

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Цурикова Ульяна Александровна**

**ОПТИЧЕСКИЙ ОТКЛИК КРЕМНИЕВЫХ НАНОЧАСТИЦ-  
СОНОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В КОНТРОЛЕ ПРОЦЕССОВ  
ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ЖИВЫМИ КЛЕТКАМИ**

1.3.21 Медицинская физика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

в.н.с., к.ф.-м.н. Осминкина Л.А.

Москва 2024

## Оглавление

<i>Общая характеристика работы</i> .....	5
<i>Обзор литературы</i> .....	10
<i>Глава 1. Пористые наноструктуры кремния: методы синтеза и физико-химические свойства</i> .....	10
1.1. Получение пленок пористого кремния методом электрохимического травления пластин кристаллического кремния .....	10
1.2. Получение массивов кремниевых нанонитей методом металл-стимулированного химического травления .....	14
1.3. Получение наночастиц кремния измельчением пленок пористого кремния .....	17
1.4. Динамическое рассеяние света для определения размеров наночастиц кремния и их поверхностного потенциала .....	18
1.5. Инфракрасная спектроскопия для исследования состава поверхностного покрытия кремниевых наноструктур .....	22
1.6. Спектроскопия комбинационного рассеяния света для исследования наноматериалов на основе кремния .....	24
1.7. Фотолюминесцентные свойства кремниевых наноструктур.....	29
<i>Глава 2. Биомедицинские применения наноструктур на основе кремния</i> .....	31
2.1. Свойство биodeградируемости кремниевых наноматериалов .....	33
2.1.1. Скорость деградации для биомедицинских применений.....	33
2.1.2. Влияние ортокремниевой кислоты на организм человека .....	37
2.1.3. Связь между пористостью нанокремния и биосовместимостью/биоразлагаемостью.....	37
2.2. Цитотоксичность.....	38
2.2.1. Цитотоксичность наноматериалов на основе пористого кремния.....	38
2.2.2. Связь между размером наночастиц и их цитотоксичностью .....	39
2.3. Пористый кремний для направленного действия на опухоли и визуализации .....	41
2.4. Пористый кремний в фотодинамической и фототермической терапии .....	42
2.5. Биосовместимые биodeградируемые наночастицы пористого кремния в терапии.....	44
2.6. Наночастицы пористого кремния как наноконтейнеры для доставки лекарств.....	47
2.7. Наночастицы пористого кремния – сенсibilизаторы терапевтического ультразвука (соносенсibilизаторы) .....	47
<i>Выводы из литературного обзора</i> .....	51
<i>Экспериментальные результаты и их обсуждение</i> .....	53
<i>Глава 3. Разработка методов получения наночастиц пористого кремния. Исследование структурных и оптических свойств полученных образцов</i> .....	53
3.1. Метод получения наночастиц пористого кремния из массивов кремниевых нанонитей. Структурные и оптические свойства полученных образцов .....	53

3.2. Метод получения наночастиц пористого кремния из пленок пористого кремния. Структурные и оптические свойства полученных образцов .....	60
3.3. Метод получения наночастиц пористого кремния из пленок перфорированного пористого кремния. Структурные и оптические свойства полученных образцов .....	63
<b>Глава 4. Исследования цитотоксических свойств кремниевых наночастиц .....</b>	<b>71</b>
4.1. Исследования цитотоксичности наночастиц, полученных измельчением кремниевых нанонитей .....	72
4.2. Исследования цитотоксичности наночастиц, полученных измельчением пленок перфорированного пористого кремния .....	74
4.3. Исследования локализации пористых наночастиц кремния в живых клетках методом люминесцентной конфокальной микроскопии .....	77
<b>Глава 5. Исследования растворения наночастиц кремния в модельных биожидкостях и живых клетках оптическими методами люминесцентной конфокальной микроскопии и комбинационного рассеяния света .....</b>	<b>80</b>
5.1. Квантово-размерный эффект в кремниевых нанокристаллах при их растворении в модельных биологических жидкостях .....	81
5.2. Исследование визуализации и биодеградациии пористых кремниевых наночастиц в клетках методом спектроскопии комбинационного рассеяния .....	85
5.3. Исследование растворения пористых и непористых наночастиц кремния в модельных биологических жидкостях и клеточных культурах .....	87
5.4. Влияние метода сушки и предварительной обработки поверхности наночастиц пористого кремния на их цитотоксичность и скорость растворения в модельных жидкостях и живых клетках .....	94
<b>Глава 6. Биосовместимые наночастицы пористого кремния как эффективные сенситизаторы терапевтического ультразвука для уничтожения раковых клеток и бактерий .....</b>	<b>102</b>
6.1. Исследование кавитационной активности водных суспензий пористых кремниевых наночастиц с различной степенью гидрофобности поверхности .....	102
6.2. Наночастицы, изготовленные из пористых кремниевых нанонитей как сенситизаторы медицинского ультразвука .....	112
6.3. Пористые кремниевые наночастицы – соносенситизаторы для уничтожения бактерий .....	113
6.4. Амфифильные фотолюминесцентные пористые кремниевые наночастицы как эффективные соносенситизаторы для уничтожения клеток .....	120
<b>Результаты и выводы .....</b>	<b>126</b>
<b>Публикации автора по теме диссертации .....</b>	<b>128</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>133</b>

## **Список сокращений и условных обозначений**

ПК – пористый кремний

нк-Si – нанокристаллы кремния

НЧ-ПК - наночастицы пористого кремния

К-НН – кремниевые нанонити

ПК-НН - пористые кремниевые нанонити

НЧ-К – непористые наночастицы кремния

пфПК – пленки перфорированного пористого кремния

Дек-ПК-НЧ – кремниевые наночастицы, покрытые декстраном

УЗ – ультразвук

ФЛ – фотолюминесценция

КРС – комбинационное рассеяние света

ЭХТ – электрохимическое травление

МСХТ – металл-стимулированное химическое травление

ZP - дзета-потенциал

ДРС - динамическое светорассеяние

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

## Общая характеристика работы

### Актуальность работы

Современная медицина сталкивается с вызовами в области высокоточной диагностики и целенаправленного лечения заболеваний. Традиционные методы терапии ограничены в своей точности и часто сопровождаются значительными побочными эффектами из-за неспособности избирательно воздействовать на поражённые ткани. Применение нанотехнологий, в частности наночастиц с заданными физико-химическими свойствами, позволяет разработать методы селективного воздействия на клеточные структуры, минимизируя ущерб для здоровых тканей. Это открывает перспективы для создания безопасных, эффективных и высокоспецифичных подходов в диагностике и терапии.

Наночастицы пористого кремния (НЧ-ПК) являются перспективным материалом для медицины благодаря своей уникальной комбинации свойств: биосовместимость, биodeградация до нетоксичных продуктов, таких как кремниевая кислота для наночастиц с концентрациями до 1 мг/мл *in vitro* и 50 мг/кг *in vivo*, возможность модификации поверхности для достижения целевого действия в биологических системах, а также наличие уникальных оптических свойств наноразмерных полупроводниковых материалов из кремния. Эти характеристики делают НЧ-ПК многообещающим материалом для использования в биомедицинских приложениях, включая доставку лекарственных препаратов, биовизуализацию и диагностику заболеваний [1.].

Одной из ключевых проблем при использовании наноматериалов в медицине является их потенциальная токсичность, которая особенно проявляется при длительном нахождении наночастиц в организме. В этом плане НЧ-ПК, взятые в указанных выше нетоксичных концентрациях, выделяются за счёт своей способности к полной биodeградации, что сводит к минимуму возможность накопления материала в тканях и снижает риск долгосрочных побочных эффектов. При растворении пористого кремния в биологических жидкостях образуется кремниевая кислота, которая безопасно выводится из организма [2.].

Не менее важным аспектом является возможность управления свойствами биорастворимости и биоактивности НЧ-ПК посредством модификации их поверхности и активации терапевтических свойств наночастиц внешними физическими воздействиями – светом, радиочастотным электромагнитным облучением, ультразвуком [1.]. Ранее было показано, что применение терапевтического ультразвука (УЗ) низкой интенсивности в

сочетании с НЧ-ПК может повысить эффективность воздействия на раковые клетки *in vitro* и *in vivo* за счёт свойств наночастиц соносенсибилизации [3.]. Предварительные исследования свидетельствуют о том, что НЧ-ПК могут индуцировать кавитационные процессы при облучении из УЗ, что, возможно, приводит к разрушению раковых клеток [4.]. Однако, открытые эффекты соносенсибилизации УЗ волн можно унифицировать и значительно усилить путем модификации поверхности наночастиц.

Таким образом, исследование взаимодействия НЧ-ПК с биологическими системами с применением оптических методов, а также исследование влияния модификации поверхности наночастиц на их свойства соносенсибилизации является актуальной задачей современной медицины. Комбинация таких подходов может способствовать созданию высокоэффективных и безопасных методов лечения онкологических и других заболеваний, улучшению качества жизни пациентов и снижению побочных эффектов существующих методов терапии.

Поэтому основной целью работы являлось исследование физических основ и разработка подходов для диагностики и направленного воздействия на биологические системы с использованием биосовместимых наночастиц пористого кремния, обладающих уникальными оптическими свойствами и сенсбилизацией ультразвука. В ходе работы изучены квантово-размерные эффекты, приводящие к изменению структурных и оптических свойств наночастиц при инкубации в модельных биологических жидкостях и клеточных культурах, что позволило выявить связь их структурно-физических характеристик с биорастворимостью. Также исследованы механизмы сенсбилизации терапевтического ультразвука с участием НЧ-ПК, включая влияние гидрофобных свойств их поверхности, и цитотоксические эффекты наночастиц и УЗ при воздействии на раковые клетки и бактерии. Эти исследования создают основу для управления биорастворимостью и активностью наночастиц, что может быть использовано для их интеграции в медицинскую физику и разработки новых методов лечения и диагностики.

**Цель диссертационной работы:** разработка физических и физико-химических основ применения пористых кремниевых наночастиц-соносенсибилизаторов с целью диагностики и воздействия на биологические системы.

### **Основные задачи диссертационной работы:**

1. Исследовать квантово-размерные эффекты, проявляющиеся при изменении структурных свойств наночастиц в процессе их инкубации в модельных биологических жидкостях и клеточных культурах, с использованием люминесцентной микроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния света.
2. Исследовать механизмы сенсibilизации терапевтического ультразвука наночастицами на основе пористого кремния с различной степенью гидрофобности поверхности.
3. Исследовать влияние свойств пористых наночастиц кремния-соносенсibilизаторов на эффективность уничтожения бактерий и раковых клеток *in vitro*.
4. С использованием разработанных подходов доказать возможность управления цитотоксическими свойствами наночастиц и их биорастворимостью для применения в биомедицине.

### **Научная новизна работы:**

1. В ходе работы выявлены изменения структурных и оптических свойств наночастиц пористого кремния при их инкубации в модельных биологических жидкостях и клеточных культурах. Показано, как варьирование морфологии наночастиц влияет на их взаимодействие с клетками.
2. Изучены механизмы сенсibilизации терапевтического ультразвука наночастицами пористого кремния с различной степенью гидрофобности поверхности. Установлена корреляция между гидрофобными свойствами поверхности и способностью наночастиц сенсibilизировать ультразвуковое воздействие.
3. Детально изучены цитотоксические свойства наночастиц пористого кремния в отношении бактериальных и раковых клеток. Показано, что с использованием совместного воздействия наночастиц и терапевтического ультразвука можно добиться эффективного уничтожения патогенов без повреждения здоровых тканей.
4. В работе показана возможность управления биорастворимостью наночастиц путем изменения их структурных характеристик и модификации поверхности. Этот новый подход позволяет настраивать параметры наночастиц для их эффективного применения в медицинской физике.

## **Практическая значимость**

Разработанные подходы к использованию пористых наночастиц кремния могут внести вклад в совершенствование методов диагностики и терапии в биомедицине. Полученные данные о квантово-размерных и оптических свойствах наночастиц позволяют рассматривать их как перспективные инструменты для биомаркирования, а изучение их способности к соносенсибилизации открывает возможности для создания эффективных методов ультразвуковой терапии. Управление биорастворимостью и цитотоксичностью наночастиц также представляет ценность для разработки безопасных антибактериальных и противораковых препаратов. Результаты работы могут способствовать созданию высокоточных и безопасных биомедицинских технологий, направленных на совершенствование диагностических и терапевтических подходов.

### **На защиту выносятся следующие основные результаты и положения:**

1. В процессе биорастворения нанокристаллов в составе наночастиц пористого кремния наблюдаются квантово-размерные эффекты, заключающиеся в синем сдвиге максимума фотолюминесценции и низкочастотном сдвиге линии колебаний фононов кристаллической решетки в спектрах комбинационного рассеяния света. Эти эффекты связаны с уменьшением размеров нанокристаллов вследствие растворения, что изменяет их электронные и колебательные состояния, приводя к изменению оптических свойств наночастиц.
2. Порог акустической кавитации для частоты 2.08 МГц значительно зависит от свойств поверхности наночастиц пористого кремния. В суспензиях гидрофобных наночастиц порог кавитации снижается до 270 кПа, что более чем в два раза ниже порога в чистой воде (590 кПа). Это объясняется тем, что газ в гидрофобных порах стабилен и функционирует как устойчивый зародыш кавитации, в то время как в гидрофильных порах газ вытесняется капиллярным давлением Лапласа. Для амфифильных наночастиц с частично гидрофобной поверхностью порог кавитации составляет 340 кПа, что также ниже по сравнению с гидрофильными наночастицами (430 кПа), но выше, чем для полностью гидрофобных наночастиц.
3. Понижение порога акустической кавитации в системах 1 – бактерии E.Coli в присутствии покрытых декстраном гидрофильных наночастиц пористого кремния и 2 – культуры клеток линии K562 и 3ТНН в присутствии амфифильных наночастиц пористого кремния позволяет достичь полного уничтожения клеток при интенсивностях

ультразвука, которые сами по себе не оказывают значительного воздействия на жизнеспособность клеток.

**Степень достоверности.** Достоверность результатов обеспечена использованием комплекса современных инструментальных методов анализа, статистической оценкой погрешностей измерений, а также высокой воспроизводимостью полученных результатов и их согласованностью для различных методов.

**Публикации.** Основное содержание диссертационной работы опубликовано в 8 статьях, входящих в перечень ВАК и 10 тезисах докладов.

**Личный вклад автора** заключается в выборе объектов исследования, проведении измерений и интерпретации полученных результатов, а также в поиске, систематизации и осмыслении данных литературы по теме работы; планировании, постановке и осуществлении экспериментальной работы; обработке и интерпретации полученных данных. Содержание диссертационной работы и основные положения, выносимые на защиту, отражают персональный вклад автора в опубликованные статьи и тезисы.

**Структура и объем работы.** Представленная диссертационная работа изложена на 142 страницах машинописного текста, включает 78 рисунков и 5 таблиц. Состоит из введения, 6 глав, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 130 источников.

## Обзор литературы

### Глава 1. Пористые наноструктуры кремния: методы синтеза и физико-химические свойства

Наиболее распространёнными подходами в получении кремниевых наноструктур для биомедицинских целей является методы электрохимического и металл-стимулированного химического травления пластин кристаллического кремния, в результате которых получают пористые пленки и нанонити кремния, которые затем измельчают до наночастиц.

#### 1.1. Получение пленок пористого кремния методом электрохимического травления пластин кристаллического кремния

Электрохимическое травление (ЭХТ) пластин кристаллического кремния (с-Si) – один из первых методов получения наноструктурированных кремниевых пленок [5.]. В результате данного процесса вытравливается часть кремниевого монокристалла с образованием пленки в виде кремниевых стенок и пор, которую называют пористый кремний (ПК). Впервые ПК был получен с помощью ЭХТ в 1956 году [5.], [6.]. В качестве электролитов чаще всего применяют концентрированную плавиковую кислоту (HF) или ее водно-спиртовые смеси HF: H<sub>2</sub>O:C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH в различных пропорциях. Этот метод получения ПК остается одним из наиболее практичных и доступных на сегодняшний день. Ниже представлены основные химические реакции, происходящие на границе кремний/электролит под воздействием положительного потенциала и приводящие к образованию пленки ПК (рисунок 1.1) [7.].

