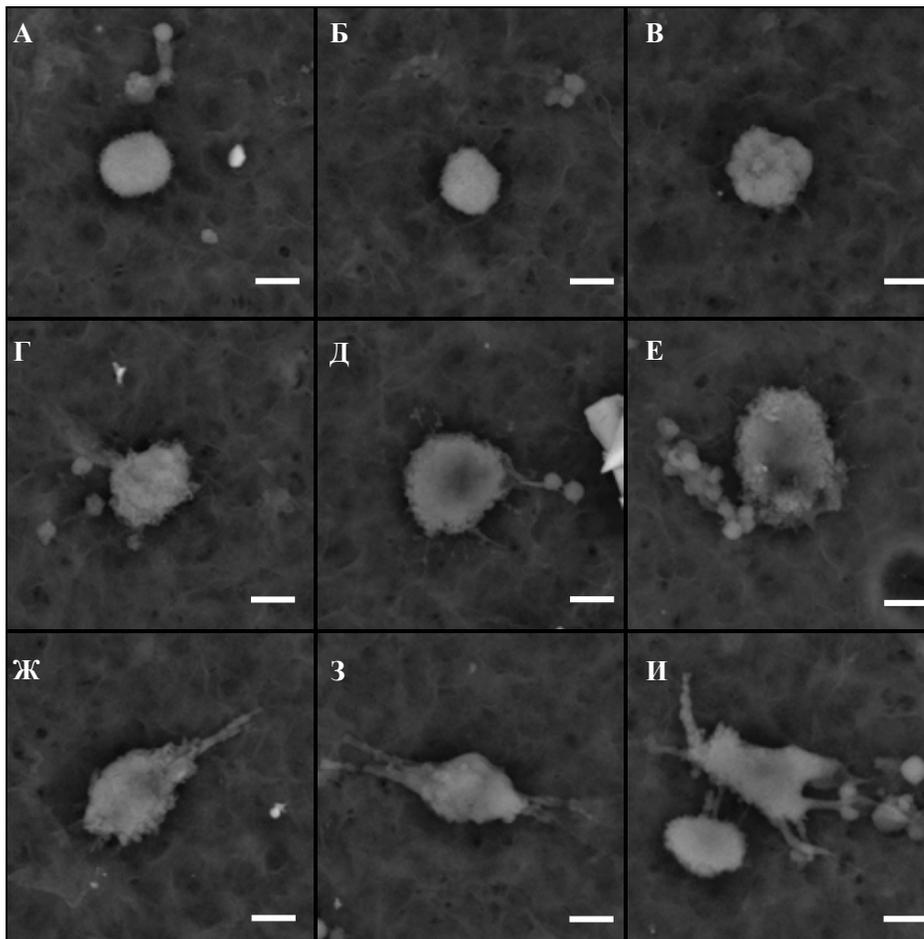


Рис. 1. Морфологические типы моноцитов при культивировании на подложках из ПГА. Контрольный вариант: А, Б – сферические клетки с тонким рельефом из «микроворсинок» (класс 1 в табл. 2); В, Г – адгезированные клетки с раффлами на поверхности (класс 2 в табл. 2); Д, Е – адгезированные «плоские» клетки со сложным рельефом мембраны по краю (класс 3 в табл. 2); Ж, З, И – макрофагоподобные клетки (класс 4 в табл. 2). На всех микрофотографиях масштабный отрезок соответствует 3 мкм

структурно-функциональных субпопуляций циркулирующих в сосудистом русле моноцитов (Stansfield et al., 2015; Mikołajczyk et al., 2016). После выделения из крови субпопуляции моноцитов «реализуют» специфические программы дифференцировки в культуре *in vitro*, в частности морфологические перестройки плазматической мембраны. В результате гетерогенность клеточной популяции сохраняется и в условиях *in vitro*.

Добавление наночастиц в среду приводило к существенным изменениям в количе-

ственных соотношениях между различными морфологическими классами (табл. 2). Так, присутствие Ф в концентрации 25 мкг/мл приводило к появлению нового морфологического класса клеток – адгезированных плоских клеток с гладкими краями (рис. 2а, б; класс 5 в табл. 2). К этому классу относилось 80 % клеточной популяции. Клетки этого типа часто наблюдались в контакте с тромбоцитами.

