

Пористый кремний и его применение в биологии и медицине

© О.И. Ксенофонтова,¹ А.В. Васин,¹ В.В. Егоров,¹ А.В. Бобыль,² Ф.Ю. Солдатенков,²
Е.И. Теруков,^{2,3} В.П. Улин,² Н.В. Улин,² О.И. Киселев¹

¹ Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376 Санкт-Петербург, Россия

² Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, 194021 Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет им. В.И. Ульянова (Ленина), 197376 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: vasin@influenza.spb.ru, f.soldatenkov@mail.ioffe.ru

(Поступило в Редакцию 6 марта 2013 г.)

Разработка безопасных контейнерных материалов для направленной и контролируемой доставки лекарств в организм является одним из важнейших аспектов современных биотехнологий. В последнее десятилетие достигнут значительный прогресс в изучении наноструктурированных переносчиков лекарств, однако использование многих наноматериалов связано с огромным риском вследствие их высокой токсичности. Настоящим прорывом стало применение пористого кремния, который обладает такими важными свойствами, как биосовместимость, биодоступность и способность к биодеградации, что позволяет применять его для решения широкого спектра биологических и медицинских задач в области диагностики и лечения заболеваний, имплантологии, биомолекулярного скрининга.

Введение

В последнее время идея использования наноструктурированных контейнеров для направленной доставки лекарств вызывает повышенный интерес у специалистов в области биологии и медицины. Причиной этому служат не только успехи в создании новых наноматериалов, но также низкая эффективность традиционных способов введения лекарств (перорально, подкожно и др.) [1]. Известно, что только небольшая часть вводимого препарата попадает непосредственно в очаг заболевания [2]. Кроме того, медицинские препараты, как правило, вызывают побочные эффекты, поэтому их дозы строго ограничены [3]. Перспективным направлением для решения этих проблем становится применение пористых неорганических материалов на основе кремния.

1. Кремний в природе

Известно, что кремний (Si) — это второй после кислорода по распространенности элемент в земной коре, доля которого составляет около 27%. Кроме того, Si является важнейшим микроэлементом в организме человека. Он обнаружен во многих органах и тканях, таких как легкие, надпочечники, трахеи, кости и связки, что свидетельствует о его повышенной биосовместимости [4]. С пищей в организм человека ежедневно поступает до 1 г Si, недостаток этого элемента может приводить к ослаблению костной ткани и развитию инфекционных заболеваний [5].

2. Пористый кремний и его получение

Понятие „пористый кремний“ объединяет в себе широкий класс материалов со скелетной структурой, образующихся в результате самоорганизующегося процесса анодного травления монокристаллического кремния во фторидных электролитах. Спонтанно возникающая на поверхности раздела кристалл–электролит система дискретных пятен электрохимической реакции дает начало протяженным ветвящимся каналам (порам), прорастающим в объем кристалла. В зависимости от поперечного размера пор (d) получающиеся структуры принято по классификации Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC) подразделять на макро- ($d > 50$ nm), мезо- (d от 2 до 50 nm) и микропористый кремний ($d < 2$ nm).

2.1. Механизм порообразования

Несмотря на более чем полувековую историю изучения электрохимического порообразования, первоначально обнаруженного в кремнии [6], а затем и во многих других полупроводниковых кристаллах с алмазоподобной структурой (A_3B_5 , A_2B_6 , Ge, SiC), причины самоорганизации этого процесса и обеспечивающие его механизмы анодных реакций остаются недостаточно понятными [7,8]. Очевидно лишь, что порообразование протекает всегда как начальная фаза активного анодного процесса в относительно узком диапазоне анодных смещений. В этих условиях фронт электрохимической реакции оказывается флуктуационно неустойчивым, а химический механизм развивающегося локального травления кристалла — качественно отличным от механизма сплошного электрохимического травления,

реализующегося при больших анодных потенциалах. Для кремния, в частности, эффективная валентность в процессах порообразования близка к двум. При этом образование в электрохимической реакции продуктов неполного окисления подтверждается необычным для анодных процессов восстановлением водорода в HF-содержащих электролитах. Важно отметить, что для кремния *p*- и *n*-типов проводимости в широком диапазоне концентраций носителей заряда химические механизмы порообразования остаются качественно одинаковыми, что ставит под сомнение определяющую роль доставки дырок к поверхности кристалла для обеспечения реакции с анионами фтора.

В настоящее время существует обширная литература, посвященная изучению и попыткам интерпретации феномена порообразования, как с точки зрения физических причин его возникновения, так и химических процессов, формирующих структуру и состав пористых кристаллов. Наиболее полно существующие представления отражены в следующих монографиях и обзорах — [9–12].

Общепринятой причиной появления зародышей пор считается локальный электрический пробой в слое объемного заряда или в слое диэлектрической фазы на границе раздела полупроводник–электролит, в пятне которого и развиваются электрохимические реакции [13]. Наличие слоя объемного заряда, окружающего каналы прорастающих пор, также является важнейшим фактором, определяющим их пространственное взаимодействие и формирование скелетной структуры пористого кристалла [14]. Значительно меньше ясности в представлениях о реальных механизмах химических процессов, обеспечивающих порообразование в кремнии и других полупроводниках. Обычно постулируется, что, так же как и при сплошном электрохимическом травлении Si, разрушение решетки кристалла происходит за счет отделения от нее одиночных атомов. В этом случае, однако, приходится либо допустить, что десорбирующимся продуктом должны становиться нестабильные молекулы дифторида кремния (SiF₂) [15], либо, что анодная реакция, приводящая к образованию молекул H₂ и SiF₄, является последовательностью нескольких элементарных процессов, в которых должны участвовать как анионы F⁻, так и катионы H⁺. Это в свою очередь требует допущения о поочередном захвате дырки и инъекции в кристалл электрона отделяющимся от него атомом [16]. Переход от порообразования к сплошному травлению кремния при увеличении приложенного напряжения связывается с участием молекул воды в реакции анодного окисления и с появлением разделительной пленки окисной фазы, растворяющейся затем с образованием H₂SiF₆. В последнее время наиболее универсальной считается предложенная немецкими исследователями группы Фёлля (Föll) так называемая „current-burst“ модель порообразования в полупроводниках. Эта модель оперирует представлениями о циклически повторяющихся электрохимических (с протеканием тока) и химических (бестоковых) процессах,

развивающихся на дне прорастающих пор. Такие процессы включают окисление полупроводника с образованием пассивирующего диэлектрического слоя, последующее разрушение которого в контакте с электролитом, завершающееся электрическим пробоем и воссозданием пассивирующей прослойки [17]. В случае с кремнием в этой цепочке процессов важная роль отводится стадии формирования гидридного покрытия, приводящего к распыливанию (откреплению) уровня Ферми на поверхности кристалла, что снижает высоту потенциального барьера и провоцирует начало электрохимической реакции. Модель Фёлля дает подход к объяснению часто наблюдающихся при росте пористых слоев осцилляций тока (напряжения) и модуляции поперечного размера каналов пор, а также к интерпретации анизотропии распространения пор в кристаллах. В то же время нельзя не заметить слабость химического обоснования столь резких изменений характера гетерогенных процессов на полупроводниковых анодах, тем более, что предложенный механизм прорастания пор автоматически распространяется на материалы различной химической природы.

Проведенное несколько лет назад исследование влияния состава электролита и условий анодирования на формирование пор в кристаллах соединений A³B⁵ со структурой сфалерита [18] позволило обосновать принципиально иную модель электрохимического порообразования [19], опирающуюся на представления о кооперативных реакциях нуклеофильного замещения с участием анионов, образующих плотный хемосорбционный слой на поверхности кристалла, и координационно-насыщенных атомов подлежащего слоя его решетки. Можно провести достаточно близкую аналогию между предложенным механизмом гетерогенных электрохимических реакций и механизмом хорошо известных в органической химии и химии координационных соединений реакций S_N2 нуклеофильного замещения. В рассматриваемом случае специфика таких реакций заключается в том, что они протекают на поверхности кристалла, представляющего собой периодическую пространственную структуру, образованную непрерывно связанными друг с другом атомами (объемный полимер). Единичный акт реакции нуклеофильного замещения, происходящий с отдельным атомом, включенным в решетку кристалла, привел бы к значительным деформациям окружающих его связей и резкому локальному повышению уровня свободной энергии системы, что термодинамически неоправданно. В этом отношении более предпочтительным оказывается кооперативный путь процесса, в элементарный акт которого вовлекается достаточно большая группа компактно расположенных атомов и атомов решетки кристалла.