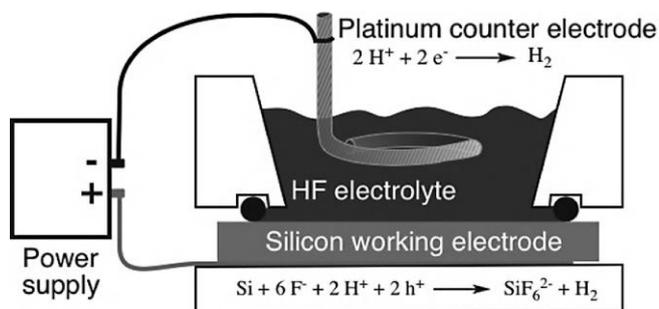
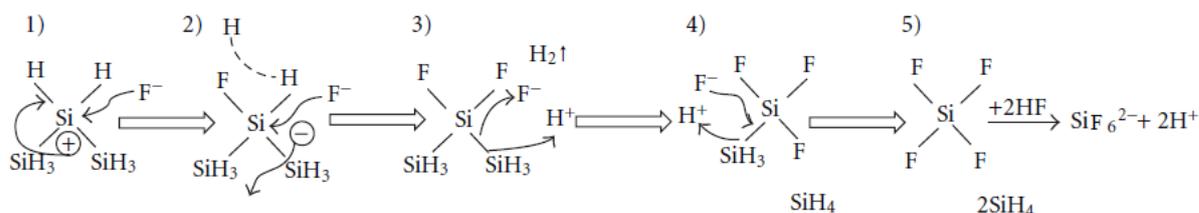


Рисунок 1.1 Схематическое изображение ячейки для синтеза пленок ПК методом ЭХТ [7.].

При включении постоянного тока между анодом (пластина с-Si) и катодом (платиновый электрод), находящимся в растворе, происходят следующие реакции [8.]



Модель образования пор при ЭХТ с-Si представлена на рисунке 1.2: 1) из-за слабой поляризации между атомами кремния и водорода, ион фтора из раствора плавиковой кислоты сталкивается с покрытой водородом поверхностью кремния, так как для образования связи необходима дырка; 2) если после столкновения получившаяся дырка достигает поверхности, то образуется связь Si-F; 3) так как связь Si-F сильно поляризована, то она влияет на образование второй связи с ионом фтора тем же методом, в результате чего на поверхности образуется связь кремния с двумя атомами фтора; 4) связи Si-F уменьшают электронную плотность связи Si-Si, из-за чего эти связи могут взаимодействовать с HF или H<sub>2</sub>O для образования связи Si-F; 5) в результате из HF и SiF<sub>4</sub> образуется стабильный анион SiF<sub>6</sub><sup>2-</sup> [8].



**Рисунок 1.2** – Механизм образования пористого кремния при электрохимическом травлении пластин с-Si [8.].

Пористый слой может быть отслоен от кремниевой подложки путем кратковременного сильного увеличения плотности тока. Это приводит к диффузии электролита и удалению кремния на границе раздела пористый кремний/кристаллический кремний быстрее, чем происходит образование пор [9.].

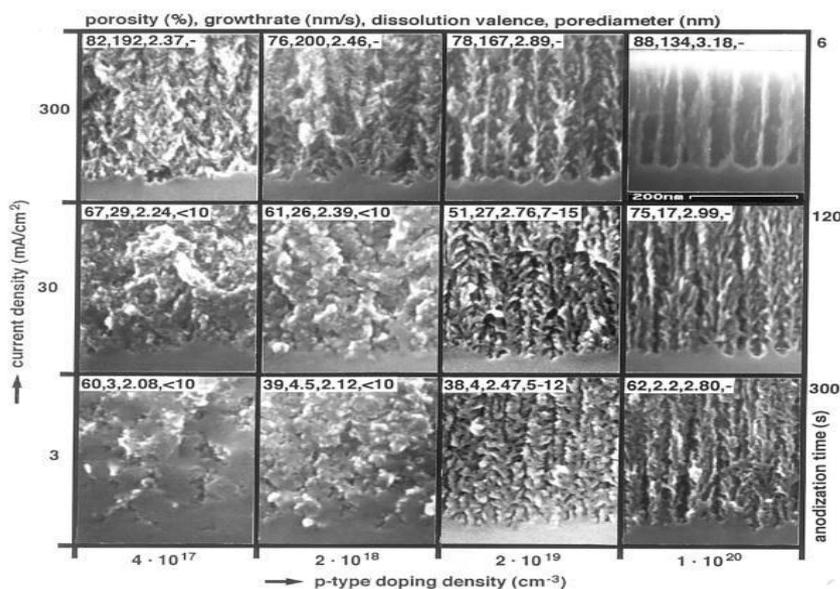
В настоящее время метод ЭХТ формирования ПК является одним из самых распространенных ввиду своей возможности легко регулировать морфологией получаемых пленок ПК путем изменения концентраций растворов используемых при травлении электролитов, плотности тока травления, уровня легирования используемых при травлении подложек с-Si [10.].

Одной из основных характеристик ПК является его пористость  $p$ , определяемая как

$$p = 1 - \frac{\rho_{ПК}}{\rho_{Si}}, \quad (1.3)$$

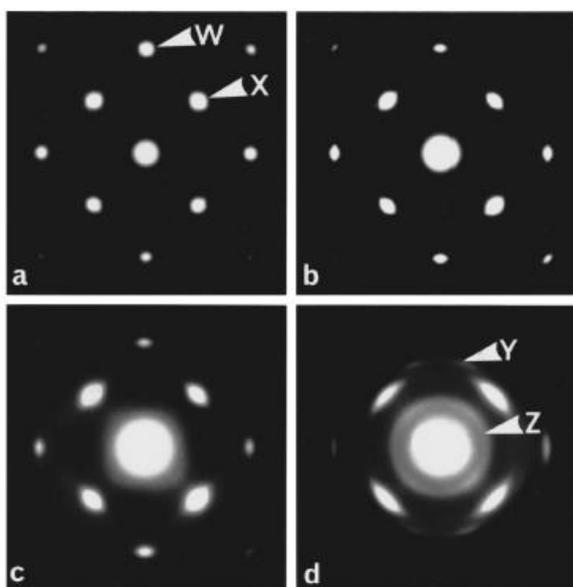
где  $\rho_{ПК}$  – плотность ПК,  $\rho_{Si}$  – плотность c-Si. Параметр  $p$  характеризует отношение удаленного вещества к исходному его количеству (до порообразования) и обычно выражается в процентах. Оценить величину  $p$  можно, например, гравиметрическим способом. Для этого взвешивают кремниевую пластину до порообразования, после формирования, и после стравливания слоя ПК [11].

ПК в зависимости от диаметра пор ( $D$ ) принято разделять на микропористый ( $D < 2$  нм), мезопористый ( $2 \text{ нм} < D < 50 \text{ нм}$ ) и макропористый ( $D > 50 \text{ нм}$ ) [12.]. Исследование микроструктуры ПК показало [14.], что в процессе ЭХТ c-Si рост пор происходит преимущественно в направлении [100]. Данный факт обусловлен анизотропией скорости травления в зависимости от кристаллографического направления [15.]: скорость травления вдоль осей [100],[110],[111] соотносятся как 15:10:1. Подобная анизотропия роста пор хорошо фиксируется для слоев на подложках из сильно легированного кремния дырочного (p) или электронного (n) типа проводимости. Данные сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) границы раздела ПК/c-Si для образцов p-типа (рисунок 1.3) представлены с учетом травления подложек c-Si различного уровня легирования и различных плотностей тока травления [16.]. Согласно полученным результатам, наблюдается тенденция увеличения пористости пленок при повышении плотности тока травления и уровня легирования кремния. В проведенных экспериментах для формирования ПК использовался электролит HF (50%):C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH=1:1.



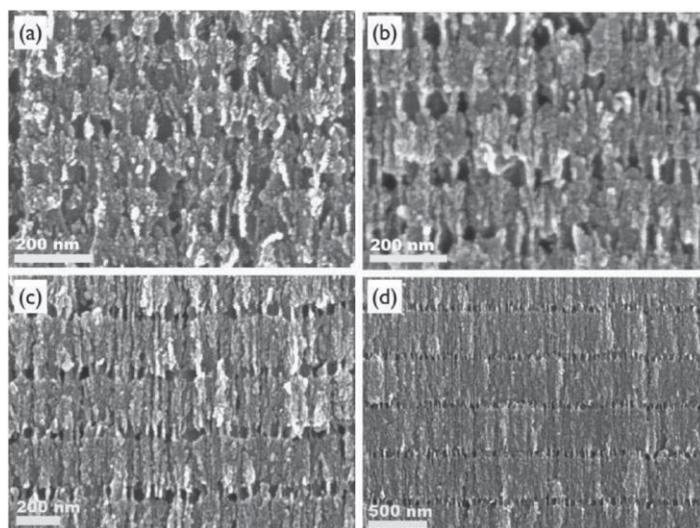
**Рисунок 1.3** Микрофотографии СЭМ пленок ПК различных морфологий, полученных методом ЭХТ [16.].

Картины дифракции электронов, полученные в геометрии "на прохождение" [17.] (рисунок 1.4), свидетельствуют о сохранении кристаллической решетки в материале ПК. В электронно-дифракционной картине выявляется периодическое распределение характерных пятен, как и в кристаллической структуре c-Si. Увеличение размытия пятен на снимке указывает на увеличение степени разупорядоченности в ПК при повышении его пористости (от (a) к (d)). Подобная разупорядоченность, вероятно, связана с разориентацией различных элементов микроструктуры, таких как нанокристаллы и нанонити, что является закономерным учетом их малых размеров.



**Рисунок 1.4** Картины дифракции электронов для образцов ПК (001) различной пористости (пористость увеличивается от (a) к (d)) [17.].

В работе [18.] был продемонстрирован способ получения пленок перфорированного ПК, в которой чередуются слои более низкой и высокой пористости (рисунок 1.5). Такие пенки показано легко измельчаются до наночастиц с распределением по размерам, близким к монодисперсному.



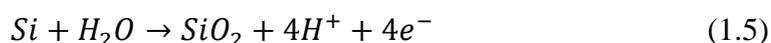
**Рисунок 1.5** Микрофотографии СЭМ пленки перфорированного ПК [18.]

## 1.2. Получение массивов кремниевых нанонитей методом металл-стимулированного химического травления

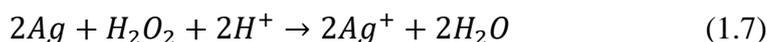
Кремниевые нанонити (КНН) представляют собой вытянутые вдоль одного направления нитевидные структуры диаметром от единиц до сотен нанометров. Для получения массивов кремниевых нанонитей (КНН) широко используется метод металл-стимулированного химического травления (МСХТ) *c*-Si. Впервые МСХТ был открыт группой китайских ученых в 2002 году [19.]. Этот метод привлекает своей простотой и универсальностью, является быстрым, эффективным, не требует сложного оборудования или реактивов. Получаемые КНН являются довольно регулярными, их поверхность не загрязнена сторонними примесями [20.].

Метод МСХТ основан на селективном химическом травлении с использованием каталитического металла (Au, Ag, Pt и др.) и позволяет получать плотно упакованные массивы монокристаллических нанонитей с единой кристаллографической ориентацией и различным уровнем легирования [21.]. МСХТ представляет собой последовательность двух процессов: нуклеации частиц металла на кремниевой подложке путём химического осаждения и последующего химического травления кремния [22.]:

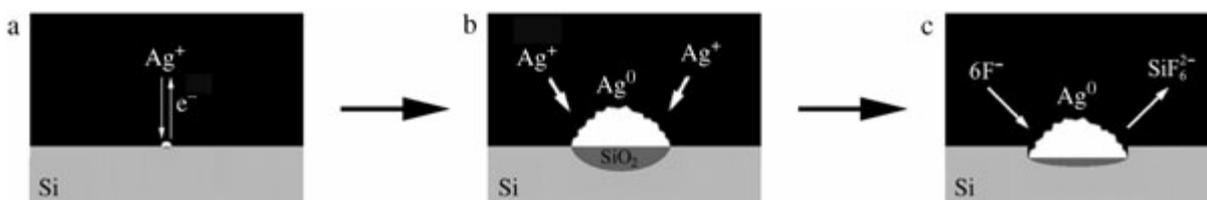
1. Нанесение серебра на поверхность кремниевой подложки:



2. Травление кремния:



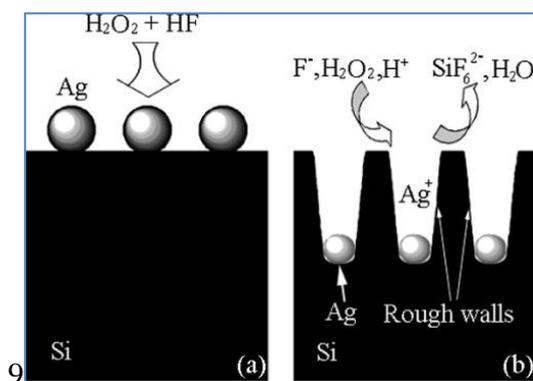
Первый этап - процесс нанесения серебра представляет собой последовательность трех окислительно-восстановительных реакций (1.4) -(1.6) и схематически изображен на рисунке 1.6.



**Рисунок 1.6** Схема нанесения наночастиц серебра на первом этапе метода МСХТ [23.].

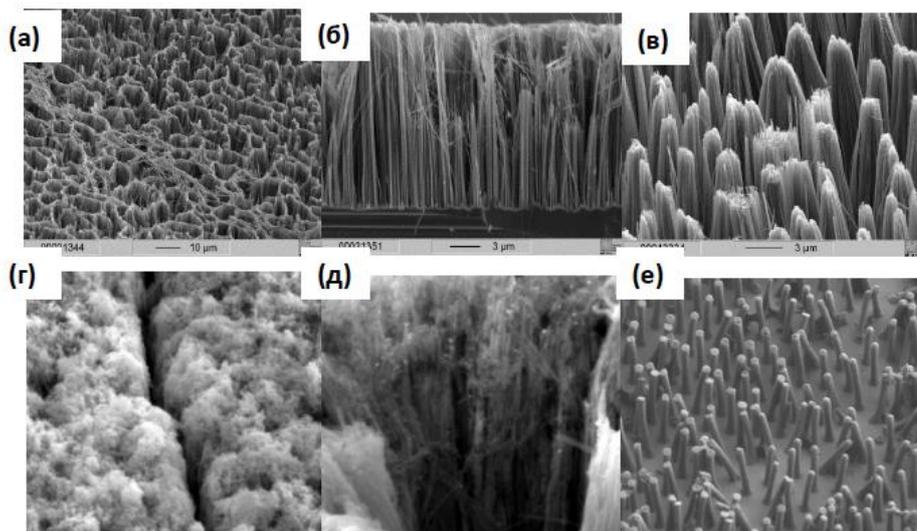
Положительный ион  $Ag^+$  восстанавливается за счет окисления  $Si$ , что приводит к образованию оксида  $SiO_2$  (2), который затем растворяется плавиковой кислотой (1.3). Таким образом, на первом этапе поверхность кремниевой пластины покрывается множественными «порами», занятыми частицами серебра.