В варианте с Ф, модифицированными белковой короной (концентрация 25 мкг/мл), этот морфологический класс адгезированных

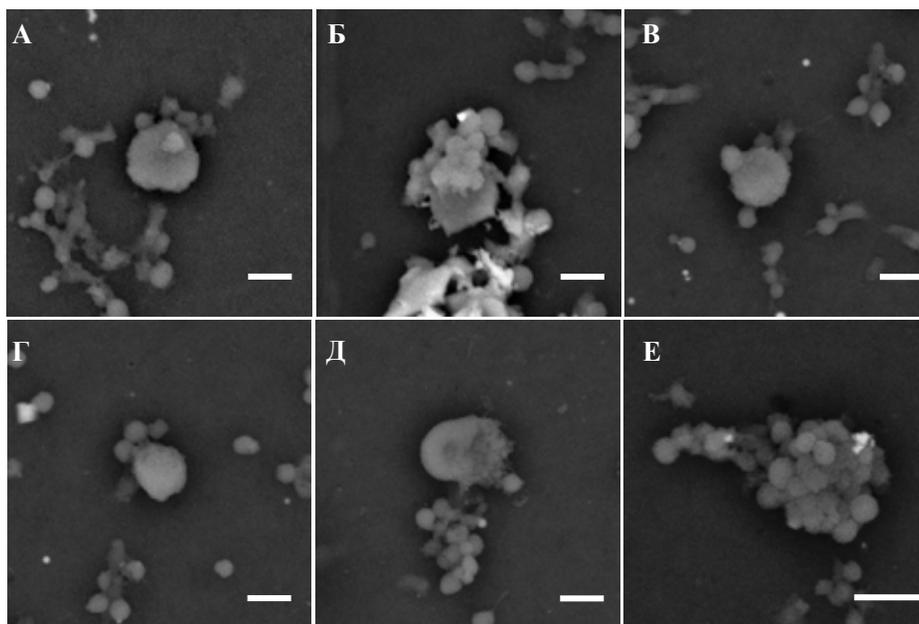


Рис. 2. Морфологические типы моноцитов при культивировании на подложках из ПГА с добавлением в среду фуллеренов (Ф) и фуллеренов с белковой короной (Ф+К): А, Б – культивирование в присутствии Ф, 25 мкг/мл. Адгезированные «плоские» клетки с гладким краем (класс 5 в табл. 2) контактируют с одиночными тромбоцитами (А); группа агрегированных тромбоцитов на поверхности «плоского» моноцита (Б); В, Г, Д – культивирование в присутствии Ф+К, 25 мкг/мл. Сферические клетки с «микроворсинками» (класс 1 в табл. 2) контактируют с тромбоцитами (В, Г). Плоская клетка с раффлами на одной стороне контактирует с группой агрегированных тромбоцитов (Д); Е – культивирование в присутствии Ф, 50 мкг/мл. Макрофагоподобный моноцит, покрытый тромбоцитами (класс 6 в табл. 2). На всех микрофотографиях масштабный отрезок соответствует 3 мкм

плоских клеток с гладкими краями не выявлялся и доминировал класс сферических клеток с рельефом из микроворсинок (рис. 2в, г; класс 1 в табл. 2). Причем эти клетки часто встречались в контакте с группами тромбоцитов (рис. 2в, г).

Наличие в среде Ф в концентрации 50 мкг/мл приводило к появлению макрофагоподобных клеток, поверхность которых была покрыта тромбоцитами шарообразной формы (рис. 2е; класс 6 в табл. 2). Эти клетки составляли 50 % всей популяции моноцитов.

В присутствии НА формировались совершенно иные количественные соотношения между морфологическими классами, отличные и от контрольного варианта, и от варианта с Ф (табл. 2). При этом воздействие НА с

белковой короной и без нее значительно различалось. Так, численность класса адгезированных плоских клеток со сложным рельефом мембраны по краю (рис. 3а; класс 3 в табл. 2) возрастала в 2 раза после формирования белковой короны на частицах НА (концентрация 25 мкг/мл). Для НА в концентрации 50 мкг/мл после формирования белковой короны численность адгезированных клеток с раффлами уменьшалась в 4 раза (рис. 3б, в; класс 2 в табл. 2).