Падение приложенного напряжения в слое Гельмгольца, на границе раздела полупроводник–электролит и в приповерхностной области объемного заряда становится движущей силой циклически повторяющихся процессов нуклеофильного замещения и продвижения

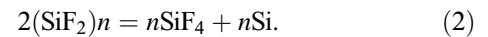
фронта реакции вглубь кристалла. При достижении некоторой пороговой величины скачка потенциала в слое Гельмгольца появляется возможность туннелирования электронов с заполненных уровней несвязывающих орбиталей адатомов на сблизившиеся с ними по энергетическому положению вакантные уровни антисвязывающих или несвязывающих орбиталей координационно-насыщенных атомов приповерхностного слоя кристалла. Такой флуктуационно возникающий процесс означает перенос химической связи каждого адатома с атома внешнего атомного слоя кристалла на ближайший координационно-насыщенный атом нижележащего слоя. При этом в пятне реакции возникает система сопряженных переходных комплексов, синхронная релаксация которых сопровождается разрывом химических связей с очередным слоем атомов в кристалле. Таким образом, осуществляется акт травления, в котором от кристалла отделяются полимерные группировки, включающие атомы двух смежных слоев его решетки. Диссоциация существовавших в кристалле связей высвобождает электроны, экстрагирующиеся из зоны реакции градиентом потенциала, создающимся внешним источником. Именно эти электроны и обеспечивают протекание анодного тока. Цикл завершается заселением образовавшихся незаполненных связей (электрофильных центров адсорбции) анионами, поступающими из электролита. В описанном процессе самоорганизующегося локального травления реализуется неполное окисление материала полупроводника, поскольку отделяющиеся от кристалла полимерные группировки частично сохраняют существовавшие в кристалле химические связи.

Конкретный химический механизм кооперативной реакции нуклеофильного замещения определяется характером вакантных орбиталей атомов приповерхностного слоя кристалла, энергетические уровни которых наиболее близки к состояниям валентной зоны. (Очевидно, что заполненные состояния, соответствующие неподеленным парам электронов адсорбированных анионов в отсутствие внешнего поля, могут располагаться только в области валентной или запрещенной зоны полупроводника). В прямозонных полупроводниках с тетраэдрической структурой (таких как GaAs и InP) электронным переходам в точке Г зоны Бриллюэна можно сопоставить переходы со связывающих на антисвязывающие sp^3 -молекулярные орбитали. Это диктует протекание нуклеофильной атаки вдоль направлений связей в кристалле, т.е. кристаллографических направлений $\langle 111 \rangle$, и формирование первичного продукта реакции анионов X^- с соединением АВ, отвечающего стехиометрии $(ABX_2)_n$. В кристаллах кремния ширину запрещенной зоны определяют непрямые электронные переходы с энергией 1.12 eV на шестикратно вырожденные состояния X-долины зоны проводимости, что значительно ниже энергии прямых переходов ~ 3.4 eV в центре зоны Бриллюэна. Различия в симметрии долин зоны проводимости, уровни которых соответствуют орбиталям, участвующим в образовании связей переходных комплексов, пред-

полагают различный тип гибридизации электронов на этих связях. Поэтому в отличие от реакций нуклеофильного замещения на поверхности прямозонных полупроводников A^3B^5 разумно предположить, что кремний в этих реакциях реализует свои несвязывающие d^2sp^3 -орбитали, как это происходит при образовании комплексных ионов $[SiF_6]^{-2}$. Соответствующий механизм реакции должен обеспечивать стехиометрию первичного продукта, образуемого после релаксации переходных комплексов с диссоциацией двух связей Si-Si у каждого из участвующих в ней атомов решетки, — $(SiF_2)_n$. Иными словами, прорастание пор в кремнии должно сопровождаться отделением от решетки линейных полимерных цепочек из атомов кремния, каждый из которых связан с двумя атомами фтора. В кристаллах кремния структурные элементы, состоящие из цепочек связанных атомов, принадлежат сдвоенным плоскостям (100). Поэтому продвижение фронта травления в пятне реакции должно происходить вглубь кристалла преимущественно вдоль направлений $\langle 100 \rangle$, что соответствует экспериментальным наблюдениям. Дальнейшее взаимодействие образовавшихся группировок с раствором электролита завершается образованием конечных продуктов полного окисления кремния и выделением водорода:



При этом параллельно протекающий процесс диспропорционирования полимерного продукта ведет к образованию мелкодисперсной фазы кремния, частично сохраняющейся на поверхности стенок пор:



С наличием этой мелкодисперсной фазы можно связать наблюдающуюся фотолюминесценцию пористых слоев кремния. Не исключено также, что структура микропористого кремния, образуемого при повышенных напряжениях на поверхности слабо легированных кристаллов, формируется главным образом кластерами, возникающими при диспропорционировании первичных полимерных продуктов кооперативной реакции нуклеофильного замещения.

С зарождением пор и началом протекания через них ионного тока потенциал поверхности кристалла падает, и области, незадействованные в реакции, оказываются шунтированными токовыми каналами пор. Переходя в объем кристалла, поры начинают ветвиться, сближаясь до тех пор, пока толщина разделяющих их перегородок не достигнет удвоенной толщины слоя объемного заряда в полупроводнике и эти перегородки перестанут быть токопроводящими (очевидно, что минимальные размеры перегородок могут быть достигнуты в материале с максимальным уровнем легирования) [20]. После этого формируется стационарный фронт продвижения массива пор, который может распространяться вглубь кристалла на сотни микрон.

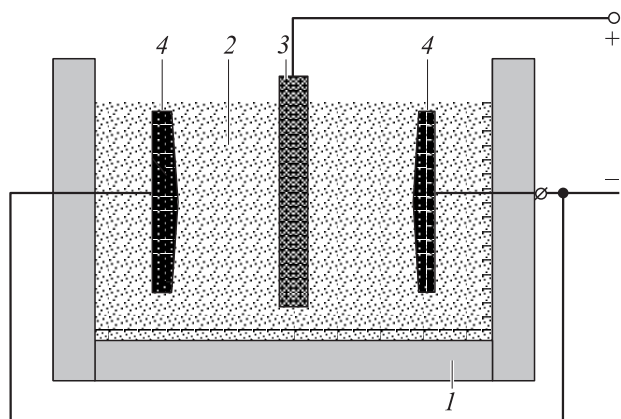


Рис. 1. Схема электрохимической ячейки для двухстороннего травления кремния: 1 — фторопластовый стакан, 2 — раствор HF-содержащего электролита, 3 — кремниевая пластина, 4 — платиновые электроды.

2.2. Методика изготовления и свойства пористого кремния

Несмотря на сложность электрохимических процессов, приводящих к появлению пор, метод получения пористого кремния в техническом отношении достаточно прост. Схема простейшей установки (электролизера) для анодирования кремния в электролитах на основе плавиковой кислоты приведена на рис. 1.

Основные характеристики пористого материала, образующегося при электрохимическом травлении монокристаллического кремния (поперечные размеры каналов пор, толщины разделяющих их перегородок, и соответственно степень пористости), определяются прежде всего типом проводимости и уровнем легирования исходного кремния, составом электролита и величиной анодного смещения (плотностью анодного тока). В меньшей степени эти параметры зависят от кристаллографической ориентации поверхности исходных пластин, которая, однако, в силу анизотропного характера распространения пор влияет на микроструктуру образующегося пористого слоя [21].

В условиях образования макро- и мезопористого кремния преимущественными направлениями распространения пор в кристаллах являются кристаллографические направления семейства $\langle 100 \rangle$, поэтому пористые слои, полученные на пластинах с ориентацией (100), обладают наиболее упорядоченной структурой, сформированной слабоветвящимися порами, прорастающими вдоль нормали к поверхности (на рис. 2 и 3 приведены изображения сколов пористых слоев, полученные в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ)). На рис. 4 и 5 показаны зависимости от плотности анодного тока степени пористости полученных слоев и скорости распространения фронта порообразования (скорости травления) в пластинах p^+ -Si (100) с удельным сопротивлением $0.005 \Omega \text{cm}$.