Второй этап – непосредственно травление кремния заключается в окислительно-восстановительных реакциях (1.7-1.8), которые происходят на двух интерфейсах:  $Ag/H_2O_2$  и  $Ag/Si$  (рисунок 1.7). Сперва происходит окисление серебра за счет взаимодействия с перекисью водорода  $H_2O_2$ . Затем положительный ион серебра  $Ag^+$  восстанавливается на интерфейсе  $Ag/Si$ , растворяя, таким образом, кремний.



**Рисунок 1.7** Схема травления кремния на втором этапе метода МСХТ [23.].

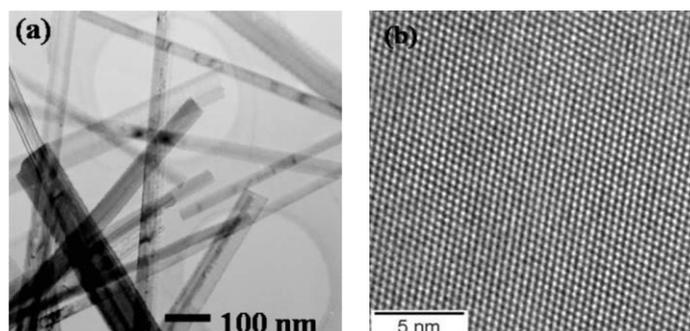
Изменяя концентрации кислот, уровень легирования и ориентацию подложки  $c$ - $Si$  в МСХТ можно влиять на морфологию получаемых КНН. Например, можно получать нанонити с различной ориентацией, различной упорядоченностью и пористостью (рисунок 1.8).

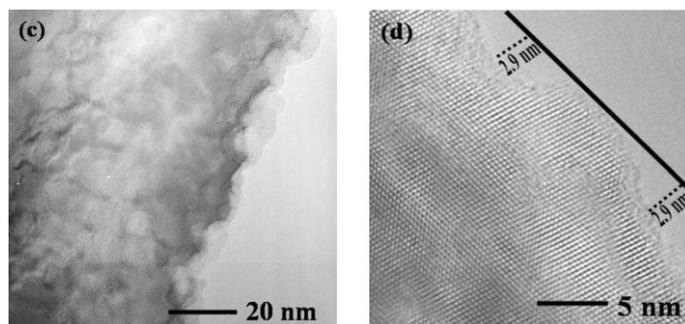


**Рисунок 1.8** Микрофотографии СЭМ массивов КНН различных морфологий, полученных методом МСХТ [24.].

Следует отметить, что массивы КНН синтезируются достаточно однородно на больших площадях пластин  $c$ -Si [25.],[26.] показано, что скорость травления КНН линейно зависит от температуры в диапазоне 20-50°C. Обнаружено, что КНН, получаемые из пластин с удельным сопротивлением порядка 1-5 мΩ\*см обладают крайне развитой поверхностью и являются пористыми. В то же время нити полученные из пластин с высоким удельным сопротивлением 1-10 Ω\*см непористые. В целом, на пористость КНН влияют такие параметры как концентрация окислителя ( $H_2O_2$ ), удельное сопротивление  $c$ -Si, из которого они получают, и время травления [26.].

Как можно видеть на снимках СЭМ, распределение диаметров КНН, получаемых методом МСХТ платин  $c$ -Si с высоким удельным сопротивлением, варьируется в пределах от 30 до 200 нм (Рисунок 1.9 а). При этом согласно снимкам, сделанным с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) высокого разрешения, такие КНН обладают монокристаллической структурой на всей длине (Рисунок 1.9 б), а на их поверхности присутствуют нанокристаллы размером порядка 2,5-3,5 нм, покрытые оксидом [27.].

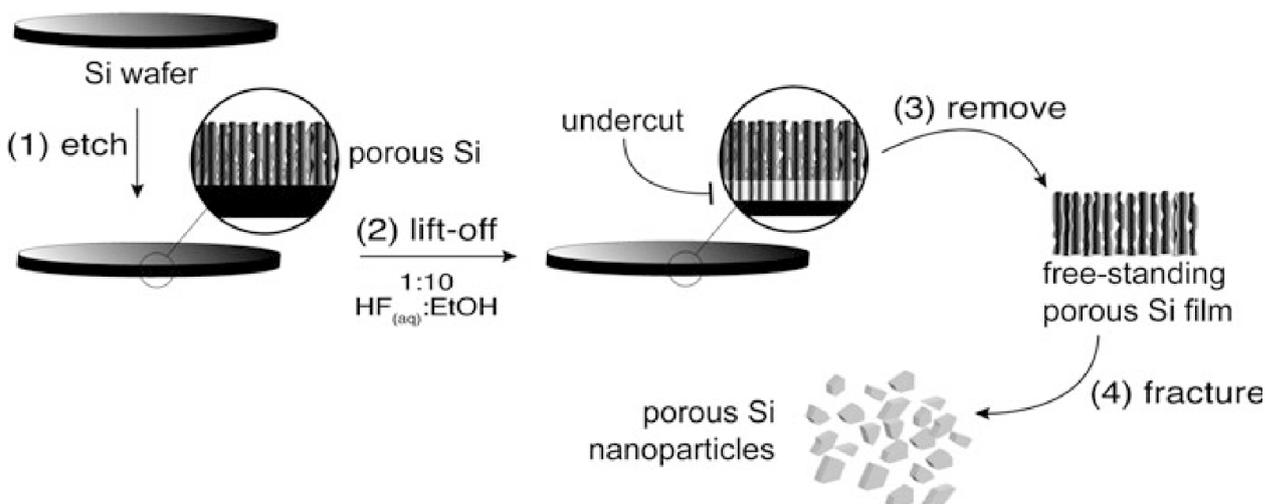




**Рисунок 1.9** Микрофотографии СЭМ КНН (а), ПЭМ высокого разрешения подтверждает монокристаллическую структуру КНН (б), ПЭМ высокого разрешения, подтверждающая присутствие нанокристаллов кремния и оксидной оболочки на поверхности КНН (с) и (д) [27.].

### 1.3. Получение наночастиц кремния измельчением пленок пористого кремния

Пористые кремниевые наночастицы (НЧ-ПК) обычно получают измельчением пленок ПК. Для этого пленки отделяют от подложки с-Si импульсом тока высокой плотности или применяя электролит с маленькой концентрацией HF, и затем свободную пленку измельчают с помощью ультразвуковой ванны или планетарной шаровой мельницы. На рисунке 1.10 схематически представлен процесс получения НЧ из пленок ПК [28.].

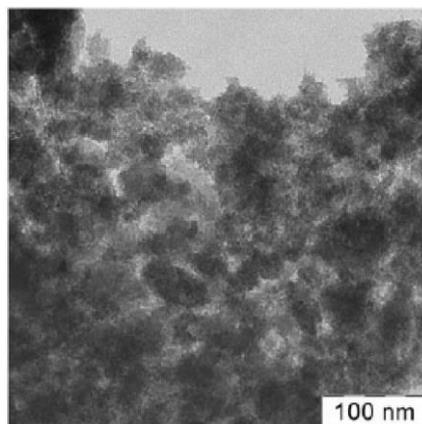


**Рисунок 1.10** Получение НЧ-ПК измельчением пленок ПК. ПК формируется ЭХТ пластин с Si(1). Электролит заменяется содержащий значительно меньшую концентрацию HF (2). Применение электрохимического тока порождает слой высокой пористости, и пленка ПК

отделяется от c-Si (3). Удаление пористого слоя в виде целой, свободно стоящей пленки ПК (4). Полученная пленка ПК затем измельчается до наночастиц различными методами [28].

Впервые водные суспензии кремниевых наночастиц были получены в 1992 г путем фрагментации пленок ПК в ультразвуковой ванне [29.]. Просвечивающая электронная микроскопия показала, что частицы кремния в суспензии имели неправильную форму и диаметр от нескольких микрометров до нанометров. Затем была продемонстрирована возможность разделения по размерам частиц ПК во взвесах методом их гравитационного осаждения (седиментации) или центрифугированием для получения мелких кремниевых наночастиц (КНЧ) [29.].

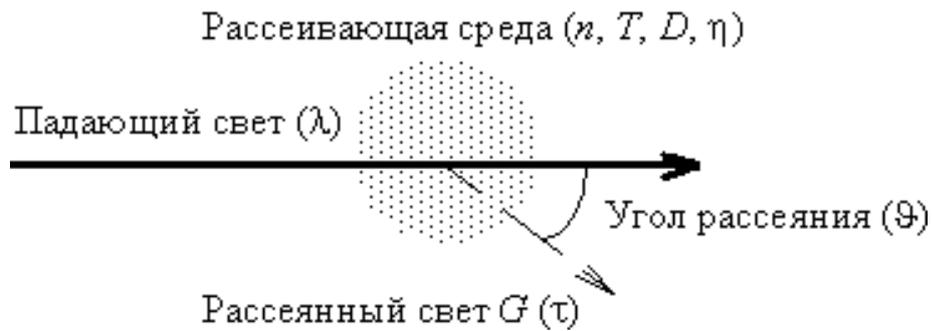
Согласно данным [16.] измельчением в шаровой мельнице пленок ПК в течение 30 мин, получают 100 нм пористые кремниевые наночастицы. Микрофотография ПЭМ таких наночастиц представлена на рис.1.11.



**Рисунок 1.11** ПЭМ-изображение наночастиц кремния, полученных механическим измельчением пленок ПК в планетарной мельнице [16.].

#### **1.4. Динамическое рассеяние света для определения размеров наночастиц кремния и их поверхностного потенциала**

Одним из самых распространенных методов определения размеров наночастиц в коллоидных растворах является динамическое рассеяние света (ДРС). Данный метод позволяет определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа характерного времени флуктуаций интенсивности рассеянного света. Схема измерения представлена на рисунке 1.12 [29.].

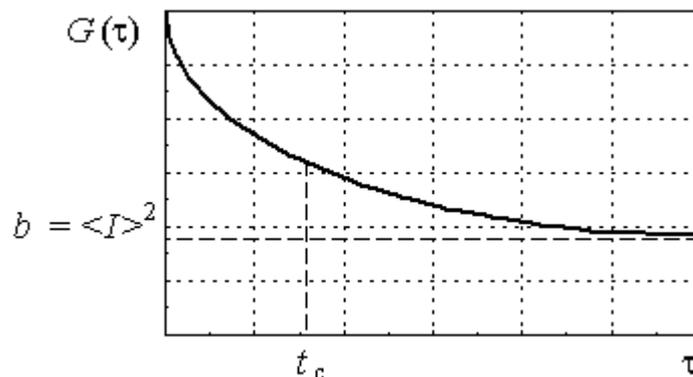


**Рисунок 1.12.**Х Схема измерения динамического рассеяния света [29].

Известно, что хаотическое броуновское движение дисперсных частиц вызывает микроскопические флуктуации их локальной концентрации. В свою очередь, эти флуктуации приводят к локальным неоднородностям показателя преломления среды. При прохождении лазерного луча через такую среду часть света будет рассеяна на этих неоднородностях. Флуктуации интенсивности рассеянного света будут соответствовать флуктуациям локальной концентрации дисперсных частиц. Информация о коэффициенте диффузии частиц содержится в зависящей от времени корреляционной функции флуктуаций интенсивности. Временная автокорреляционная функция  $G$ , согласно определению, имеет следующий вид:

$$G(\tau) = \langle I(0) * I(t - \tau) \rangle = \lim_{t_m \rightarrow \infty} \frac{1}{t_m} \int_0^{t_m} I(t) I(t - \tau) dt, \quad (1.9)$$

где  $\tau$  — время корреляции. Пример такой функции показан на рисунке 1.13 [29].



**Рисунок 1.13.** Пример автокорреляционной функции  $G$  [31].

Можно показать, что автокорреляционная функция  $G$  экспоненциально затухает во времени, и характерное время релаксации однозначно связано с коэффициентом диффузии  $D$ . Если форма частиц известна или задана, их размер может быть рассчитан с

использованием соответствующей формулы. Например, для сферических частиц можно использовать формулу Стокса-Эйнштейна:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}, \quad (1.10)$$

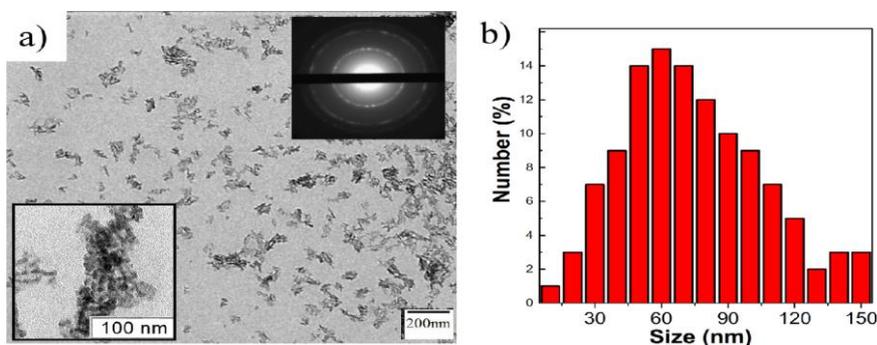
где  $k_B$  – константа Больцмана,  $T$  – абсолютная температура и  $\eta$  – сдвиговая вязкость среды, в которой взвешены частицы радиуса  $R$ .

В случае немонодисперсного распределения, корреляционная функция симулируется суммой нескольких корреляционных функций, соответствующих гауссовому распределению частиц по радиусу. Поскольку вклад крупных частиц в автокорреляционную функцию больше, данная методика более чувствительна к частицам микронного размера, чем к наночастицам, и измеряемое распределение по размерам не отражает истинного весового вклада частиц.

Для оценки распределения наночастиц по размерам используется индекс полидисперсности (PDI, ПДИ). PDI может находиться в диапазоне от 0 до 1, но чем ниже значение PDI, тем ближе распределение к монодисперсному. PDI НЧ-ПК обычно высчитывается программой автоматически при измерении размеров наночастиц методом ДРС, однако его также можно рассчитать из гистограмм распределения наночастиц по размерам, полученных обработкой изображений ПЭМ (рисунок 1.14), используя следующее уравнение:

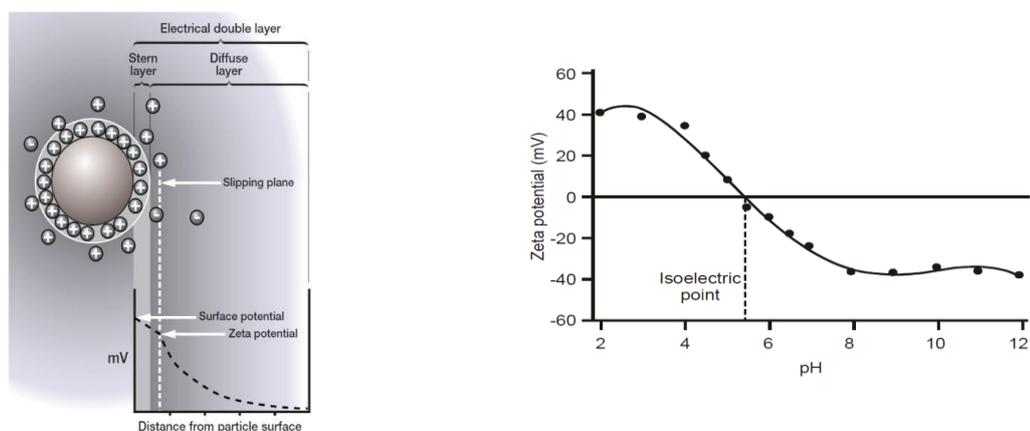
$$PDI = \left(\frac{\sigma}{D}\right)^2, \quad (1.11)$$

где  $D$  - средний диаметр КНЧ, а  $\sigma$  - стандартное отклонение.



**Рисунок 1.14** ПЭМ-изображение наночастиц кремния (на вставках показаны пористая структура (слева) и картина дифракции электронная (справа) полученных НЧ-ПК); (b) распределение НЧ-ПК по размерам.