Следует также отметить, что макрофагоподобные клетки (рис. 1ж, з, и; класс 4 в табл. 2) в заметных количествах наблюдали в контрольном варианте и в случае культивирования с Ф в концентрации 50 мкг/мл. В других экспериментальных вариантах чис-

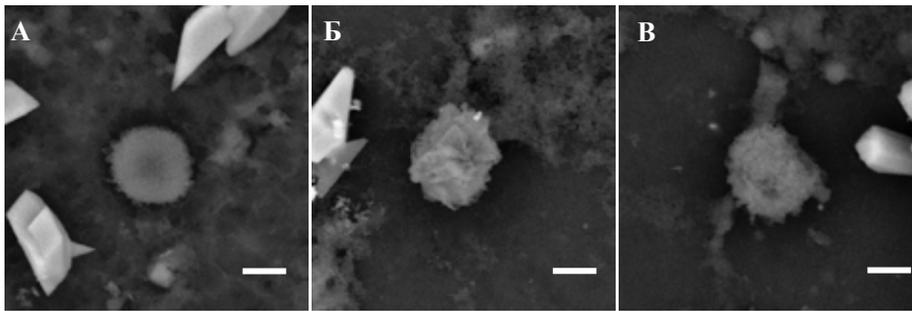


Рис. 3. Морфологические типы моноцитов при культивировании на подложках из ПГА с добавлением в среду наноалмазов без короны (НА) и наноалмазов с белковой короной (НА+К): А – культивирование в присутствии НА, 25 мкг/мл и НА+К, 25 мкг/мл. Адгезированные «плоские» клетки с тонким рельефом из «микроворсинок» (класс 3 в табл. 2); Б, В – культивирование в присутствии НА, 50 мкг/мл. Адгезированные клетки с мембранными раффлами (класс 2 в табл. 2). На всех микрофотографиях масштабный отрезок соответствует 3 мкм

ленность макрофагоподобных клеток резко сокращалась (табл. 2).

На основе полученных результатов можно предположить, что взаимодействие Ф и НА с различными структурно-функциональными субпопуляциями моноцитов, выделенных из периферической крови, приводит к значительным изменениям процессов морфофункциональной дифференцировки этих субпопуляций *in vitro* по сравнению с контрольным вариантом культивирования. Так, под влиянием Ф дифференцировалась субпопуляция моноцитов, мембрана которых характеризовалась повышенной адгезивностью для тромбоцитов. Это может быть как следствием активации синтеза цитокинов, привлекающих тромбоциты, так и формированием адгезивного для тромбоцитов антигенного спектра мембраны моноцитов. Следует также отметить, что в контактных группах моноцит–тромбоциты последние сохраняли гладкую шарообразную форму.

Важно и то, что белковая корона на поверхности Ф и НА значительно модифицировала процессы морфофункциональной дифференцировки субпопуляций моноцитов по сравнению с наночастицами без короны.

Влияние Ф и НА на процессы морфофункциональной дифференцировки субпопуляций моноцитов может реализоваться: а) через систему рецепторной интернализации; б) учитывая размерные особенности Ф и НА, через нерцепторные взаимодействия наночастиц с плазматической мембраной и активацию механохимического сигналинга. Полученных данных недостаточно для того, чтобы обсуждать вклад каждого из двух вариантов интернализации наночастиц в процессы дифференцировки субпопуляций моноцитов *in vitro*. Но выявленные выраженные изменения в количественных соотношениях морфологических классов моноцитов в условиях кратковременного культивирования позволяют использовать морфологический критерий для предварительной оценки влияния наночастиц на процессы дифференцировки субпопуляций моноцитов *in vitro*.

Заключение

Установлено, что наноалмазы и фуллерены в исследованных концентрациях не влияют на жизнеспособность моноцитов в кратковременной культуре *in vitro*; но соотношение морфологических классов моноцитов в

присутствии НА и Ф существенно отличалось от контрольного варианта культивирования. Влияние НА и Ф на морфологическом уровне характеризовалось дозовой зависимостью. Показано, что при формировании белковой короны на поверхности НА и Ф влияние наночастиц на клетки значительно изменялось, что приводило к формированию новых количественных

соотношений между морфологическими классами моноцитов в культуре *in vitro*. Результаты, полученные на примере наночастиц, позволяют рекомендовать кратковременную культуру моноцитов *in vitro* в качестве адекватной модельной системы для оценки влияния новых материалов на процессы дифференцировки субпопуляций моноцитов.

Коллектив соавторов выражает глубокую признательность сотрудникам лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции ИБФ СО РАН А.П. Пузырю и В.С. Бондарю за предоставленные для проведения эксперимента образцы материалов.