Для использования в качестве биосовместимых контейнерных материалов для лекарственных препаратов наиболее приемлем мезопористый кремний с поперечным размером каналов пор от 5 до 25 nm и с достаточно высокой степенью пористости ($> 50\%$). Такой размер пор позволяет вместить крупные органические молекулы, а большая удельная поверхность и возможность придания материалу как гидрофобных, так и гидрофильных свойств обеспечивают ему высокую адсорбционную емкость и способность к селективной адсорбции. Так, например, при пористости 70–75% и толщинах стенок пор 3–10 nm удельная поверхность полученного материала составляет 200–250 m^2/g , а адсорбционная емкость, определявшаяся по метиленовому синему, заметно превышает адсорбционную емкость активированных углей (310 mg/g по сравнению с 230 mg/g).

Важно отметить, что, несмотря на фрагментарное сохранение в пористых кристаллах дальнего порядка,

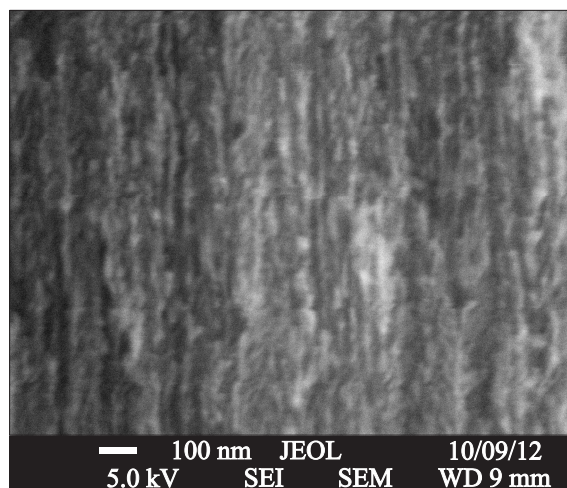


Рис. 2. СЭМ-изображение скола слоя пористого кремния, полученного на пластине, ориентированной в плоскости (100).

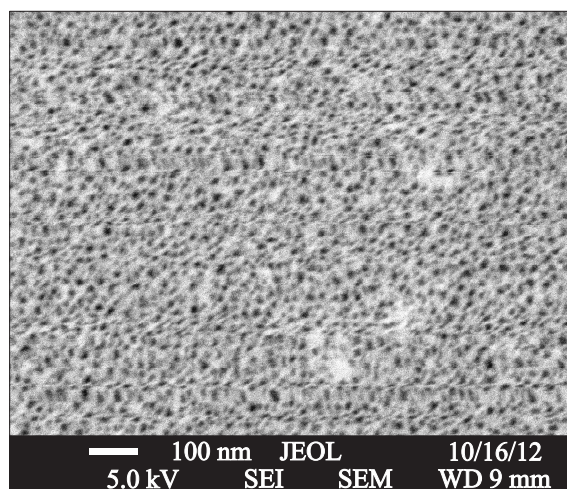


Рис. 3. СЭМ-изображение поверхности слоя пористого кремния.

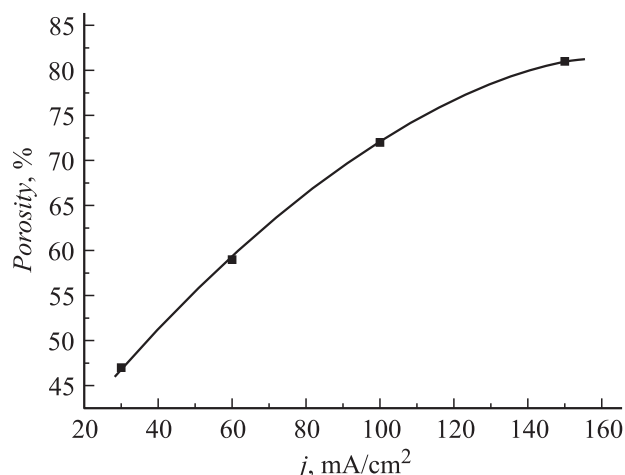


Рис. 4. Зависимость степени пористости полученных слоев от плотности анодного тока j .

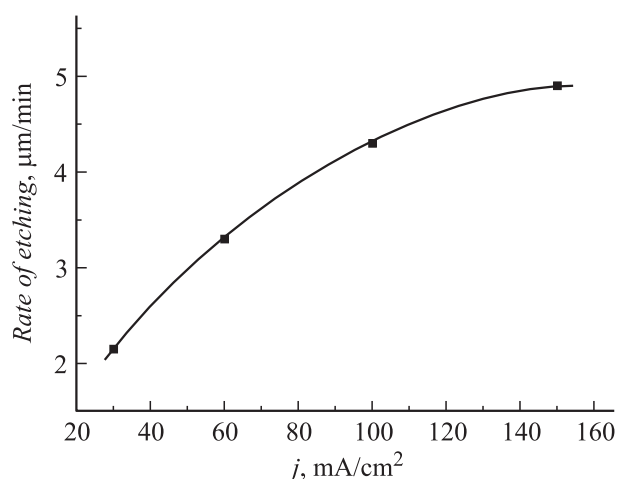


Рис. 5. Зависимость скорости травления от плотности анодного тока j .

присущего исходным монокристаллам, физические и химические свойства кремния претерпевают значительные изменения. Наряду с квантово-размерными эффектами это в значительной мере обусловлено деформациями химических связей, распространяющимися от близко расположенных друг к другу поверхностей на весь объем скелетной структуры. Иными словами, вклад свободной поверхностной энергии в свободную энергию пористого кремния в целом оказывается достаточно велик, чтобы заметно повысить его химический потенциал. В результате резко возрастает химическая активность пористого Si в окислительно-восстановительных реакциях [22]. В отличие от объемного кремния пористый кремний подвергается гидролизу при комнатных температурах уже в слабощелочных (pH ~ 7.5) средах, что делает возможной его биodeградацию в живых организмах.

Многообещающим свойством нанокристаллического кремния является его способность фотосенсибилизировать

переход молекулярного кислорода в активное синглетное состояние. Такой переход оказывается возможным в результате обмена электронами с противоположными спинами между экситонными состояниями в наноструктурированном кремнии с энергиями ~ 1.63 eV и молекулами адсорбированного кислорода [23]. Важно, что кислород, растворенный в биологических жидкостях, легко сорбируется поверхностью пористого кремния. Это позволяет создавать вблизи введенных в организм пористых частиц терапевтически значимые концентрации синглетного кислорода.

3. Биологические применения пористого кремния

Начиная с 1990-х г. неуклонно растет число опубликованных научных работ, посвященных изучению пористого Si [24]. Это связано с целым рядом событий. Во-первых, в 1990 г. Л. Кэнхэмом была показана способность пористого Si к фотолюминесценции в видимой области спектра [25]. Во-вторых, в 1995 г. было продемонстрировано, что при достаточно высокой степени пористости наноструктурированный кремний может быть переведен в биоактивное состояние [26]. Кроме того, была выявлена способность пористого Si к биodeградации в физиологическом окружении со скоростью растворения, зависящей от кислотности раствора, морфологии и пористости частиц, а также от химической природы их исходной поверхности [27]. Эти важные свойства легли в основу использования пористого Si для диагностики и лечения широкого спектра заболеваний.

3.1. Наноструктурированные контейнеры

Пористые Si-структуры пригодны для загрузки, хранения, транспортировки и эффективного высвобождения заключенных в них лекарственных веществ [28,29]. При этом возникает целый ряд преимуществ перед другими способами доставки. В частности, введение лекарства на наноструктурированном носителе вблизи целевого органа позволяет значительно снизить концентрацию препарата в других тканях при сохранении эффективной концентрации в пораженной области, что позволяет уменьшить побочные эффекты.