Наличие у частиц, находящихся в полярном растворителе, поверхностного заряда приводит к тому, что концентрация ионов противоположного знака вблизи поверхности увеличивается [31.]. Слой растворителя, окружающий частицу, состоит из двух частей: внутренний слой или слой Штерна (Stern), где ионы жестко связаны с частицей, и внешний или диффузный слой, где ионы менее прочно прикреплены. Таким образом, вокруг заряженной частицы образуется двойной электрический слой (ДЭС). В диффузном слое существует условная область, внутри которой ионы и частицы образуют стабильное состояние. Если частица движется (например, под действием силы тяжести), то ионы внутри этой области движутся вместе с частицей, а вне области – не движутся. Граница этой области называется поверхностью гидродинамического сдвига или поверхностью скольжения [31.]. Потенциал внутри подвижной границы называется дзета-потенциалом.



**Рисунок 1.15** Двойной электрический слой и дзета-потенциал (а); Зависимость дзета-потенциала от рН (б) [31.].

Величина дзета-потенциала (ZP) дает представление о потенциальной устойчивости коллоидной системы. Если все частицы в суспензии имеют большой отрицательный или положительный дзета-потенциал, то они, как правило, отталкиваются друг от друга, и нет тенденции к флокуляции (агломерации) (рис. 1.15). Если частицы имеют небольшие значения дзета-потенциала, то нет такой силы, чтобы предотвратить сбор частиц вместе и их флокуляцию. Обычно границу между устойчивыми и неустойчивыми суспензиями принимают порядка +30 мВ или -30 мВ. Частицы, находящиеся в суспензии и имеющие значения дзета-потенциала больше, чем +30 мВ, или меньше, чем -30 мВ, как правило, считаются стабильными [32.].

Самый важный фактор, который влияет на ZP – кислотность среды рН. Знание дзета-потенциала без рН имеет практически нулевой смысл. Рассмотрим, например, суспензию частиц с отрицательными дзета-потенциалами. Если в суспензию добавить щелочи, то

поверхностный заряд частиц в суспензии будет уменьшаться. Если теперь добавить кислоты, то положительные ионы будут притягиваться к отрицательно заряженной поверхности частиц, и можно достичь такой точки, в которой отрицательный заряд частиц нейтрализуется. Дальнейшее добавление кислоты приведет к тому, что в суспензии будут образовываться частицы с положительным поверхностным зарядом. Значение рН, при котором дзета-потенциал становится равным нулю, называется изоэлектрической точкой [32.].

Таким образом, представление о поверхностном заряде НЧ-ПК и возможности управления этим зарядом с помощью изменения рН среды, в которой они находятся, может являться ключевым при изучении их функционализации и взаимодействии с биологическими объектами.

## **1.5 Инфракрасная спектроскопия для исследования состава поверхностного покрытия кремниевых наноструктур**

Химический состав поверхности ПК и НЧ-ПК удобно исследовать с помощью метода ИК-спектроскопии, так как он является методом, не требующим специальной обработки образца, позволяющем детектировать как поглощение инфракрасного излучения на локальных поверхностных колебаниях, так и на свободных носителях заряда.

Поскольку ПК и НЧ-ПК обладают весьма развитой поверхностью, достигающей в пределе величины  $800 \text{ м}^2/\text{см}^3$ , их физические свойства в значительной степени будут определяться состоянием поверхности. Учитывая, что формирование слоёв ПК происходит в химической среде, естественно предположить, что на его поверхности будут присутствовать химические элементы, входящие в состав электролита, такие как водород и фтор. Так же в результате окисления на поверхности образуются связи с кислородом.

На поверхности свежеприготовленного образца пленки ПК присутствует большое количество кремний-водородных связей  $\text{Si-H}_x$  ( $x=1,2,3$ ). Иными словами, поверхность свежеприготовленного пористого кремния гидрогенизирована. Пики поглощения от  $2140$  до  $2087 \text{ см}^{-1}$  приписывают валентным  $\text{Si-H}$ ,  $\text{Si-H}_2$  и  $\text{Si-H}_3$  связям, входящим в состав различных атомных композиций, например,  $\text{Si}_3\text{-SiH}$ ,  $\text{Si}_2\text{H-SiH}$ . Линии поглощения на частотах  $948\text{-}980 \text{ см}^{-1}$  относятся к деформационным  $\text{Si-H}$  модам в  $\text{Si}_2\text{H-SiH}$ . На частотах  $624 \text{ см}^{-1}$  – деформационным  $\text{Si-H}$  в комплексе  $\text{Si}_3\text{-SiH}$  [32.]. Широкая полоса поглощения от  $3200$  до  $3800 \text{ см}^{-1}$  является суперпозицией двух линий: первая ( $3650 \text{ см}^{-1}$ ) обусловлена валентной  $\text{O-H}$  модой в  $\text{Si-OH}$  комплексе, вторая ( $3500 \text{ см}^{-1}$ ) соответствует  $\text{O-H}$  связи молекулы воды [32.],[33.].

Широкий пик от 1050 до 1120  $\text{см}^{-1}$  приписывается валентным Si-O связям в группах Si-O-Si. Полоса поглощения на 617  $\text{см}^{-1}$  соответствует Si-Si связям.

Данные по интерпретации основных полос поглощения и типов колебаний в ПК обобщены и представлены в таблице 1.1.

**Таблица 1.1** Полосы поглощения и типы колебаний в ПК по данным ИК-спектроскопии.

<i>Максимум поглощения, (<math>\text{см}^{-1}</math>)</i>	<i>Типы колебаний</i>
3745	Si-OH
3610	O-H валентные (в SiOH)
3452	O-H валентные (в H <sub>2</sub> O)
2958	C-H валентные (в CH <sub>3</sub> )
2927	C-H валентные (в CH <sub>2</sub> )
2856	C-H валентные (в CH)
2248	Si-H валентные (в O <sub>3</sub> -SiH)
2197	Si-H валентные (в SiO <sub>2</sub> -SiH)
2140	Si-H <sub>3</sub> валентные (в SiH <sub>2</sub> -SiH)
2136	Si-H валентные (в Si <sub>2</sub> O-SiH)
2116	Si-H <sub>2</sub> валентные (в Si <sub>2</sub> H-SiH)
2087	Si-H валентные (в Si <sub>3</sub> -SiH)
1720	C=O
1230	SiCH <sub>3</sub> деформационные
1056-1160	Si-O валентные (в Si-O-Si и C-Si-O)
980	Si-F валентные
979	Si-H деформационные (в Si <sub>2</sub> H-SiH)
950	Si-F валентные
948	Si-H деформационные (в Si <sub>2</sub> H-SiH)
906	SiH <sub>2</sub> ножничные
850	SiH <sub>3</sub> антисимметричные-деформационные
827	Si-O деформационные (в Si-O-Si)
800	Si-CH <sub>3</sub>
624	Si-H деформационные (Si <sub>3</sub> -SiH)
617	Si-Si

При выдержке отслоённых плёнок ПК на воздухе в течение уже нескольких часов (или после напуска кислорода) по данным ИК-спектроскопии наблюдается резкое увеличение содержания кислорода в ПК, тогда как интенсивность водородных пиков заметно падает [34.]. При длительном выдерживании в окисляющей атмосфере или в процессе термического окисления при температуре  $\geq 1100\text{K}$  последние исчезают полностью, и в результате формируется термическая плёнка  $\text{SiO}_2$ . Кроме того, в ИК-спектрах появляются новые полосы поглощения при 2250, 2200 и  $870\text{ см}^{-1}$  [34.]. Первые две обусловлены окислением обратных по отношению к  $\text{SiH}_x$  кремниевых связей с образованием  $\text{O}_2\text{SiH}_x$  групп, а последняя полоса соответствует образованию  $\text{Si-O}$  связей.

При измельчении пленок ПК до наночастиц в спирту или в воде, водород десорбируется с их поверхности, и поверхность ПК частично окисляется. В процессе окисления соединения с водородом замещаются на соединения с кислородом, что приводит к изменению свойств НЧ-ПК с гидрофобных на гидрофильные и образованию монослоя оксида на поверхности нанокристаллов. Такое изменение свойств превращает НЧ-ПК в удобное средство для взаимодействия с лекарствами, растворенными в воде или физрастворе [35.].

## **1.6. Спектроскопия комбинационного рассеяния света для исследования наноматериалов на основе кремния**

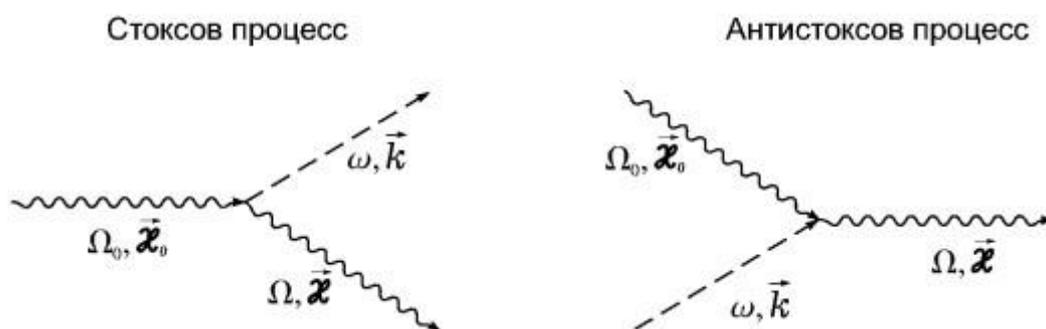
Для исследований взаимодействия твердотельных и биообъектов неинвазивный метод спектроскопии комбинационного (рамановского) рассеяния света (КРС), является в настоящее время одним из наиболее часто используемых и информативных подходов. В отличие от рэлеевского рассеяния света, в спектрах КРС присутствуют добавочные линии – сателлиты, обусловленные переходами в спектре колебательно-вращательных энергетических состояний системы и несущие информацию о ней.

Широкое исследование КР в кремнии началось в начале 1970-х годов. С помощью КР спектроскопии осуществлялось исследование оптических фононов в  $\text{c-Si}$  при длинах волн возбуждающего излучения, лежащих в видимом диапазоне света. В табл. 1.2. представлены характерные линии КР в  $\text{c-Si}$  1-го и 2-го порядков при участии оптических и акустических фононов.

**Таблица 1.2** Характерные линии КР в c-Si.

Название фонона	Обозначение	Частота, см <sup>-1</sup>
Продольный акустический (I порядка)	LA	303
Продольный оптический (I порядка)	LO	475
Поперечный оптический (I порядка)	TO	520.5
Продольный акустический (II порядка)	2LA	625
Поперечный оптический (II порядка)	2TO	940

Явление КРС заключается в том, что в процессе взаимодействия света с веществом происходит излучение, стоксов процесс, или поглощение, антистоксов процесс, фонона. Эти процессы можно проиллюстрировать соответствующими фейнмановскими диаграммами (рис. 1.16) [36].



Законы сохранения энергии и импульса для системы, падающего и рассеянного фотонов и одного фонона будут выражаться следующими соотношениями:

$$\chi_0 \pm k = \chi \quad (1.12)$$

$$\hbar\Omega_0 \pm \hbar\omega(k) = \hbar\Omega \quad (1.13).$$

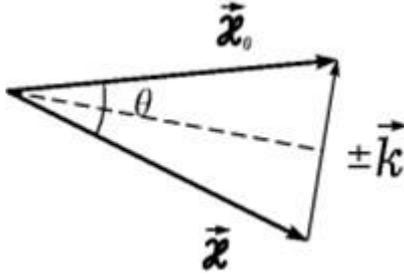
где  $\hbar\Omega_0$  и  $\chi_0$  – падающего фотона,  $\hbar\Omega$  и  $\chi$  – энергия и импульс рассеянного фотона,  $\hbar\omega$  и  $k$  – энергия и импульс фонона. Таким образом, при стоксовом процессе энергия и импульс рассеянного фотона уменьшаются, в то время как при антистоксовом процессе они увеличиваются на энергию и импульс рожденного или поглощенного фонона, соответственно. Частота света и колебаний решетки являются функциями соответствующих волновых векторов, поэтому, зная направление и частоту падающего и рассеянного света, а также тип колебания решетки, можно однозначно определить волновой вектор колебания решетки и изменение частоты рассеянного света.

Как уже говорилось, характерные энергии оптических фононов значительно меньше характерных энергий фотонов. Другими словами, частота и, соответственно, величина

волнового вектора фотона при рассеянии меняются мало:  $\chi_0 \approx \chi$ . Поэтому, как видно по рис.1.17, величина волнового вектора фонона, участвующего в рассеянии, будет определяться формулой:

$$k = 2 \cdot \chi_0 \cdot \sin(\theta/2), \quad (1.14)$$

где  $\theta$  — угол рассеяния. Максимального значения волновой вектор достигает при  $\theta = \pi$ , т.е. при обратном рассеянии света.



**Рисунок 1.17.** Векторная диаграмма

При комнатной температуре в спектрах КРС интенсивность стоксовой компоненты больше, чем антистоксовой. Этот факт является следствием температурного распределения квазичастиц, которыми являются фононы. В состоянии термодинамического равновесия число фононов данного типа с частотой  $\omega$  описывается распределением Бозе-Эйнштейна:

$$N = \left( \exp\left(\frac{\hbar\omega}{kT}\right) - 1 \right)^{-1}. \quad (1.15)$$

Отсюда для отношения интенсивностей стоксовой  $I_S$  и антистоксовой  $I_A$  линий получаем [37.]

$$\frac{I_A}{I_S} \approx \frac{N}{N+1} = \exp\left(-\frac{\hbar\omega}{kT}\right). \quad (1.16)$$

Это отношение позволяет по измеренным спектрам рассеяния определить температуру материала. При этом интенсивности стоксовой и антистоксовой линий особенно сильно различаются при низких температурах, когда  $kT < \hbar\omega$ . В классическом пределе, при  $kT \gg \hbar\omega$ , интенсивности обеих линий будут равны.

Спектроскопия КРС используется при решении самых разных исследовательских задач. Рассмотрим подробно процедуру извлечения из экспериментальных спектров КРС

таких количественных характеристик исследуемых пленок ПК и НЧ-ПК, как размер нанокристаллов и их объемная доля. В случае кремниевых пленок смешанного аморфно-нанокристаллического фазового состава спектр состоит из широкой низкочастотной компоненты с максимумом вблизи  $480 \text{ cm}^{-1}$ , связанной с аморфной фазой, и значительно более узкого пика вблизи  $520 \text{ cm}^{-1}$ , наличие которого отражает присутствие нанокристаллической фазы. Таким образом, суммарная интенсивность рассеяния  $I(\omega)$  в исследуемой области частот определяется как [38.].

$$I(\omega) = I_c(\omega) + I_a(\omega), \quad (1.17)$$

где  $I_c(\omega)$ ,  $I_a(\omega)$  — интенсивности “нанокристаллической” и “аморфной” линий соответственно.