Список литературы

Бондарь В.С., Пузырь А.П. (2004) Наноалмазы для биологических исследований. *Физика твердого тела*, 46: 698-701 [Bondar V.S., Puzir A.P. (2004) Nanodiamonds for biological research. *Physics of hard body* [Fizika tverdogo tela], 46: 698-701 (in Russian)]

Bharde A.A., Palankar R., Fritsch C., Klaver A., Kanger J.S., Jovin T.M., Arndt-Jovin D.J. (2013) Magnetic nanoparticles as mediators of ligand-free activation of EGFR signaling. *PLoS One*, 8 (7): e68879. DOI: 10.1371/journal.pone.0068879

Curtis A.S., Tsimbouri P.M. (2014) Epigenesis: roles of nanotopography, nanoforces and nanovibration. *Expert Review of Medical Devices*, 11 (4): 417-423

Di Silvio D., Rigby N., Bajka B., Mackie A., Baldelli Bombelli F. (2015) Effect of protein corona magnetite nanoparticles derived from bread *in vitro* digestion on Caco-2 cells morphology and uptake. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.10.019

Echarri A., Del Pozo M.A. (2015) Caveolae – mechanosensitive membrane invaginations linked to actin filaments. *Journal of Cell Science*, 128 (15): 2747-2758

Fleischer C.C., Payne C.K. (2014) Nanoparticle-cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes. *Accounts of Chemical Research*, 47 (8): 2651-2659

Galic M., Begemann I., Viplav A., Matis M. (2014) Force-control at cellular membranes. *Bioarchitecture*, 4 (4-5): 164-168

Hata K., Higashisaka K., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. (2014) Evaluation of silica nanoparticle binding to major human blood proteins. *Nanoscale Research Letters*, 9: 668. DOI: 10.1186/1556-276X-9-668

Henstock J., El Haj A. (2015) Controlled mechanotransduction in therapeutic MSCs: can remotely controlled magnetic nanoparticles regenerate bones. *Regenerative Medicine*, 10(4): 377-380

Henstock J.R., Rotherham M., Rashidi H., Shakesheff K.M., El Haj A.J. (2014) Remotely activated mechanotransduction via magnetic nanoparticles promotes mineralization synergistically with bone morphogenetic protein 2: applications for injectable cell therapy. *Stem Cells Translational Medicine*, 3(11): 1363-1374

Kilinc D., Dennis C.L., Lee G.U. (2016) Bio-nano-magnetic materials for localized mechanochemical stimulation of cell growth and death. *Advanced Materials*. DOI: 10.1002/adma.201504845

Lee J.H., Kim J.W., Levy M., Kao A., Noh S.H., Bozovic D., Cheon J. (2014) Magnetic nanoparticles for ultrafast mechanical control of inner ear hair cells. *American Chemical Society Nano*, 8(7): 6590-6598

Matczuk M., Anecka K., Scaletti F., Messori L., Keppler B.K., Timerbaev A.R., Jarosz M. (2015) Speciation of metal-based nanomaterials in human serum characterized by capillary electrophoresis coupled to ICP-MS: a case study of gold nanoparticles. *Metallomics*, 7(9): 1364-1370

Mikołajczyk T.P., Osmenda G., Batko B., Wilk G., Krezelok M., Skiba D., Sliwa T., Pryjma J.R., Guzik T.J. (2016) Heterogeneity of peripheral blood monocytes, endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 25(1): 18-27

Mortimer G.M., Butcher N.J., Musumeci A.W., Deng Z.J., Martin D.J., Minchin R.F. (2014) Cryptic epitopes of albumin determine mononuclear phagocyte system clearance of nanomaterials. *American Chemical Society Nano*, 8(4): 3357-3366

Parameswaran S., Verma R.S. (2011) Scanning electron microscopy preparation protocol for differentiated stem cells. *Analytical Biochemistry*, 416 (2):186-190

Polyak B., Cordovez B. (2016) How can we predict behavior of nanoparticles *in vivo*. *Nanomedicine (London)*. DOI: 10.2217/nnm.15.192

Recalde H.R. (1984) A simple method of obtaining monocytes in suspension. *Journal of Immunological Methods*, 69 (1): 71-77

Shannahan J.H., Podila R., Brown J.M. (2015) A hyperspectral and toxicological analysis of protein corona impact on silver nanoparticle properties, intracellular modifications, and macrophage activation. *International Journal of Nanomedicine*, 10: 6509-6521

Stansfield B.K., Ingram D.A. (2015) Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clinical and Translational Medicine*, 4: 5. DOI: 10.1186/s40169-014-0040-3

Zanganeh S., Spitler R., Erfanzadeh M., Mahmoudi M. (2016). Protein corona: opportunities and challenges. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. DOI: 10.1016/j.biocel.2016.01.005

Volova T.G., Shishatskaya E.I., Sinsky A.J. (2013) *Degradable Polymers: Production, Properties, Applications*. Nova Science Pub. Inc., NY, USA, 30 p.