Попадая в организм, лекарственный контейнер встречается с рядом биологических, химических и физических барьеров, таких как, например, разрушающее действие ферментов, атака иммунной системы и клеточные мембраны [30]. В связи с этим наноконтейнер должен обладать прочностью, биосовместимостью и биодоступностью. Размер пор, морфологию и химию поверхности можно менять в процессе получения пористого Si и его последующей обработки. Изменяя размер пор и химию поверхности, можно обеспечить требуемые сорбционные характеристики для конкретного лекарства [31].

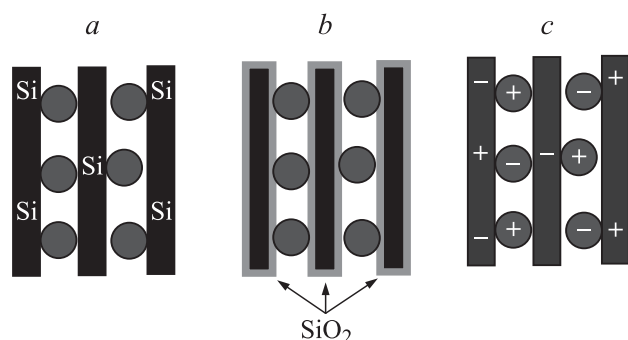


Рис. 6. Способы загрузки лекарств в кремниевый контейнер: *a* — ковалентное связывание, *b* — окисление, *c* — электростатические взаимодействия.

Можно также менять размер и форму самих частиц. Пористый кремний может быть изготовлен в виде пленки, микроголок, чипа и др. [32]. Кремниевая матрица может быть как однослойной, так и двухслойной [33].

Введение лекарства в поры кремниевого контейнера, т.е. его загрузка, может осуществляться различными способами, наиболее предпочтительным из которых является пропитка основы растворами лекарственных препаратов или же их адсорбция из растворов путем длительного выдерживания пористого Si в растворе, содержащем лекарство [34]. Эффективность лекарственной загрузки зависит от степени пористости частицы [35]. Лекарство может быть иммобилизовано в кремниевом контейнере тремя способами: путем ковалентного связывания, окисления и электростатических взаимодействий (рис. 6) [36]. Пористые кремниевые структуры являются легкодоступными для загрузки как гидрофильных, так и гидрофобных молекул [37].

Кинетика высвобождения лекарства контролируется изменением химических свойств пористой кремниевой матрицы [38]. Меняя свойства поверхности пористого Si, можно осуществлять контролируемое высвобождение лекарства, продлевая срок эффективного его использования до недель, месяцев и даже лет.

В англоязычной литературе пористые контейнеры принято обозначать как S1MPs (stage 1 mesoporous particles), а загружаемые в них вещества — S2NPs (stage 2 nanoparticles) [39]. Пористые контейнеры с большим размером пор обозначают LP (large-pore), контейнеры с малым размером пор — SP (small-pore).

3.2. Биодоступность, биоустойчивость и биодegradация

Попадая в кровяное русло, пористому контейнеру необходимо пересечь стенки кровеносных сосудов и высвободить лекарство в очаге заболевания. Для этого необходимо преодолеть эндотелиальный барьер, т.е. барьер, образуемый клетками эндотелия. Для оценки влияния пористых Si-частиц на эндотелиальные клетки сосудов в лаборатории М. Феррари провели серию

экспериментов [40–42], в которых использовали эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVECs), поглощающие пористые Si-частицы S1MPs. Клетки инкубировали с S1MPs размером 1.6 или 3.2 μm в течение 15 min при 37°C. Было показано, что процесс поглощения S1MPs зависит от присутствия цитохалазина В [41]. Методом конфокальной флуоресцентной микроскопии продемонстрировали, что через 60 min после введения S1MPs элементы цитоскелета клеток HUVECs, окрашенные красителем AlexFluor 555 с фаллоидином, сохраняли свою целостность. S1MPs располагались в перинуклеарной области клетки, определяя направленное движение эндосом вдоль микротрубочек. Это свидетельствует о том, что перемещение фагосом, содержащих S1MPs, вдоль микротрубочек не отличается от такового для незагруженных пористым Si эндосомальных везикул.

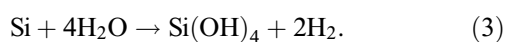
Анализ морфологии клеток HUVECs через 6 h после поглощения S1MPs, осуществленный методом просвечивающей электронной микроскопии, показал целостность как самой клетки, так и сложной внутриклеточной структуры. Ядро и органеллы не отличались от таковых в контрольных эндотелиальных клетках. Поскольку токсичность S1MPs может быть связана с зарядом их поверхности, размером, формой и химическим составом, исследователи сравнивали клеточную морфологию и внутриклеточное расположение двух размеров S1MPs с положительным и отрицательным зарядами поверхности. Выяснилось, что изменение заряда поверхности S1MPs не влияло на структуру органелл.

Для исследования влияния S1MPs на характерные для клетки события использовали также эндотелиальные клетки капилляров человека (HMVEC), находящиеся в состоянии митоза [41,42]. Перед митозом эндотелиальные клетки содержали 30 S1MPs. В ходе митоза каждая дочерняя клетка получила равное количество S1MPs (15 на клетку). Показано, что процесс митоза был высоко упорядоченным и не отличался от такового в отсутствие S1MPs. Продолжающееся деление эндотелиальных клеток контролировали в течение 72 h, используя анализ по оценке жизнеспособности клеток с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом (MTT), основанный на определении активности дегидрогеназы митохондрий. HUVECs инкубировали с S1MPs в соотношении 5 и 10 S1MPs на клетку. При этом S1MPs служили в качестве контейнера для S2NPs, содержащих золото или оксиды железа. S2NPs ковалентно связывались с S1MPs. Клетки, не содержащие S2NPs, выступали в качестве контроля. Показано, что присутствие загруженных или незагруженных S1MPs не влияло на деление клеток. Изображения, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии, показывали S1MPs (содержащие золото-S2NP), прикрепленные к клетке (через 15 min после введения кремниевых частиц в раствор).

Помимо прочности, биосовместимости и биодоступности наноконтейнер должен обладать способностью к биодegradации. Биодegradацией материалов называется

способность частично или полностью растворяться или химически преобразовываться, не оказывая токсического действия на клетки и ткани, с последующим выведением из организма. Противоположным биодegradации свойством является биоустойчивость, которая характеризует способность биоматериала противостоять в течение необходимого промежутка времени комплексному воздействию окружающей среды и тканей, сохраняя при этом свои исходные физико-химические, механические и биологические, а также функциональные свойства.

Анализ данных мировой литературы подтверждает наличие у пористого Si способности как к биодegradации [43], так и биоустойчивости [44]. Это связано с тем, что пористый Si способен преобразовываться в ортокремниевую кислоту, обычно содержащуюся в пище и поэтому подверженную метаболизму



Ортокремниевая кислота затем проходит через почечные канальцы и выводится с мочой.

Группой американских ученых было показано, что люминисцентные Si пористые наночастицы (LPSiNPs) способны к саморазрушению в почках за относительно короткий период времени с образованием нетоксичной ортокремниевой кислоты [45]. Способность к биодegradации оценивали по изменению интенсивности фотолюминисценции LPSiNPs. Помещенные в биологический раствор (фосфатно-солевой буфер (PBS), pH = 7.4, 37°C), Si частицы достаточно быстро теряли свою люминисценцию и саморазрушались.

Также было показано, что LPSiNPs могут выступать в качестве переносчиков противораковых препаратов, таких как доксорубин (DOX) [46]. При физиологических значениях pH происходит достаточно медленное высвобождение DOX. Поскольку незагруженные Si частицы разрушаются быстро, а загруженные DOX — медленно, было высказано предположение, что присутствие DOX подавляет процесс дegradации LPSiNPs, снижая уровень гидролиза SiO₂ на поверхности LPSiNPs. DOX–LPSiNPs имели равную или немного большую цитотоксичность относительно свободного DOX, в то время как LPSiNPs не показывали какой-либо заметной токсичности. Это было объяснено тем, что высвобождение кремниевой кислоты из LPSiNPs увеличивает цитотоксичность DOX, способствуя локальному уменьшению внеклеточного или внутриклеточного уровня pH.

In vitro исследования, проведенные на клетках линии HeLa, показали отсутствие токсичности LPSiNPs.