Для анализа спектров нанокристаллической фазы полупроводников используется модель сильного пространственного ограничения оптических фононов. Существует несколько теоретических моделей, описывающих данный эффект. Наиболее широко используемой является феноменологическая (Гауссова) модель ограничения, которая была впервые предложена Рихтером [39.] для сферических частиц и расширена Кэмпбеллом и Фоше [40.] для цилиндрических частиц. Гауссова модель ограничения описывает уширение и красное смещение линии первого порядка КР в спектрах кристаллических частиц малых размеров (1-10 нм) [41.],[42.]. Согласно этой модели, волновая функция фонона ( $\psi$ ) ограничена в малом объеме кристаллической частицы и равна волновой функции для бесконечного кристалла ( $\varphi$ ), взятой с весом ( $w$ ), являющимся функцией размера частицы ( $L$ ):

$$\psi(q_0, r) = w(r, L)\varphi(q_0, r) = \psi'(q_0, r)u(q_0, r), \quad (1.18)$$

$$\varphi(q_0, r) = u(q_0, r)e^{-iq_0r}. \quad (1.19)$$

Интенсивность линии КРС первого порядка определяется интегралом по первой зоне Бриллюэна:

$$I_c(\omega) = \iiint d^3q \frac{|C(0, q)|^2}{(\omega - \omega(q))^2 + \left(\frac{\Gamma_0}{2}\right)^2}, \quad (1.20)$$

где  $C(q_0, q) = \frac{1}{(2\pi)^3} \iiint \psi'(q_0, r)e^{-iq_0r} d^3r$  — коэффициент Фурье-разложения функции (в нем заложен вес  $w$  волновой функции  $\psi$  фонона),  $q_0=0$  соответствует центру зоны Бриллюэна,  $q$  — дисперсионная зависимость фонона и  $\Gamma_0$  — естественная ширина линии спектра КРС. Обычно расчет проводят, принимая форму первой зоны Бриллюэна

сферической и дисперсионную зависимость изотропной. Это считается приемлемым в силу того, что только малая окрестность  $\Gamma$ -точки зоны Бриллюэна дает вклад в рассеяние.

В рамках этой модели построены соответствующие коэффициенты  $|C|^2$ , позволяющие определить конфигурацию частицы по форме линии  $I_C(\omega)$  для кристаллических частиц сферической и цилиндрической формы [43.].

Для нанокристалла сферической формы используются следующие весовая функция и коэффициенты:

$$w(r, L) = \exp\left(-\frac{2r^2}{L^2}\right), \quad (1.21)$$

$$|C(q)| = \exp\left(-\frac{q^2 L^2}{4}\right). \quad (1.22)$$

Итак, пренебрегая дисперсией нанокристаллов по размерам и используя (1.21), (1.222), выражение для интенсивности линии “нанокристаллической” компоненты примет следующий вид:

$$I_C(\omega) = \iiint \exp\left[-\frac{q^2 L^2}{4}\right] \frac{d^3 q}{(\omega - \omega(q))^2 + \left(\frac{\Gamma_0}{2}\right)^2} \quad (1.23)$$

Расчет интеграла (1.23) позволяет получить удобное для практических целей соотношение, связывающее непосредственно средний диаметр  $L$  нанокристалла со сдвигом пика КРС относительно опорного пика, соответствующего кристаллическому кремнию  $\Delta\omega$  [27]:

$$\Delta\omega = -52,3 \left(\frac{0,543}{L}\right)^{1,586} \quad (1.24)$$

Отсюда получаем выражение для  $L$  [44.]:

$$L = 0,543 \left(\frac{-\Delta\omega}{52,3}\right)^{-0,63} \quad (1.25)$$

В последнюю формулу величину  $L$  необходимо подставлять в нм, а  $\Delta\omega$  – в  $\text{см}^{-1}$ . Данная формула является ключевой для методики расчета размеров кремниевых нанокристаллов по данным КРС.

Аморфная компонента спектра обычно аппроксимируется с помощью гауссовой функции [45.]:

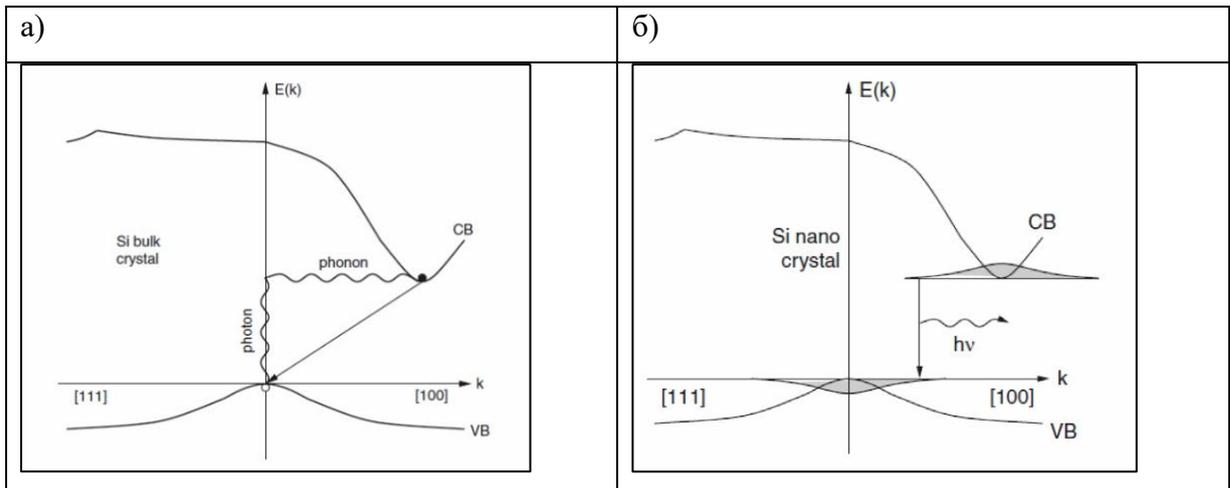
$$I_a(\omega) = B \exp\left[\frac{-(\omega - \omega_a)^2}{2\delta^2}\right], \quad (1.26)$$

где  $\delta = \frac{\Gamma_a}{2(2\ln 2)^{1/2}}$ ,  $\omega_a$  и  $\Gamma_a$  – положение максимума аморфной линии и ее ширина на полувысоте соответственно,  $B$  – константа. Используя константу  $B$  в качестве подгоночного параметра теории и эксперимента, можно оценить интенсивность рассеяния аморфной компоненты.

Таким образом, можно выявить растворение наночастиц кремния в биологических жидкостях и клетках, опираясь на уменьшение размера их нанокристаллов.

## 1.7. Фотолюминесцентные свойства кремниевых наноструктур

По своей природе c-Si является непрямозонным полупроводником, в результате чего излучательная электронно-дырочная рекомбинация в объемном кристалле кремния возможна лишь через взаимодействие с фононами кристаллической решетки (Рис.1.18а). Вероятность данного процесса крайне низкая, что делает объемный кремний непривлекательным для применения в оптоэлектронике [46.]. Однако в случае с кристаллами размером порядка нескольких нанометров существенный вклад в механизм рекомбинации вносит принцип неопределенности Гейзенберга. Согласно этому принципу  $\Delta x \Delta p_x \geq \frac{\hbar}{2}$  уменьшение области наблюдения частицы приводит к размытию ее волновой функции в р-пространстве. Это приводит к формированию квази-прямой запрещенной зоны (Рис. 1.18б), вероятность излучательной рекомбинации, через которую значительно превышает вероятность излучательной рекомбинации через непрямую запрещенную зону. Как следствие, мы можем наблюдать стабильную фотолюминесценцию в кремниевых наноструктурах.



**Рисунок 1.18** а) Схема излучательной рекомбинации в объемном кристалле кремния б) схема излучательной рекомбинации в наночастицах кремния [47].

Ширина запрещенной зоны c-Si при комнатной температуре равна 1,12 эВ. Энергия излучаемых фотонов при рекомбинации через такую зону соответствует инфракрасной области спектра [48].

Рассматривая системы с пониженной размерностью (например, нульмерные – квантовые точки, одномерные – нити, двумерные – пленки), следует учитывать тот факт, что поведение носителей заряда в них будет отличаться по сравнению с монокристаллом в связи с размерным квантованием [49]. Рассмотрим для простоты потенциальную яму с бесконечными стенками, и пусть  $d$  – размер, вдоль которого происходит ограничение движения электрона, тогда разрешенные значения квазиимпульса определяются соотношений:  $d=m\lambda/2$ ,  $k=2\pi/\lambda$ ,  $p=\hbar k$ , где  $\lambda$  – длина волны де Бройля,  $k$  – волновой вектор,  $p$  – квазиимпульс,  $\hbar$  – постоянная Планка  $m = 1, 2, \dots$  – целое число.

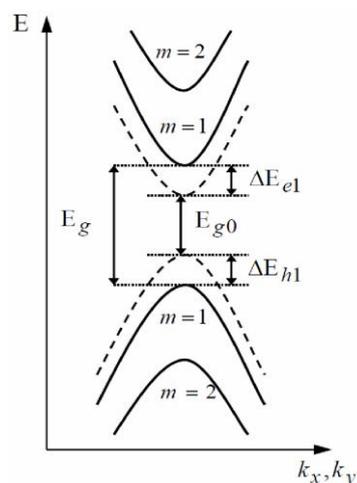
Отсюда следует:  $p=\pi\hbar m/d$ . Разрешенные уровни энергии будут образовывать множество дискретных значений:

$$\Delta E_g = \frac{\pi^2 \hbar^2}{2m^* d^2} \quad (1.27)$$

где  $m^*$ - эффективная масса носителей заряда в кристалле. Энергия оптических переходов возбужденных электронов и дырок в данном случае определяется выражением:

$$E_g = E_{g0} + \Delta E_g \quad (1.28)$$

где  $E_{g0}$  – ширина запрещенной зоны в объемном материале,  $\Delta E_g$  – квантово-размерная добавка (рис.1.19).



**Рисунок 1.19.** Влияние квантового размерного эффекта на ширину запрещенной зоны [50.].

Если ограничение движения носителей заряда происходит не только в одном направлении, а в двух или трёх, то добавочная энергия примерно складывается из добавок по этим направлениям.

Формула (1.27) была модифицирована для случая ПК и НЧ-ПК и в конечном варианте, учитывая величину запрещенной зоны *c-Si*  $E_{g0} = 1.12$  эВ, формула для расчёта диаметра люминесцирующих наночастиц по их спектру ФЛ имеет следующий вид [50.]:

$$E_g = 1.12 + \frac{3.73}{d^{1.39}}, \quad (1.29)$$

С увеличением запрещённой зоны наименьшая энергия поглощения, называемая границей поглощения, сдвигается в сторону больших энергий. Также увеличивается интенсивность поглощения. Пики на больших энергиях связаны с экситонами, и они сдвигаются в голубую сторону при уменьшении размеров частиц [50.].

## Глава 2. Биомедицинские применения наноструктур на основе кремния

В организме человека Si является необходимым микроэлементом, который содержится в основном в соединительных тканях, особенно в трахее, сухожилиях, костях и коже. Si обнаруживается также в различных органах, среди которых печень, сердце и легкие [51.]. Установлено, что общее содержание кремния в теле здорового взрослого человека весом 70 кг составляет около 0,5-1,0 г [51.]. Нано-формы кремния также обладают свойствами биосовместимости, и являются в настоящее время одними из наиболее перспективных твердотельных полупроводниковых материалов для биомедицинских применений.

Главным принципом биосовместимости является то, что биоматериал, хоть и является инородным для человеческого организма, не наносит вреда реципиенту, выполняя свою терапевтическую функцию. Для глубокого и всестороннего понимания биосовместимости необходимо разобраться в биохимических и физиологических механизмах, которые активируются при взаимодействии биоматериалов с тканями тела, а также в причинах их стимуляции и последствиях этих взаимодействий [52.]. Одним из ключевых принципов, на которых основывается биосовместимость ПК, является доказательство его биodeградируемости. Однако важно понимать, что биоматериал может нанести вред, даже если он способен к биodeградации. Например, были зафиксированы случаи агрегации, вызванной макрофагами, и последующих воспалительных реакций, возникающих до деградации биodeградируемых полимерных микрокапсул [52.]. Полимеризованные поли(L-лактид) (PLLA) винты и пластины, имплантированные взрослым пациентам, также были зафиксированы случаи спонтанных отеков, возникающих через три года после имплантации, несмотря на ранее проведенную верификацию биоразлагаемых свойств материала PLLA[52.]. Эти возможности подчеркивают необходимость переосмысления тонкого предположения о том, что биodeградируемость, или подтверждение того, что биоматериал действительно разлагается со временем в организме человека, является доказательством его абсолютной биосовместимости.

Потенциальные реакции организма на наличие биоматериала могут включать:

1. **Иммунный ответ:** Организм может распознавать биоматериал как чуждый, что приводит к активации иммунной системы и развитию воспалительной реакции.
1. **Инфильтрация клеток:** В области имплантации могут происходить внедрение различных клеток, таких как макрофаги, лимфоциты и фибробласты, что свидетельствует о воспалении и процессах заживления.
2. **Формирование фиброзной капсулы:** вокруг биоматериала может образовываться слой соединительной ткани, или фиброзная капсула, которая ограничивает взаимодействие импланта с окружающими тканями.
3. **Реакции отторжения:** В случаях, когда биоматериал воспринимается как инородный объект, может происходить отторжение, что может потребовать удаления импланта.
4. **Секреция биологически активных молекул:** на наличие биоматериала могут реагировать клетки путем выделения цитокинов и других молекул, влияющих на воспаление и заживление.
5. **Изменение микробиома:** Имплантация биоматериала может также влиять на микробиологическую среду в близлежащих тканях.

б. **Реакция на деградацию:** если биоматериал разлагается, продукты его разложения могут вызывать дополнительные реакции в организме.

Также важно понимать, что биосовместимость вводимых наноматериалов зависит как от факторов, связанных с организмом хозяина, так и от характеристик самого биоматериала. Таким образом, такие переменные, как возраст, пол, сопутствующие заболевания, диетические и жизненные привычки, а также генетическая предрасположенность хозяина, наряду с пористостью, составом материала и морфологией биоматериала, могут существенно повлиять на тип и продолжительность взаимодействий между тканями хозяина и молекулами или частицами биоматериала [53.].

## **2.1. Свойство биodeградируемости кремниевых наноматериалов**

### **2.1.1. Скорость деградации для биомедицинских применений**

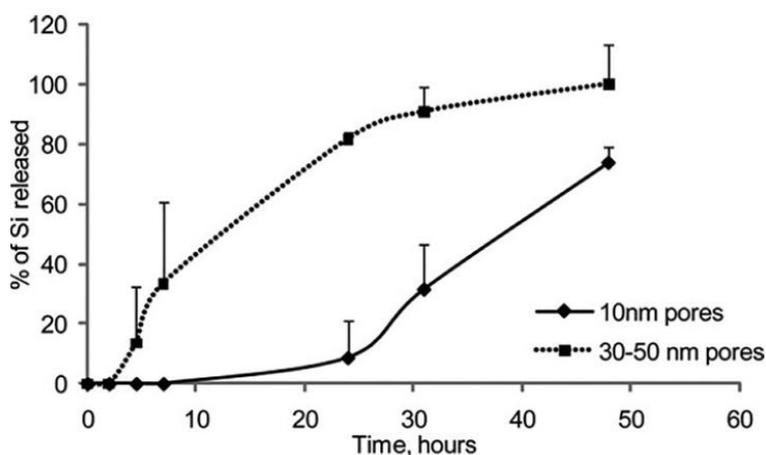
Кремний содержится в различных продуктах питания обычно в виде диоксида кремния ( $\text{SiO}_2$ ) [54.]. Подразумевается, что при употреблении твердых продуктов, содержащих  $\text{SiO}_2$ , в желудочно-кишечном тракте оксид гидролизуеться до орто-кремниевой кислоты [55.]. Орто-кремниевая кислота  $[\text{Si}(\text{OH})_4]$  является естественной формой кремния в физиологических жидкостях, таких как плазма крови, и это связано с её высокой растворимостью. Растворимость орто-кремниевой кислоты в воде достигает 120 ppm [55.], и именно в такой форме кремний содержится в жидкостях, таких как питьевая вода и пиво [56.],[57.].