Следующим шагом было изучение поведения LPSiNPs *in vivo*. LPSiNPs (20 mg/kg) вводили внутривенно мышам и наблюдали накопление частиц в таких органах таких как печень, селезенка, почки и др. Стоит отметить, что через неделю количество LPSiNPs в органах значительно сократилось, а через 4 недели LPSiNPs практически отсутствовали. Механизм выведения LPSiNPs связан с образованием растворимых кремниевых кислот и их

последующим выведением из организма. За 4 недели наблюдали незначительное увеличение веса мышей, которым инъецировали LPSiNPs, по сравнению с контрольными. Этот факт также свидетельствует в пользу отсутствия токсического действия LPSiNPs на организм.

Поскольку разрушение LPSiNPs может оказывать негативное влияние на органы, связанные с выведением Si частиц из организма, была исследована токсичность LPSiNPs для тканей почек, печени и селезенки мышей через 1 и 7 d после введения LPSiNPs [47]. Гистологически не наблюдали каких-либо последствий проявления токсичности в этих органах относительно контроля, гепатоциты в образцах печени не имели каких-либо изменений, однако синусы печени выглядели вздутыми через 1 d после введения. Нормальную морфологию клеток наблюдали через 4 недели после введения. Исследователи предположили, что это было связано с биодegradацией LPSiNPs предположительно с участием лизосом. В образцах селезенки не наблюдали какого-либо изменения в морфологии лимфоидных фолликулов или в размере красной пульпы после введения LPSiNPs. В почках также не было заметных изменений.

3.3. Токсичность

Эксперименты, проводимые как *in vitro*, так и *in vivo*, свидетельствуют о наличии минимальной токсичности пористого Si [48] или о полном ее отсутствии [49]. Наиболее исчерпывающий анализ токсичности пористого Si был выполнен группой финских ученых на клетках Caco-2 [50]. В экспериментах использовали три разновидности мезопористых Si частиц — TCPSi, THCPSi и TOPSi, отличающиеся друг от друга химическим составом поверхности: термически карбонизированные TCPSi (Si–C_x), термически гидрокарбонизированные THCPSi (Si–C–H_x) и термически окисленные TOPSi (Si–O_x). Каждая разновидность частиц имела 5 размеров: 1.2, 25, 38, 53 и 74 μm.

Метаболическую активность жизнеспособных клеток оценивали по способности вырабатывать АТФ в присутствии TCPSi, THCPSi и TOPSi с помощью люминисцентного анализа. THCPSi всех размеров в концентрациях 2 и 4 mg/ml вызывали значительное уменьшение содержания АТФ в клетках Caco-2 после 3 h инкубации. Содержание АТФ было высокими (79–100%) в клетках, инкубированных с THCPSi размером 25–38, 38–53 и 53–75 μm в концентрациях 0.1 и 1 mg/ml. Фракция TCPSi самого маленького размера значительно уменьшала содержание АТФ в Caco-2 клетках уже при концентрациях 1 mg/ml и выше. Для фракций TCPSi размером 25–38 μm при концентрациях 4 mg/ml наблюдали значительное уменьшение содержания АТФ в клетках, в то время как для больших фракций (38–53 и 53–75 μm) наблюдали увеличение. Для этих размеров фракций при всех исследуемых концентрациях TCPSi наблюдали большое количество метаболически активных клеток (80%). Для клеток, обработанных TOPSi,

также наблюдали большое количество метаболически активных клеток после 3 h инкубации. Для исследуемых концентраций TOPSi не наблюдали зависимости эффекта от размера частиц, за исключением TOPSi малых размеров при концентрациях свыше 1 mg/ml. Даже при высоких концентрациях частиц TOPSi содержание АТФ в клетках было значительно больше (78%) по сравнению с THCPSi частицами. Также было исследовано содержание АТФ в Caco-2 клетках после 11 h инкубации. При этом значительное уменьшение содержания АТФ в клетках наблюдали при инкубировании с частицами всех размеров в концентрациях более 1 mg/ml, а также для малых размеров частиц при концентрации 1 mg/ml.

Для оценки продолжительности и пути клеточной гибели анализировали апоптотически-некротический ответ Caco-2 клеток, обработанных Si микрочастицами в течение 3 и 24 h, используя PI окрашивание и метод проточной цитометрии [51]. Рассчитали количество клеток, подвергшихся апоптозу, через 24 h инкубирования с Si микрочастицами. При всех исследуемых концентрациях TOPSi количество некротических клеток было незначительным (< 11%), как и для TCPSi при низких концентрациях. Значительные количества некротических клеток (17–21%) обнаружили для THCPSi и TCPSi при концентрациях 1 mg/ml и выше. Наибольшее количество некротических клеток наблюдали для малых размеров фракций THCPSi и TCPSi в отличие от TOPSi. Значительное увеличение в количестве апоптотических клеток наблюдали при инкубации с TCPSi всех размеров в концентрациях 2 и 4 mg/ml и фракций размером 1.2–25 и 25–38 μm при концентрации 1 mg/ml. Подобную тенденцию наблюдали для THCPSi микрочастиц. Для TOPSi

значительное увеличение в количестве апоптотических клеток наблюдали при концентрациях 2 и 4 mg/ml для малых размеров фракций, но при других концентрациях и размерах фракций Si частиц не наблюдали особых отличий.

Уменьшение содержания АТФ в клетках может вызывать потерю митохондриального потенциала или вызывать индукцию антиокислительного механизма защиты. Поэтому было проведено исследование выработки активных форм кислорода в Caco-2 клетках, обработанных кремниевыми частицами. За исключением концентраций TCPSi, равных 2 и 4 mg/ml, и фракции размером 1.2–25 μm не наблюдали значительного увеличения в концентрации перекиси водорода или супероксида после 3 h инкубации. После 24 h значительное увеличение в образовании перекиси водорода наблюдали для всех TCPSi больших размеров при концентрациях 2 и 4 mg/ml. Частицы самого маленького размера вызвали более высокую выработку перекиси водорода, чем фракции других размеров. Для THCPSi и TOPSi не наблюдали значительного увеличения выработки перекиси водорода для фракций различных размеров и концентраций. В случае супероксида 3.3- и 6.5-кратное увеличение (по сравнению с контролем) наблюдали для TCPSi фракции размером 1.2–25 μm . Эти значения постепенно уменьшались с увеличением размера частиц и уменьшением концентраций. Однако эти значения были высокими по сравнению с таковыми для THCPSi и TOPSi таких же размеров и концентраций. В таблице приведены обобщенные результаты экспериментов.

3.4. Лечение онкологических заболеваний

В последнее время Si наночастицы все чаще стали применять для лечения онкологических заболеваний [52]. Так, в работе [23] было показано, что Si нанокристаллы могут выступать в качестве эффективных фотосенсибилизаторов активного кислорода. Данный вид возбужденного молекулярного кислорода отличается высокой химической активностью, что обуславливает его применение для фотодинамической терапии онкологических заболеваний.

В экспериментах, проведенных на раковых клетках линии 3T3 NIH (модифицированные фибробласты мыши), показано, что Si наночастицы способны уменьшать количество раковых клеток до 80% [53]. В ходе эксперимента исследуемые клетки подразделяли на три группы. К клеткам первой и второй групп добавляли водную суспензию, содержащую определенное количество Si частиц. К контрольным клеткам (третья группа) Si частицы не добавляли. Клетки первой и третьей групп облучали в течение 1 h светом ртутной лампы ДРШ250-2, излучение которой предварительно пропускалось через фильтр из дистиллированной воды для подавления тепловой составляющей спектра и стеклянный фильтр с полосой пропускания 350–600 nm. Интенсивность светового потока на образце составляла $\sim 1 \text{ mW/cm}^2$. Клетки второй

Обобщенные результаты экспериментов

Размер частиц, μm	Метод определения				
	люминесценция	проточная цитометрия		внутриклеточные свободные радикалы кислорода	
		содержание АТФ	апоптоз	некроз	H ₂ O ₂
THCPSi					
1.2–25	–/+	+	+	–	–/+
25–38	–/+	+	+	–	–/+
38–53	–	+	+	–	–
53–75	–	–/+	–/+	–	–
TCPSi					
1.2–25	++	+	+	++	++
25–38	++	+	+	+	++
38–53	–/+	+	+	+	+
53–75	–/+	+	+	+	+
TOPSi					
1.2–25	–	–/+	–/+	–	–/+
25–38	–	–	–	–	–/+
38–53	–	–	–	–	–
53–75	–	–	–	–	–

группы не облучали. После проведения эксперимента во всех группах клеток питательный раствор меняли на свежий, клетки культивировали в темноте на протяжении 20 h, после чего проводили измерение их количества и состава. На всех этапах облучения и культивирования клеток поддерживали температуру, равную 37°C, и фиксированный уровень кислотности среды $\text{pH} = 7.2$.

Анализ зависимости числа живых клеток фибробластов мышей первой и второй групп относительно контрольной группы от концентрации Si частиц показал, что после облучения при концентрации Si частиц в растворе $\sim 0.5 \text{ g/l}$ и выше имеет место значительное уменьшение числа живых клеток по сравнению с контрольной группой. При концентрации 2.5 g/l фиксировали гибель около 80% клеток. В то же время в темноте влияние Si частиц практически отсутствует во всем использованном диапазоне концентраций. Следовательно, можно сделать вывод о том, что подавление размножения раковых клеток вызвано воздействием активного кислорода, возникающего при фотовозбуждении Si частиц. Проведенный анализ показал, что после облучения в присутствии Si частиц с концентрацией более 0.1–0.5 g/l происходит гибель клеток по механизму апоптоза, а концентрационная зависимость числа выживших клеток близка к представленной. По-видимому, гибель раковых клеток связана с воздействием фотосенсибилизированного активного кислорода, в частности, с окислением клеточного содержимого синглетным кислородом. Кроме того, возможно влияние других активных форм кислорода, например, так называемого, супероксида (ионов O_2^-).

Исследования, проведенные на клеточных линиях аденокарциномы толстой кишки человека LoVo и HT29, показали возможность применения двуслойной Si матрицы для контролируемой доставки антиракового препарата DOX [54]. В ходе эксперимента DOX загружали в двуслойные Si матрицы в промежутке времени от 30 min до 24 h, и затем клетки культивировали в растворе, не содержащем Si, в течение 72 h при 37°C в увлажненном воздухе, содержащем 5% CO_2 . Исследования показали, что присутствие незагруженных Si матриц в клетках LoVo и HT29 в течение 7 d не влияет на клеточный рост в культуре по сравнению с контролем. Используя фазово-контрастную микроскопию, было показано, что клетки имеют сходную с контрольными морфологию. Кроме того, высвобождение DOX из Si матриц происходит контролируемым образом. Также исследовали цитотоксичность высвобождения DOX через 72 h после загрузки лекарства. При этом наблюдали существенное подавление деления раковых клеток, связанное с высвобождением DOX.

Другой интересный пример использования пористого Si описан для брахитерапии, которая основана на локализованной доставке радиоактивного изотопа (например, ^{125}I или ^{32}P) прямо к месту опухоли [55]. Радиоактивно-устойчивый Si в данном случае является идеальным переносчиком изотопов, снижающим их негативное воздействие на здоровые клетки. В последнее

время особую популярность приобретает использование ^{32}P изотопа [56]. В работе [57] показано, что пористый кремний, связанный с ^{32}P („BioSilicon“), способен подавлять рост гепатоцеллюлярных (HepG2) и панкреатических (2119) карцином человека, имплантированных в мышей (BALB/c). Гистологическое исследование показало отсутствие каких-либо признаков опухоли спустя 12 недель после имплантации как клеток 2119, так и HepG2. Клинические испытания „BioSilicon“, проведенные на человеке, также показали свою высокую эффективность для лечения онкологических заболеваний [58]. Использование „BioSilicon“ в клинических испытаниях приводило к уменьшению объема раковых опухолей печени на 60%.

Поскольку физико-химические свойства поверхности пористого Si поддаются почти любым преобразованиям, Si частицы можно использовать в качестве сенсоров для обнаружения небольших по размеру опухолей, а также для визуализации не удаленных в процессе хирургической операции остатков опухолевой ткани [59]. Для этих целей в работе [60] использовали люминисцентные кремниевые пористые наночастицы (LPSiNPs). Показано, что введение декстрана, соединенного с LPSiNPs (D-LPSiNPs), мышам с перевиваемой опухолью MDA-MB-435 приводит к пассивному накоплению пористого Si в опухоли. *In vivo* изображения флуоресценции и гистология подтверждают присутствие D-LPSiNPs в опухоли. Следовательно, по флуоресценции LPSiNPs можно определить даже самые небольшие по размеру опухоли или не удаленные хирургом опухолевые ткани.

3.5. Сенсорные свойства пористого кремния

Модифицированные Si частицы можно использовать в качестве биосенсоров для детекции белков, антигенов или молекул нуклеиновых кислот [61] (рис. 7). Поскольку пористый Si имеет большую площадь поверхности, возможна модификация частиц большим числом сенсорных молекул.

В работе [62] показан пример использования пористого Si для обнаружения вирусов MS2. Была показана возможность детекции вирусов MS2 в растворе с использованием модифицированных анти-MS2 антителами кролика частиц пористого Si. Для этого использовали вирусные частицы, флуоресцентно окрашенные красителем Alexa 532. Было показано, что пористый Si, связанный с анти-MS2 антителами, значительно более эффективно

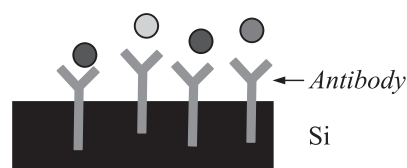


Рис. 7. Использование кремниевых частиц в качестве биосенсоров для детекции антигенов.

сорбирует вирусы, чем не модифицированные частицы Si. Для определения чувствительности пористого Si, связанного с антителами, к MS2 исследовали различные концентрации вируса (от $1 \cdot 10^6$ до $2 \cdot 10^6$ PFU/ml). Найдена зависимость интенсивности флуоресценции частиц как функция от концентрации вируса.

Кроме того, кремниевые частицы можно использовать для поиска отдельных лекарственных молекул (лекарственный скрининг) и использовать для диагностики различных заболеваний [63].

3.6. Ортопедия и тканевая инженерия

Недавно было показано, что Si частицы могут быть использованы в тканевой инженерии и ортопедии для восстановления элементов соединительной ткани [64]. В частности, показано, что пористый Si стимулирует рост остеобластов, влияя на фазу минерализации костей. Обычно пористый Si используется в составе композитного материала — в комплексе с каким-либо биосовместимым полимером. В качестве таких полимеров могут использоваться полилактид, полидиметилсилоксан, полиэтилен или поликапролактон [65]. Комбинирование пористого Si с биосовместимыми полимерами имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием компонентов по-отдельности. Показано, что соединение пористого Si с поликапролактоном (PCL) увеличивает прочность материала [66]. Кроме того, Si-PCL композиты легко проницаемы для воды, что способствует естественной биодеградации Si. Показано, что скорость разрушения Si линейно зависит от его процентного содержания в композите и от размера самого композита [67].

В лаборатории М. Феррари активно ведется разработка композитов, состоящих из пористого Si и полипропилен фумарата (PPF) [68]. Исследователи полагают, что использование такого материала позволит пациентам передвигаться спустя несколько дней после введения композита. В данном случае пористый Si выполняет двойную функцию: переносит ростовые факторы, способствующие росту кости, и встраивается в костную ткань, обеспечивая быстрое ее восстановление.

Кроме ростовых факторов Si также может переносить бисфосфанаты и другие стабилизаторы кости, анальгетики, противовоспалительные агенты (для снятия болевых ощущений после операции) и антибиотики [69].

3.7. Офтальмология

Обычно при лечении глазных заболеваний медики сталкиваются с проблемой доставки лекарства необходимой концентрации к очагу заболевания. При обычном лечении глазных заболеваний требуются множественные инъекции, несущие риск инфекционного заражения [70]. Хирургические имплантации тоже не всегда являются эффективными. В таких случаях оказывается

весьма полезным использование пористого Si, обладающего способностью к фотолюминесценции в видимой области спектра [71]. Так, в работе [72] описана успешная имплантация пористого Si, содержащего лекарство, в радужную оболочку глаза. В течение продолжительного периода времени исследователи наблюдали процесс уменьшения концентрации препарата в радужной оболочке, используя оптические свойства пористого Si. Кроме того, было показано, что имплантированный Si не проявлял какой-либо цитотоксичности в течение более 4 месяцев.