Чтобы лучше разобраться в вопросе скорости деградации ПК, необходимо прежде всего обратить внимание на физиологическую значимость элементарного Si. Во второй половине XX века были получены данные о том, что Si присутствует в большом количестве в соединительных тканях, костях, а также в эпидермисе [58.]. Исследование 1325 человек показало, что в сыворотке крови человека содержится 11-25 мкг Si/дл, или уровни в диапазоне от 8,5 до 11,1 мкмоль/л [58.]. Исследования также показали, что дефицит Si связан с деформацией костей у крыс и снижением скорости минерализации костей [58.]. Аналогичным образом сообщалось о деформации хрящей и крупных костей у цыплят, которых содержали на диете с дефицитом Si- [59.] Эти сообщения подтверждают, что Si является важным микроэлементом, и обосновывают использование ПК в биомедицинских целях.

Таким образом, можно утверждать, что использование ПК для различных биомедицинских целей опирается на уже установленную роль элементарного Si как

жизненно важного элемента, необходимого для ряда метаболических функций. Однако, в отличие от элементарного Si, признанного за свою относительную биологическую инертность [60.], ПК отличается своей биоразлагаемостью. Биодоступность мезопористых ПК подложек была исследована в условиях теста растворения *in vitro* с использованием буферных растворов (диапазон pH 2-8) для имитации изменения pH в желудочно-кишечном тракте [61.]. Было установлено, что растворение высокопористых подложек, а также последующее высвобождение Si в окружающую среду происходило при постепенном увеличении pH и времени [62.]. Было предположено, что ПК деградирует преимущественно путем гидролиза с выделением ортокремниевой кислоты в окружающую среду.

Также было изучено влияние ПЭГилирования (модификации полиэтиленгликолем или ПЭГ) на скорость деградации НЧ-ПК [63.]. Скорость деградации НЧ-ПК без ПЭГилирования (впоследствии названных частицами APTES PSi из-за их поверхностной модификации (3-аминопропил)триэтоксисиланом) сравнивалась со скоростью деградации частиц с ПЭГилированием при растворении в фосфатно-буферном солевом растворе (ПБС, pH 7.2) и 100% эмбриональной бычьей сыворотке. Среды были выбраны для имитации физиологических условий *in vitro*. Полученные результаты показали, что размер пор служил ограничивающим фактором для деградации не ПЭГилированных APTES-модифицированных НЧ-ПК, причем частицы с меньшим размером пор (10 нм) разрушались медленнее по сравнению с частицами с большим размером пор (30-50 нм). Это показано на рисунке 2.1, где деградация НЧ-ПК определялась по процентному содержанию Si, высвобождаемого в окружающую среду.



**Рисунок. 2.1** Деградация НЧ-ПК с различными размерами пор в ПБС, pH 7.2. [64.] [65.]

Кроме того, было установлено, что ПЭГилирование является лимитирующим фактором для деградации ПЭГилированных НЧ-ПК, причем деградация находится в обратной зависимости от молекулярной массы ПЭГ [66.], [67.]. В данном исследовании

использовались различные молекулы ПЭГ с семью различными молекулярными массами, а именно 245, 333, 509, 686, 1214, 3400 и 5000 Да, и оказалось, что НЧ-ПК, ПЭГилированные молекулами ПЭГ с самой высокой молекулярной массой, демонстрируют самые медленные профили деградации в любой среде. В то время как другие частицы, покрытые ПЭГ, достигали полной деградации в течение 1-2 дней, частицам с ПЭГ 3400, да и ПЭГ 5000 Да потребовалось 4 дня, чтобы достичь полной деградации. Было предположено, что стерические различия гидрофильных цепей ПЭГ могут быть причиной экранирования ядра с НЧ-ПК, препятствуя немедленному проникновению растворителей и, следовательно, замедляя скорость их деградации.

Аналогичным образом были получены данные о скорости деградации окисленных НЧ-ПК наночастиц (получивших название НЧ-ПК -ОН), в которых образцы наночастиц были сформированы четырьмя различными способами путем включения четырех уникальных поверхностных функциональных элементов в качестве «меток»: изотиоцианат флуоресцеина для получения НЧ-ПК-F; метокси-полиэтиленгликоль для получения НЧ-ПК-F- mPEG; N-гидроксисукцинимид для получения НЧ-ПК-F-NHS; и малеимид для получения НЧ-ПК-F-MAL [68.],[69.].

Затем измеряли скорость их деградации в течение 120 минут в следующих биологических растворах: деионизированная вода (DI H<sub>2</sub>O), ПБС, модифицированная среда Дульбекко (DMEM), сыворотка крови человека (HS), лизогенный бульон (LB) и инфузия мозга сердца (BHI).

Было сделано заключение, что присутствие метокси-полиэтиленгликоля (м-ПЭГ) способствует стабильности поверхности наночастиц, модифицированных м-ПЭГ, замедляя тем самым скорость их деградации [70].

Кроме того, было обнаружено, что наночастицы с модификациями без ПЭГ (такие как НЧ-ПК-F или НЧ-ПК-F-MAL) более подвержены деградации и, следовательно, требуют дальнейшей модификации поверхности для повышения их стабильности в водных растворах. Результаты представлены в таблице 2.1.

**Таблица 2.1** Профили деградации окисленных PSi наночастиц [70.].

Среда	Наночастицы с самой высокой скоростью деградации	Наночастицы с самой медленной скоростью деградации
DI H <sub>2</sub> O	НЧ-ПК -F-MAL	НЧ-ПК -F-mPEG
PBS	НЧ-ПК -F-MAL	НЧ-ПК -F-mPEG
HS	НЧ-ПК -F	НЧ-ПК -F-mPEG
DMEM	НЧ-ПК -F-MAL	НЧ-ПК -F-mPEG
LB	НЧ-ПК -F	НЧ-ПК -F-mPEG
BHI	НЧ-ПК -F-MAL	НЧ-ПК -F-mPEG

Чтобы лучше понять характер деградации НЧ-ПК при патологических состояниях, было проведено исследование из эрозии в опухолевом микроокружении [71.]. В этом исследовании авторы вводили флуоресцентно меченые ПК микрочастицы (размер: 2-18 мкм) в опухоли рака молочной железы, находящиеся в тканях молочной железы лабораторных мышей с тяжелым иммунодефицитом, а группа здоровых мышей служила контрольной группой. Была выдвинута гипотеза, что повышение уровня реактивных форм кислорода (ROS) в опухолях (отсутствующих в здоровых тканях молочной железы) способствовало выделению более высокой флуоресценции у подопытных мышей по сравнению с тем, что наблюдалось у здоровых мышей. Это увеличение интенсивности флуоресценции было предположено как результат деградации ПК скаффолда, что приводило к образованию ортокремниевой кислоты и высвобождению молекул флуорофора (молекул гидразидного красителя Texas-red) в окружающую среду. Также было высказано предположение, что кислый pH опухолевой микросреды (pH 6.5) мог способствовать деградации ПК частиц.

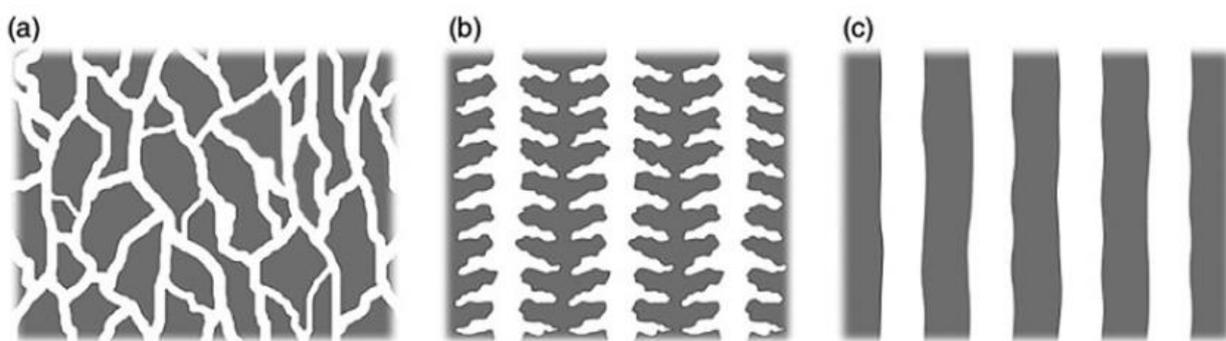
В более широком контексте одним из важнейших результатов изучения поведения деградирующего биоматериала, такого как ПК, является то, что эти данные могут в конечном итоге послужить основанием для разработки дизайна, эффективности и кинетики высвобождения лекарств в системах доставки лекарств, разработанных с использованием этого биоматериала. Такая перспектива особенно актуальна, поскольку своевременное выведение препарата из тканей и органов *in vivo* является жизненно важным фактором, способным повлиять на безопасность систем доставки лекарств.

## 2.1.2 Влияние ортокремниевой кислоты на организм человека

По оценкам, средний взрослый человек потребляет около 20-50 мг элементарного Si в день из зерновых, фруктов (например, бананов), бобовых (например, фасоли и чечевицы), а также из пива [72.]. После попадания в организм и усвоения весь отработанный Si поступает в почки и выводится из организма, где подвергается значительной фильтрации и лишь незначительное количество реабсорбируется почечными канальцами [72.]. Исследование с использованием известной дозы радиоактивного силиката аммония для измерения общего поглощения и выведения с мочой показало, что 36 % принятой внутрь дозы Si было поглощено и полностью выведено с мочой в течение 48 часов [72.]. Скорость почечного клиренса Si, как сообщается, находится в высоком диапазоне 82-96 мл/мин, что свидетельствует о высокой способности почек к выведению Si [73.].

### 2.1.3 Связь между пористостью нанокремния и биосовместимостью/биоразлагаемостью

Пористые материалы могут быть классифицированы как микропористые, мезопористые и макропористые, согласно Международному союзу теоретической и прикладной химии (IUPAC). В основе этой классификации лежит геометрия пор, а именно размер пор и расстояние между ними [74.]. Таким образом, микропоры, мезопоры и макропоры в целом классифицируются как поры следующих диаметров: <2 нм, от 2 до 50 нм и >50 нм, соответственно. Некоторые другие характеристики, важные для выяснения морфологии пор (см. рисунок 2.2), включают параметры ветвления, ориентацию пор, ориентацию ветвей, толщину слоя и общую пористость.



**Рисунок. 2.2** Морфология пор, которые наблюдаются в материалах на основе ПК. (А), (В) и (С) представляют губкообразные, ветвящиеся и перпендикулярные поры соответственно [74.].

Было обнаружено, что размер пор и общая пористость материалов ПК напрямую влияют на их биоактивность и поведение при растворении в смоделированных жидкостях организма. Наблюдается закономерность, что биоактивность увеличивается с ростом пористости. Так, материалы ПК с низкой пористостью проявляют биоинертность, материалы с пористостью менее 70 %, как сообщается, не обладают биоактивностью, а материалы с пористостью более 70 % растворяются во всех моделируемых жидкостях организма, за исключением желудочной [74.].

Однако важно помнить, что смоделированные жидкости организма имеют различные значения pH, поэтому pH окружающей среды также может влиять на поведение ПК материалов при растворении. Сообщалось, что растворение пленок ПК средней (62 %) и высокой (80 %) пористости увеличивается с ростом pH, причем в щелочных условиях (pH=8) наблюдается более быстрое растворение по сравнению с кислыми условиями (pH=6) [75.].

Также было отмечено, что температура влияет на поведение растворения: при более высокой температуре 37°C растворение пленок средней пористости увеличивалось в три раза, а пленок высокой пористости - в два раза, причем этот эффект отсутствовал, когда процесс смешивания проводился при 25°C [76.]. Эти результаты показали, что поведение ПК при растворении действительно является многомерным процессом, и поэтому необходимо учитывать различные переменные, влияющие на этот процесс.

Кроме того, биоразлагаемость ПК уменьшается с увеличением размера пор, при этом макропористый Si является биоинертным, а микропористый и мезопористый ПК демонстрируют медленное или быстрое биоразложение. Размер пор также влияет на клиренс *in vivo*, поскольку НЧ-ПК с большим размером пор в диапазоне 80-120 нм попадают в опухоли (которые получают питательные вещества через новообразованные кровеносные капилляры с аномально увеличенными фенестрациями) и, как следствие, могут избежать быстрого почечного клиренса [77.].

## **2.2. Цитотоксичность**

### **2.2.1 Цитотоксичность наноматериалов на основе пористого кремния**

Исследования цитотоксичности направлены на изучение одного или нескольких следующих аспектов: остаются ли клеточные линии жизнеспособными в присутствии биоматериала, сохраняют ли они способность к дифференциации и пролиферации, а также

на изучение любых изменений в их морфологии или метаболизме, которые происходят после взаимодействия с биоматериалом [78.].

Поскольку для сохранения стабильности НЧ-ПК должны быть поверхностно модифицированы, интересно отметить, что частицы могут сильно различаться по способу взаимодействия с клетками, так же как они различаются по химическому составу поверхности и другим свойствам (например, площадь поверхности, поверхностный заряд, форма или размер), даже если они действительно являются продуктами одного и того же исходного компонента (Si) [79.]. Более того, существует гипотеза, что поглощение наночастиц *in vivo* диктуется не только типом клеток, но и свойствами наночастиц [80.]. Таким образом, тестирование иммуногенности или цитотоксичности в масштабах *in vitro* часто включает в себя исследование любых маркеров, свидетельствующих о стимуляции иммунного ответа клеток на материалы на основе ПК, таких как производство ROS, реактивных видов оксида азота (RNOS) или фактора некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) [81.]. С помощью клеток мышинных макрофагов RAW 264.7 была исследована биосовместимость наночастиц термогидрокарбонизированного полисилоксана (THCPSi). Измеряя количество TNF- $\alpha$ , образующегося при взаимодействии наночастиц с макрофагами, определяли степень воспалительной реакции. В этом исследовании [82.] было показано, что наночастицы вызывали меньшую выработку TNF- $\alpha$ , чем микрочастицы, возможно, из-за меньшего размера первых.

## 2.2.2 Связь между размером наночастиц и их цитотоксичностью

### Частицы THC-ПК

Для оценки биосовместимости наночастиц THC-ПК (размеры фракций: 97, 142 и 188 нм; средний диаметр пор: 9 нм; дзета-потенциал: 30 мВ) авторы использовали установленные модели *in vitro* и *in vivo* [83.].

Для того чтобы исследования цитотоксичности были репрезентативными в отношении разнообразных взаимодействий между ПК и живыми клетками, необходимо использовать большое количество клеточных линий *in vitro* для тестирования биосовместимости [84.]. Модели *in vitro*, использованные в данном исследовании, а именно клетки Caco-2 и клетки макрофагов RAW 264.7, являются хорошо зарекомендовавшими себя и воспроизводимыми клеточными моделями. Модель клеток Caco-2 получена из человеческой эпителиальной клеточной линии колоректальной аденокарциномы. Клетки Caco-2 были выбраны для этих исследований потому, что они способны дифференцироваться *in vitro* в монослой, который изображает *in vivo* монослой кишечного

эпителия, через который должны проникать перорально вводимые препараты, чтобы произошла абсорбция [85.]. Таким образом, клетки Сасо-2 являются полезным инструментом для прогнозирования проницаемости и всасывания лекарств *in vivo*. Кроме того, линия клеток макрофагов RAW 264.7 — это линия клеток мышиноного происхождения, используемая для изучения иммунных реакций между клетками и биоматериалом в качестве предиктора реакций *in vivo* [86.].

Также важно признать обоснованность подходов *in vitro*, использованных этими авторами для оценки цитотоксичности и воспаления, вызванного наночастицами ТНС-ПК. Эти подходы включали оценку степени выработки ROS и TNF- $\alpha$ . Биоматериалы могут вызывать иммуногенные и/или воспалительные реакции (острые или хронические) при попадании в ткани хозяина [87.]. Поэтому рекомендуется заранее изучить потенциальные воспалительные реакции, проведя тестирование на уровне *in vitro*.