3.8. Лечение диабета

Пористый Si может быть также использован для лечения диабета. Описаны различные стратегии: направленная доставка инсулина, синтезированного панкреатическими клетками [73], векторное перемещение инсулиноподобных лигандов, в том числе и белков [74], а также имплантация биокапсул, содержащих островки Лангерганса. В работе [75] авторы, подбирая необходимый размер пор, смогли сконструировать контейнер с иммуноизолирующими свойствами. Поры такого контейнера выполняют роль барьеров, проницаемых для инсулина, глюкозы и других метаболически активных продуктов, но непроницаемых для цитотоксических клеток, макрофагов и антител. Показано, что секреция инсулина островковыми клетками, инкапсулированными в пористый Si, происходит так же, как и в неинкапсулированных островковых клетках (для $3 \mu\text{m}$ и 78nm размеров пор) [76]. Эксперименты по изучению высвобождения инсулина в ответ на стимулирование 16.7mM раствором глюкозы в течение 1 h при инкубировании с Si, содержащим 78-, 66- или 18-нм поры, показали отсутствие какого-либо диффузионного барьера для транспорта глюкозы или инсулина через пористый контейнер [77].

Заключение

Относительно простая технология получения, большая площадь поверхности и настраиваемый диаметр пор мезопористого Si делают весьма привлекательным его использование для направленной доставки лекарств. Заключенное в Si контейнер лекарство избегает физико-химических воздействий и высвобождается контролируемым образом. Пористые контейнеры могут быть использованы для загрузки как гидрофильных, так и гидрофобных молекул. Кинетика высвобождения лекарств контролируется изменением физико-химических свойств контейнера. Изменяя свойства поверхности контейнера, можно осуществлять контролируемое высвобождение лекарства, продлевая срок эффективного его использования до недель, месяцев и лет. Необычные оптические и электрические свойства Si позволяют использовать его в качестве сенсора для диагностики и лечения заболеваний, а также для лекарственного скрининга.

Прочность и биосовместимость материала способствуют широкому применению Si в ортопедии и тканевой инженерии. Использование наноматериалов связано с огромным риском вследствие высокой токсичности либо самих наночастиц (которые способны хорошо проникать в ткани, но с трудом подвергаются метаболизму), либо токсичности элементов, входящих в их состав. В отличие от других наноструктурированных материалов, для пористого Si показано практически полное отсутствие токсичности, а также наличие способности к биодegradации. Все это открывает перспективы к использованию пористого Si в терапии и диагностике различных заболеваний.

Список литературы

- [1] Hughes G.A. // *Nanomed-Nanotechnol.* 2005. Vol. 1. P. 22–30.
- [2] Tao S.L., Desai T.A. // *DDT.* Vol. 10. N 13. P. 909–915.
- [3] Evans W.E., McLeod H.L. // *N. Engl. J. Med.* 2003. Vol. 348. P. 538–549.
- [4] Sripanyakorn S., Jugdaohsingh R., Thompson R.P.H., Powell J.J. // *Nutrition Bull.* 2005. Vol. 30. P. 222–230.
- [5] Parkilla T., Hakala M., Kautiainen H., Leppilahti J., Belt E.A. // *Scand. J. Plast. Recons.* 2006. Vol. 40. N 5. P. 297–301.
- [6] Uhler A. // *Bell Syst. Tech.* 1956. Vol. 35. P. 333–336.
- [7] Zhang X.G. // *J. Electrochem. Soc.* 2004. Vol. 151. P. C69–C80.
- [8] Foll H., Leisner M., Cojocar A., Carstensen J. // *Materials.* 2010. Vol. 3. P. 3006–3076.
- [9] Zhang X.G. // *Electrochemistry of Silicon and Its Oxide.* N. Y.: Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer academic publishers, 2001. 537 p.
- [10] Lehmann V., Gosele U. // *Adv. Mater.* 1992. Vol. 4. P. 114–116.
- [11] Bisi O., Ossicini S., Pavesi L. // *Surf. Sci. Rep.* 2000. Vol. 38. P. 1–126.
- [12] Lehmann V. // *Electrochemistry of Silicon.* Weinheim: Wiley-VCH, 2003. 283 p.
- [13] Theunissen M.J.J. // *J. Electrochem. Soc.* 1972. Vol. 119. P. 351–360.
- [14] Beale M.I.J., Benjamin J.D., Uren M.J., Chew N.G., Cullis A.G. // *J. Cryst. Growth.* 1985. Vol. 73. P. 622–636.
- [15] Memming R., Schwandt G. // *Surf. Sci.* 1966. Vol. 4. P. 109–124.
- [16] Lehmann V., Gosele U. // *Appl. Phys. Lett.* 1991. Vol. 58. P. 856–858.
- [17] Carstensen J., Christophersen M., Foll H. // *Mater. Sci. Eng.* 2000. Vol. 23. P. B69–B70.
- [18] Улин В.П., Конников С.Г. // *ФТП.* 2007. Т. 41. Вып. 7. С. 854–866.
- [19] Улин В.П., Конников С.Г. // *ФТП.* 2007. Т. 41. Вып. 7. С. 867–877.
- [20] Bobyl A., Konnikov S., Sakseev D., Soldatenkov F., Tereshchenko G., Ulin V. // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2007. Vol. 46. P. 2263–2267.
- [21] Astrova E.V., Ulin V.P., Zharova Y.A., Shul'pina I.L., Nashchekin A.V. // *J. Electrochem. Soc.* 2012. Vol. 159. P. D172–D180.
- [22] Clément D., Diener J., Gross E., Künzner N., Timoshenko V.Yu., Kovalev D. // *Phys. Stat. Solidi A.* 2005. Vol. 202. N 8. P. 1357–1364.
- [23] Тимошенко В.Ю., Кудрявцев А.А., Осминкин Л.А., Воронцов А.С., Рябчиков Ю.В., Белогорохов И.А., Ковалев Д., Каукаров П.К. // *Письма в ЖЭТФ.* 2006. Т. 83. Вып. 9. С. 492–495.
- [24] Salonen J., Lehto V. // *Chem. Eng. J.* 2008. Vol. 137. P. 167–172.
- [25] Canham L.T. // *Appl. Phys. Lett.* 1990. Vol. 57. P. 1046–1048.
- [26] Angelescu A., Kleps I., Mihaela M., Simion M., Neghina T., Petrescu S., Moldovan N., Padurar C., Raducanu A. // *Rev. Adv. Mater. Sci.* 2003. Vol. 5. P. 440–449.
- [27] Salonen J., Kaukonen A.M., Hirvonen J., Lehto V. // *J. Pharm. Sci.* 2008. Vol. 97. N 2. P. 632–653.
- [28] Vivero-Escoto J.L., Slowing I.I., Trewyn B.G., Lin V.S. // *Small.* 2010. Vol. 6. N 18. P. 1952–1967.
- [29] Haidary S.M., Corcoles E.P., Ali N.K. // *J. of Nanomat.* 2012. Vol. 2012. P. 1–15.
- [30] Sanhai W.R., Sakamoto J.H., Canady R., Ferrari M. // *Nat. Nanotechnol.* 2008. Vol. 3. P. 242–244.
- [31] Hernández M., Recio G., Sevilla P., Torres-Costa V., García-Ramos J.V., Domingo C., Martín-Palma R.J. // *Nanostruct. Thin Films.* 2012. Vol. 8465. P. 1–5.
- [32] Tao S.L., Desai T.A. // *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2003. Vol. 55. P. 315–328.
- [33] Shang Y., Zhao W., Xu E., Tong C., Wu J. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. Vol. 25. P. 1056–1063.
- [34] Prestidge C.A., Barnes T.J., Lau C., Barnett C., Loni A., Canham L. // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2007. Vol. 4. N 2. P. 101–110.
- [35] Jarvis K.L., Barnes T.J., Prestidge C.A. // *Adv. Colloid Interfac.* 2012. Vol. 175. P. 25–38.
- [36] Anglin E.J., Cheng L., Freeman W.R., Sailor M.J. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008. Vol. 60. P. 1266–1277.
- [37] Bimbo L.M., Makila E., Laaksonen T., Lehto V., Salonen J., Hirvonen J., Santos H.A. // *Biomater.* 2011. Vol. 32. P. 2625–2633.
- [38] Stewart M.P., Buriak J.M. // *Adv. Mater.* 2000. Vol. 12. N 12. P. 859–869.
- [39] Tasciotti E., Liu X., Bhavane R., Plant K., Leonard A.D., Price B.K., Cheng M.M., Decuzzi P., Tour J.M., Robertson F., Ferrari M. // *Nat. Nanotechnol.* 2008. Vol. 3. P. 151–157.
- [40] Serda R.E., Gu J., Bhavane R.C., Liu X., Chiappini, Decuzzi P., Ferrari M. // *Biomaterials.* 2009. Vol. 30. P. 2440–2448.
- [41] Serda R.E., Ferrati S., Godin B., Tasciotti E., Liua X., Ferrari M. // *Nanoscale.* 2009. Vol. 1. P. 250–259.
- [42] Serda R.E., Gu J., Burks J.K., Ferrari K., Ferrari C., Ferrari M. // *Cytom. Part A.* 2009. Vol. 75. P. 752–760.
- [43] Chiappini C., Liu X., Fakhoury J.R., Ferrari M. // *Adv. Funct. Mater.* 2010. Vol. 20. P. 2231–2239.
- [44] Alvarez S.D., Derfus A.M., Schwartz M.P., Bhatia S.N., Sailor M.J. // *Biomaterials.* 2009. Vol. 30. P. 26–34.
- [45] Gu L., Ruff L.E., Qin Z., Corr M., Hedrick S.M., Sailor M.J. // *Adv. Mater.* 2012. Vol. 24. P. 3981–3987.
- [46] Park J., Gu L., Maltzahn G., Ruoslahti E., Bhatia S.N., Sailor M.J. // *Nat. Mater.* 2009. Vol. 8. P. 331–336.
- [47] Gu L. // *ProQuest Dissertations and Theses.* 2012. Vol. 191. P. 1–191.