Результаты этого исследования показали, что независимо от размера (97, 142, 188 нм) или концентрации (15, 50, 100 или 250 мкг/мл) в обеих клеточных линиях наблюдалось постоянное формирование ROS в ответ на введение наночастиц ТНС ПК [88.]. При использовании макрофагов RAW 264.7 наблюдалась статистически значимая разница между TNF- $\alpha$ , продуцируемым низшей (15 мкг/мл) и высшей (250 мкг/мл) концентрациями наночастиц для всех размеров, причем концентрация 250 мкг/мл вызывала выработку большего количества TNF- $\alpha$ . Интересным является тот факт, что выработка TNF- $\alpha$  наночастицами наименьшего размера (97 нм) была в целом выше, чем выработка наночастицами других размеров (142 и 188 нм).

### **Частицы ТО-ПК**

Воспалительная реакция на термически окисленные частицы ПК (ТО-ПК) также была исследована с помощью клеток макрофагов RAW 264.7. Полученные результаты свидетельствуют о перспективе активации макрофагов и последующей воспалительной реакции, прогрессивно возрастающей с увеличением размера частиц. В этом исследовании были получены фракции ПК микрочастиц (размер: 1-10, 10-25 мкм; удельная поверхность: 202 м<sup>2</sup>/г) и наночастиц (размер: 97, 125 и 164 нм; средний дзета-потенциал: 33,67 мВ) [89.]. Затем была исследована биосовместимость этих фракций *in vitro* путем наблюдения за поведением частиц на клетках Сасо-2 и мышинных макрофагах RAW 264.7.

Сообщалось, что наночастицы со средним размером 164 нм вызывали меньший окислительный стресс, поскольку они производили наименьшее количество ROS по сравнению с другими частицами [90.]. Также были изучены другие показатели потенциального окислительного стресса, такие как выработка оксида азота и TNF- $\alpha$ . Из микрочастиц наблюдалось более высокое производство оксида азота и TNF- $\alpha$ , что

указывает на то, что окислительный стресс может прогрессивно нарастать по мере увеличения размера частиц. В попытке подтвердить эти предварительные наблюдения авторы исследовали токсические реакции, вызванные частицами ПК на клетках Caco-2 и макрофагах RAW 264.7, используя флуоресцентный и люминесцентный анализы [91.]. Эти анализы выявили токсичность частиц ПК, причем микрочастицы оказались более токсичными и разрушающими мембраны клеток Caco-2, чем наночастицы, и вызвали последующее снижение метаболической активности клеток.

### **2.3. Пористый кремний для направленного действия на опухоли и визуализации**

За последние несколько десятилетий были проведены многочисленные исследования по применению ПК в биомедицине благодаря его хорошей биосовместимости, биоразлагаемости, уникальной пористой наноструктуре, легкой модификации поверхности и присущей ему фотолюминесценции [92.], [93.]. Известно, что термически окисленный ПК неактивен в биологических системах, а гидратированный ПК был использован для выращивания гидроксиапатита на его поверхности для использования в инженерии костной ткани [94.]. Недавно было обнаружено, что НЧ-ПК растворяются с образованием безвредной кремниевой кислоты при помещении в физиологические условия [95.]. Наноразмерные поры ПК могут удерживать биологически активные молекулы, предотвращая их непреднамеренную денатурацию до тех пор, пока они не будут высвобождены из пор в месте воздействия. Собственная люминесценция ПК позволяет визуализировать очаги заболевания. Кроме того, физические и оптические свойства ПК можно легко регулировать с помощью процесса электрохимического травления, контролируя размер и пористость пор.

Исследователи разработали частицы ПК, которые могут циркулировать в кровотоке и прикрепляться к опухолям [96.]. Поверхность НЧ-ПК может быть покрыта несколькими таргетными молекулами для достижения эффективного мультиспецифического взаимодействия между прикрепленными таргетными лигандами и белковыми рецепторами на опухолевых клетках. Оптические свойства НЧ-ПК в ближней инфракрасной области (NIR) позволяют получать изображения опухолей *in vivo* на самых ранних стадиях их развития.

## 2.4. Пористый кремний в фотодинамической и фототермической терапии

Терапевтический эффект света известен уже тысячи лет. Фототерапия, или использование света для лечения заболеваний, была разработана Нильсом Райбергом Финсеном, который получил Нобелевскую премию за изобретение светового лечения туберкулеза кожи (*lupus vulgaris*) в 1903 году. Фототерапию обычно разделяют на фототермическую (ФТТ) и фотодинамическую (ФДТ). В последние годы фототриггерные методы лечения рака привлекают огромное внимание благодаря легко фокусирующимся и регулируемым свойствам облученного света, которые позволяют проводить локализованное лечение с неинвазивными, прямыми и высокоточными показателями [97.]. При ФТТ происходит неизлучательное преобразование световой энергии в тепловую. При использовании обычной гипертермии создается температурный градиент с максимумом на поверхности тела, а большая часть энергии рассеивается в здоровых тканях, расположенных на пути внешнего излучения. Поэтому в ФТТ широко используются фототермопреобразующие агенты (ФТП), которые способны собирать световую энергию и преобразовывать ее в тепло, повышая температуру окружающей среды и вызывая терапевтический эффект. Для достижения глубокого проникновения в ткани и минимизации нагрева нецелевых тканей обычно используется электромагнитное излучение ближнего инфракрасного (NIR, 650-900 нм) диапазона [98.]. Идеальные ФТП должны обладать сильным поглощением в тканепрозрачной ближней ИК-области, высокой эффективностью фототермического преобразования и целевым накоплением в опухолях. На сегодняшний день широко изучаются различные фототермические терапевтические наноагенты, включая наноматериалы из благородных и переходных металлов, наноуглероды, органические наноструктуры и т. д. [99.], [100.].

ФДТ – это форма фототерапии, при которой используется свет и вещество – фотосенсибилизаторы (ФС), которые реагируют с молекулярным кислородом и превращают его в реактивные формы кислорода (ROS), вызывая гибель клеток в результате локального окислительного стресса [101.]. При фотовозбуждении ФС могут возникать различные ROS: за счет переноса энергии кислород может переходить из основного триплетного состояния в возбужденное синглетное состояние ( $^1O_2$ ); также может происходить перенос электронов с образованием супероксидного аниона  $\delta O_2^-$ , пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) и гидроксильного радикала ( $HO\cdot$ ) [102.]. Несколько ФДТ в настоящее время одобрены Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) для лечения некоторых видов рака или предраковых состояний.

Однако ФДТ все еще имеет ряд ограничений, включая недостаточную эффективность, ограниченное проникновение видимого света, низкую селективность и относительно высокую токсичность ФС в темноте и т. д. [88]. Эти ограничения могут быть частично устранены путем использования наноструктурированных материалов в качестве ФС или наноносителей молекул ФС.

Использование наноструктур ПК в качестве ФТП в ФДТ или ФС в ФДТ имеет неоспоримые преимущества, поскольку этот материал сочетает в себе уникальные физические свойства низкоразмерных полупроводников и биологически безопасную природу. Наиболее широко распространенными методами получения НЧ-ПК в виде порошков или суспензий являются ультразвуковая фрагментация или механическое измельчение пленок ПК [103.]. Такие пленки состоят из пересекающихся нанокристаллов Si и пор и имеют настраиваемую пористость (20-95 %), размеры пор (1.5-50 нм) и площадь поверхности (100-1125 м<sup>2</sup>/г), которые зависят от условий травления кристаллического Si [95.]. НЧ-ПК характеризуются высокой биосовместимостью и биоразлагаемостью [103.]. Скорость биоразложения наночастиц также можно регулировать различными методами обработки поверхности и сушки. В результате квантово-размерного эффекта в небольших нанокристаллах Si с размерами 2-7 нм, НЧ-ПК проявляют фотолюминесцентные (ФЛ) свойства [104.]. Такие фотолюминесцентные НЧ-ПК обладают широким спектром возбуждения, что является значительным преимуществом перед широко используемыми флуоресцентными красителями, и могут быть распознаны внутри клеток и тканей *in vitro* и *in vivo* стандартными люминесцентными методами [105.]. методом когерентной антистоксовой рамановской спектроскопии (CARS) магнитно-резонансная томография (МРТ) [107.], [108.] и др, и использованы для диагностики рака. Высокая пористость и развитая площадь поверхности, а также легкость модификации поверхности делают эти наночастицы отличными носителями для доставки лекарств [109.]. Низкая токсичность незаполненных НЧ-ПК позволяет загружать в них различные количества лекарств, что открывает возможность контролируемой активации апоптоза или некроза в раковых клетках, что крайне важно для успеха применяемых методов лечения [110.].

## 2.5. Биосовместимые биodeградируемые наночастицы пористого кремния в терапии

В 1995 г. британский ученый Ли Кэнам впервые продемонстрировал свойства биосовместимости ПК [66.]. Позднее была выявлена способность ПК биodeградируемости – растворению при взаимодействии с биологическими жидкостями и при введении в живой организм [111.]. Все вышеперечисленные свойства легли в основу применения наноструктурированного кремния в медицине для диагностики и терапии различных заболеваний.

Термин биосовместимость определен в литературе как способность биоматериала выполнять свои функции, требуемые в рамках терапии, не вызывая нежелательных локальных или системных реакций у пациента, и создавая наиболее подходящий благоприятный клеточный или тканевый ответ. Исследованию биосовместимости ПК и НЧ-ПК посвящено большое количество трудов. В одной из основополагающих работ в этой области [105.] было показано, что на поверхности пленок ПК наблюдались образование и рост кристаллов гидроксиапатита, уникального материала, применяемого в медицине в качестве биodeградируемого заместителя костной ткани. В работе [105.] было обнаружено, при введении в мозг крысы ПК в качестве потенциального нейронного биосенсора, происходит его иннервация нейронами.

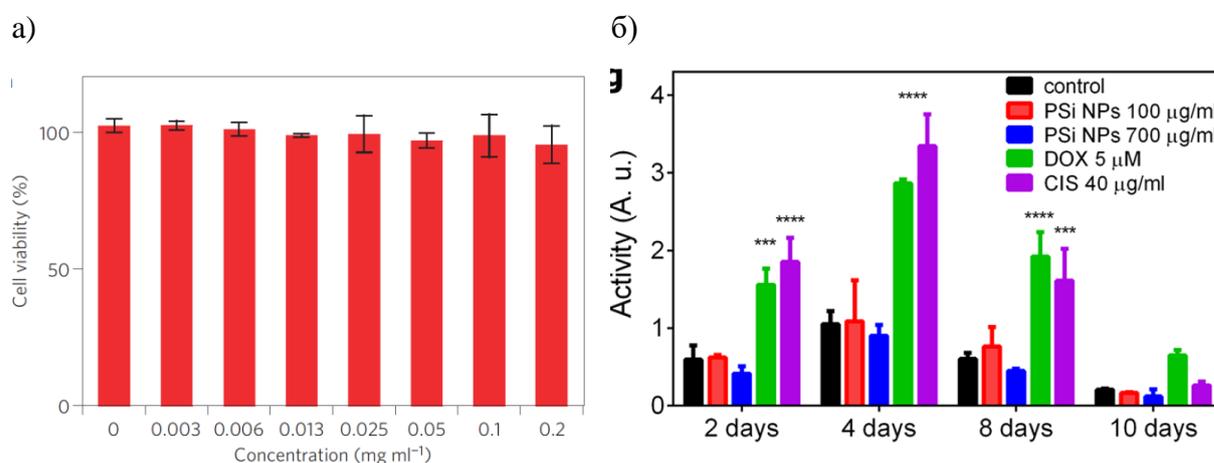
Токсичность наноматериалов на основе кремния может быть обусловлена различными факторами, среди которых размер частиц и химический состав поверхности, способность генерировать активные формы кислорода (АФК). В работе [106.] исследовалась генерация активных форм кислорода кремниевыми наночастицами в культурах клеток. Наибольшей активностью обладали неокисленные образцы пористого кремния, в то время как окисленные наночастицы были практически инертны. Множество работ посвящено изучению влияния размера частиц пористого кремния на их токсичность. Потеря метаболической активности клеток Caco-2 наблюдалась у частиц размером от 1,2 до 25 мкм. Однако частицы размером менее 1 мкм не вызывали каких-либо цитотоксических эффектов у эндотелиальных клеток [107.].

Показано, что источниками токсичности НЧ-ПК являются силаны ( $\text{SiH}_4$ ), основой для образования которых служат соединения на поверхности пористого кремния типа  $\text{Si}-\text{H}$ ,  $\text{SiH}_2$  и  $\text{SiH}_3$ , и конечные продукты биоразложения кремния – кремниевая кислота и ортосиликатионы, однако последние представляют опасность только при высоких концентрациях [108.]. Для достижения реализуемости биомедицинских применений ПК и НЧ-ПК их поверхность обычно окисляют. В процессе окисления соединения Si с водородом

замещаются на соединения с кислородом, что приводит к появлению гидрофильных свойств у НЧ-ПК и образованию слоя оксида на его поверхности. Такие изменения превращают НЧ-ПК в удобное средство для взаимодействия с лекарствами, растворенными в воде или физрастворе [109.].

Подобрав вышеперечисленные параметры в нужном диапазоне и осуществив соответствующую обработку поверхности ПК для конкретной задачи, можно добиться крайне низкой цитотоксичности НЧ-ПК.

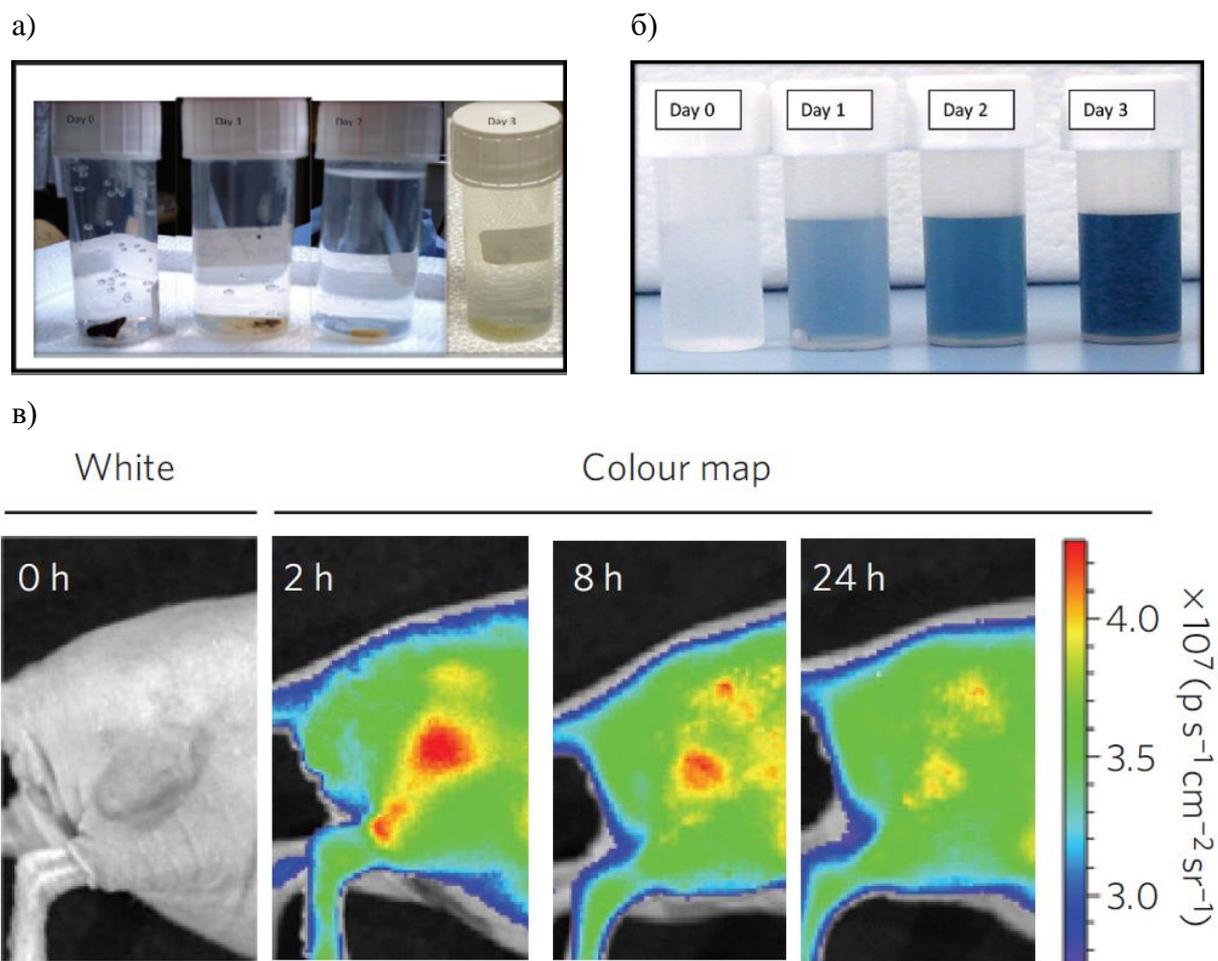
Так, в работе [110.] показана крайне низкая цитотоксичность модифицированных декстраном НЧ-ПК *in vitro* после 48 ч инкубации с клетками HeLa (рис. 2.3а). А в работе [111.] продемонстрировано отсутствие цитотоксичности НЧ-ПК вплоть до концентраций 0.7 мг/мл при продолжительном, до 10 дней инкубации с клетками НСТ116 (рис. 2.3б).