- [48] *Kilpeläinen M., Riikonen J., Vlasova M.A., Huotari A., Lehto V.P., Salonen J., Herzig K.H., Järvinen K.* // *J. Control. Release.* 2009. Vol. 137. P. 166–170.
- [49] *Low S.P., Williams K.A., Canham L.T., Voelcker N.H.* // *Biomaterials.* 2006. Vol. 27. P. 4538–4546.
- [50] *Laaksonen T., Santos H., Vihola H., Salonen J., Riikonen J., Heikkilä T., Peltonen L., Kumar N., Murzin D.Y., Lehto V., Hirvonen J.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2007. Vol. 20. P. 1913–1918.
- [51] *Santos H.A., Riikonen J., Salonen J., Makila E., Heikkilä T., Laaksonen T., Peltonen L., Lehto V., Hirvonen J.* // *Acta Biomater.* 2010. Vol. 6. P. 2721–2731.
- [52] *Arruebo M.* // *WIRES Nanomed. Nanobiotech.* 2012. Vol. 4. P. 16–30.
- [53] *Xiao L., Gu L., Howell S.B., Sailor M.J.* // *ACS Nano.* 2011. Vol. 5. N 5. P. 3651–3659.
- [54] *Vaccari L., Canton D., Zaffaroni N., Villa R., Tormen M., Fabrizio E.* // *Microelectron. Eng.* 2006. Vol. 83. P. 1598–1601.
- [55] *Li F.L., Xu J.Y., Xia X.H.* // *Int. J. Cardiol.* 2012. Vol. 158. P. 473–474.
- [56] *Low S.P., Williams K.A., Canham L.T., Voelcker N.H.* // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2010. Vol. 93. P. 1124–1131.
- [57] *Zhang K., Loong S.L.E., Connor S., Yu S.W.K., Tan S., Ng R.T.H., Lee K.M., Canham L., Chow P.K.H.* // *Clin. Cancer Res.* 2005. Vol. 11. P. 7532–7537.
- [58] *Goh A.S., Chung A.Y., Lo R.H., Lau T., Yu S.W., Chng M., Satchithanatham S., Loong S.L., Ng D.C., Lim B., Connor S., Chow P.K.* // *Int. J. Radiat. Oncol.* 2007. Vol. 67. P. 786–792.
- [59] *Sailor M.J., Wu E.C.* // *Adv. Funct. Mater.* 2009. Vol. 19. P. 3195–3208.
- [60] *Fan J., Chu P.K.* // *Small.* 2010. Vol. 6. N 19. P. 2080–2098.
- [61] *Jane A., Dronov R., Hodges A., Voelcker N.H.* // *Trends Biotechnol.* 2009. Vol. 27. N 4. P. 230–239.
- [62] *Rossi A.M., Wang L., Reipa V., Murphy T.E.* // *Biosens. Bioelectron.* 2007. Vol. 23. P. 741–745.
- [63] *Tanaka T., Godin B., Bhavane R., Nieves-Alicea R., Gu J., Liu X., Chiappini C., Fakhoury J.R., Amra S., Ewing A., Li Q., Fidler I.J., Ferrari M.* // *Int. J. of Pharm.* 2010. Vol. 402. P. 190–197.
- [64] *Kumar D.S., Banji D., Madhavi B., Bodanapu V., Dondapati S., Sri A.P.* // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2009. Vol. 1. P. 8–16.
- [65] *Coffer J.L., Whitehead M.A., Nagesha D.K., Mukherjee P., Akkaraju G., Totolici M., Saffie R.S., Canham L.T.* // *Phys. Stat. Solidi A.* 2005. Vol. 202. N 8. P. 1451–1455.
- [66] *Mukherjee P., Whitehead M.A., Senter R.A., Fan D., Coffer J.L., Canham L.T.* // *Biomed Microdevices.* 2006. Vol. 8. P. 9–15.
- [67] *Rezwana K., Chena Q.Z., Blakera J.J., Boccaccini A.R.* // *Biomaterials.* 2006. Vol. 27. P. 3413–3431.
- [68] *Ranganathan S.I., Yoon D.M., Henslee A.M., Nair M.B., Smid C., Kasper F.K., Tasciotti E., Mikos A.G., Decuzzi P., Ferrari M.* // *Acta Biomater.* 2010. Vol. 6. P. 3448–3456.
- [69] *Colilla M., Izquierdo-Barba I., Vallet-Regi M.* // *Expert Opin. Ther. Pat.* 2008. Vol. 18. N 6. P. 639–656.
- [70] *Wu E.C., Andrew J.S., Cheng L., Freeman W.R., Pearson L., Sailor M.J.* // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32. P. 1957–1966.
- [71] *Limnell T., Riikonen J., Salonen J., Kaukonen A.M., Laitinen L., Hirvonen J., Lehto V.* // *Int. J. Pharm.* 2007. Vol. 343. P. 141–147.
- [72] *Cheng L., Anglin E., Cunin F., Kim D., Sailor M.J., Falkenstein I., Tammewar A., Freeman W.R.* // *Br. J. Ophthalmol.* 2008. Vol. 92. P. 705–711.
- [73] *Foraker A.B., Walczak R.J., Cohen M.H., Boiarski T.A., Grove C.F., Swaan P.W.* // *Pharmaceut. Res.* 2003. Vol. 20. N 1. P. 110–116.
- [74] *Ravaine V., Ancla C., Catargi B.* // *J. Control. Release.* 2008. Vol. 132. P. 2–11.
- [75] *Zaki M., Patil S.K., Baviskar D.T., Jain D.K.* // *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2012. Vol. 4. P. 280–292.
- [76] *Desaia T.A., Hansford D., Ferrari M.* // *J. Membrane Sci.* 1999. Vol. 159. P. 221–231.
- [77] *Desaia T.A., Hansford D., Ferrari M.* // *Biomol. Eng.* 2000. Vol. 17. P. 23–36.