**Рисунок 2.3.** *In vitro* цитотоксичность НЧ-ПК после 48 ч инкубации с клетками HeLa (а) [[109.]]. *In vitro* цитотоксичность НЧ-ПК, взятых в концентрации 0.1 и 0.7 мг/мл при продолжительной, до 10 дней инкубации с клетками НСТ116. В качестве контроля токсичности использовали даксорубин и цисплатин [111.].

В настоящее время в литературе существуют четыре термина, которые означают, что материал со временем исчезнет после введения в живой организм, а именно: биodeградация, биоэрозия, биоабсорбция и биосорбция [106.]. Ввиду того, что согласованных различий не существует, в текущей работе применительно к НЧ-ПК используется термин биodeградация, широко употребляемый в статьях многих ведущих мировых лабораторий, изучающих ПК и НЧ-ПК. Впервые в 1995 году было продемонстрировано растворение пленок мезопористого кремния, сопровождающееся релизом кремниевой кислоты, которую смогли определить при ее реакции с молибденом (рис. 2.4 а,б). Позднее была проведена *in vivo* демонстрация биodeградации НЧ-ПК, определяемой по тушению их ФЛ наночастиц

после их внутривенного введения и локализации в привитой опухоли у опытных мышей (рис. 2.4 в) [112].



**Рисунок 2.4.** Растворение пленки пористого кремния в ПБС (а), которое сопровождалось релизом кремниевой кислоты, дающей синий цвет суспензии при взаимодействии с солью молибдена (б). Демонстрация биодegradации НЧ-ПК *in vivo* после их внутривенного введения и локализации в опухоли у опытных мышей [113].

Процесс деградации неокисленного кремния в водных растворах принято описывать в два этапа:



На первом этапе происходит реакция окисления атома Si, в результате которой образуется оксидная фаза на поверхности нанокристаллов нк-Si. Вторым этапом является гидролиз оксидной фазы. Продуктом второго этапа является ортокремниевая кислота, естественная биодоступная форма кремния, которая может диффундировать в тканях человека и выводиться из организма через почки.

На кинетику биодegradации влияют такие физические параметры, как площадь поверхности, объемная доля и размер пор [112.]. Путем модификации поверхности НЧ-ПК можно придать им гидрофильность, изменить их устойчивость к гидролизу [106.]. Следует отметить, что скорость растворения оксидной фазы зависит еще и от окружающей жидкой среды, а именно ее показателя рН. Данная зависимость объясняется фактом того, что реакция гидролиза диоксида кремния катализируется ионом ОН-, таким образом, скорость растворения материала увеличивается с ростом показателя рН.

## **2.6. Наночастицы пористого кремния как наноконтейнеры для доставки лекарств**

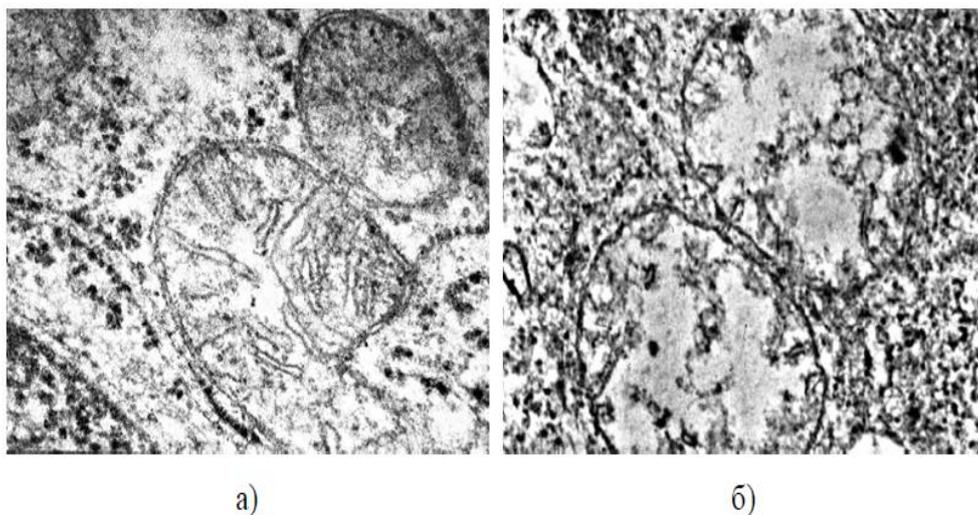
НЧ-ПК показывают большой потенциал использования в качестве эффективной системы доставки лекарственных средств [110.], [111.]. Пористость наночастиц может достигать до 95% их объема [112.]. Важной особенностью является возможность адаптировать также и химический состав поверхности НЧ-ПК в зависимости от поставленных задач [113.]. Ключевую роль при этом играют морфологические особенности наночастиц: контролируя размер наночастиц и размеры их пор можно управлять емкостью загрузки наноконтейнера, а именно количеством и потенциальными размерами молекул загружаемых лекарств. НЧ-ПК могут являться носителями гидрофильных или гидрофобных молекул. Изменяя методику обработки поверхности наночастиц, размер пор, можно контролировать скорость высвобождения лекарства, продлевая срок его эффективного использования.

## **2.7. Наночастицы пористого кремния – сенсibilизаторы терапевтического ультразвука (соносенсibilизаторы)**

Терапевтический ультразвук — это технология, использующая звуковые волны для создания целенаправленных биологических изменений в тканях. Существует два основных класса терапевтического ультразвука: низкоинтенсивный (0.125 – 3 Вт/см<sup>2</sup>) и высокоинтенсивный ( $\geq 5$  Вт/см<sup>2</sup>). Низкоинтенсивный ультразвук применяется для стимуляции физиологических процессов, таких как заживление или транспорт лекарственных средств через кожу, в то время как высокоинтенсивный используется для избирательного разрушения тканей. В зависимости от цели и типа воздействия, ультразвук может передаваться непосредственно в ткани через контактный гель или посредством

специальных волноводов и инструментов, которые направляют звуковую энергию на заданный участок ткани для достижения терапевтического эффекта.

Терапевтическое действие ультразвука обусловлено его поглощением тканями организма. При этом взаимодействии энергия ультразвука в основном трансформируется в тепло, энергию поля сдвиговых напряжений стационарных акустических течений, а также, в небольшой степени, расходуется на образование и активизацию газовых или паровых пузырьков (кавитация) и, для больших полимерных молекул, на нетепловые специфические эффекты. Каждый из приведённых путей трансформации ультразвуковой энергии в той или иной степени может быть использован для получения терапевтических эффектов [114.]. В результате локального выделения тепла в тканях активируются обменные процессы, ускоряется рассасывание инфильтратов, увеличивается проницаемость клеточных мембран [115.]. Последнее обстоятельство облегчает поступление в клетку лекарственных веществ. Акустические течения также интенсифицируют обменные процессы и облегчают лекарственный транспорт в очаг поражения (рис. 2.5).



**Рисунок. 2.5** Электронные микрофотографии митохондрий клеток опухоли меланомы В16: а) контроль; б) обработка ультразвуком в присутствии наночастиц терафтала [115.].

Кавитационные явления приводят к трудно регулируемым эффектам главным образом деструктивного характера. Они также могут быть использованы в терапевтических целях, если удастся их инициировать и локализовать в подлежащем разрушению органе или его части. Принципиальной трудностью использования ультразвука в терапевтических целях является то, что весьма ограничена возможность отдельно управлять интенсивностью того или иного нужного фактора. Частичным решением этой проблемы

является модифицирование объекта, подвергающегося воздействию акустического поля, таким образом, чтобы существенно повысить его чувствительность к необходимому для решения конкретной задачи фактору. При действии ультразвука на биологические системы, модифицированные наночастицами и их агрегатами, происходит дополнительное выделение акустической энергии в областях их локализации [115.]. Это происходит благодаря тому, что наночастицы, отличаясь физико-химическими свойствами от биотканей, существенно меняют отклик системы на ультразвуковое воздействие. Они локально изменяют коэффициент поглощения ультразвука, являясь своеобразными преобразователями акустической энергии. При этом такие включения обеспечивают локализацию акустической энергии в объёме, размер которого определяется главным образом размерами наночастиц, и может быть существенно меньше масштаба длины волны ультразвука. Если местами локализации наночастиц являются опухолевые клетки, то дополнительное выделение в этих местах акустической энергии способно обеспечить гибель опухоли или замедлить её рост.

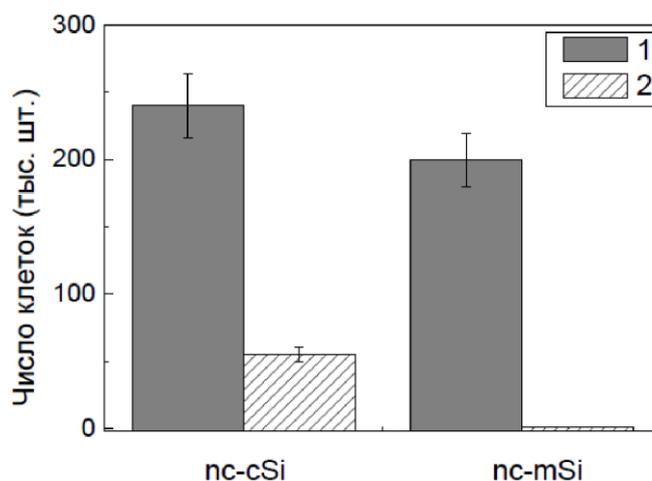
Для сонодинамической терапии в настоящее время разрабатываются различные типы наночастиц в качестве соносенсибилизаторов, включая органические, неорганические и липосомные. Органические соносенсибилизаторы, такие как порфирины и фталоцианины, обладают высокой реактивностью и генерируют активные формы кислорода под воздействием УЗ, но склонны к фотодеградации, что ограничивает их стабильность. Неорганические частицы, например,  $TiO_2$  и  $ZnO$ , демонстрируют высокую стабильность и возможность многократного УЗ активирования, но могут вызывать долговременную токсичность из-за низкой биodeградации. Липосомы, обладающие отличной биосовместимостью, могут инкапсулировать терапевтические агенты для точного высвобождения под воздействием ультразвука, но их стабильность ограничена в биологических жидкостях[116.].

Первые *in vitro* эксперименты по исследованию соносенсибилизационных свойств НЧ-ПК показано Осминкиной и др. в работе [117.]. УЗ-воздействие без и в присутствии НЧ-ПК различной пористости проводилось в ультразвуковой ванне УЗВ6-0,063/37 с рабочей частотой 37 кГц. Влияние совместного действия НЧ-ПК и УЗИ на пролиферацию клеток было выполнено для клеток Нер 2. В экспериментах для контрольной группы (без наночастиц) было установлено, что УЗИ максимальной мощности ( $2 \text{ Вт/см}^2$ ) может приводить к удалению  $30 \pm 5\%$  клеток с поверхности сосуда культивирования. Однако замечено, что как оставшиеся на поверхности сосуда, так и переведённые в объём клетки после помещения в чашки Петри демонстрировали сохранение жизнеспособности и

активно пролиферировали. УЗИ-воздействие в присутствии кремниевых наночастиц приводило к существенному уменьшению численности клеток. Так, в опытах с наночастицами, полученными измельчением кристаллического кремния (nc-cSi) число клеток после УЗИ-воздействия максимальной интенсивности в течение 30 мин уменьшалось до  $0.25 \pm 0.05$  (то есть в 4 раза) по отношению к контрольной группе (рис. 2.6).

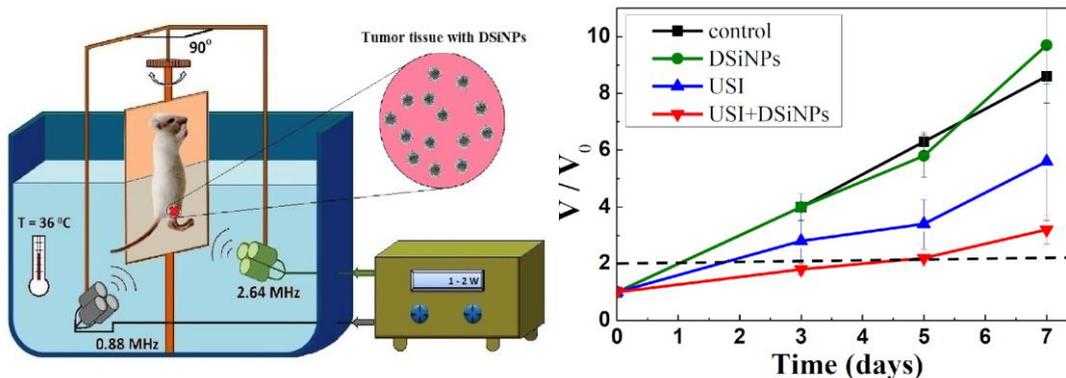
При использовании более мелких пористых наночастиц, полученных измельчением пленок пористого кремния (nc-mSi) число клеток после УЗИ-воздействия уменьшилось ниже уровня обнаружения. Представленные выше результаты указывают на то, что кремниевые наночастицы в условиях УЗИ-облучения могут вызывать повреждения в клетках [116]. Вероятнее всего, наночастицы служат центрами возникновения кавитационных пузырьков, приводящих к разрушению клеток.

Были проведены *in vivo* эксперименты, демонстрирующие замедление роста раковой опухоли примерно в 4 раза после сочетанного воздействия на нее покрытых декстраном



**Рисунок 2.6** Число клеток Нер 2 после воздействия УЗИ (30 мин, максимальная интенсивность) в присутствии непористых (столбцы 1) и пористых (столбцы 2) НЧ-К с концентрацией 1 мг/мл [117.]

пКНЧ и терапевтического УЗИ (2 МГц, 1 Вт/см<sup>2</sup>). Вместе с тем стоит отметить, что сами по себе пКНЧ наночастицы не оказывали никакого влияния на рост опухоли, в то время как обработка УЗИ приводила к замедлению роста раковой опухоли примерно в 2 раза. (рис. 2.7).



**Рисунок 2.7** Схема проведения экспериментов in-vivo (справа). Динамика роста раковой опухоли в контроле (черная кривая), после введения НЧ-ПК (зеленая кривая), после обработки УЗИ (синяя кривая), и после сочетанного воздействия НЧ-ПК и УЗИ (красная кривая) [117.].

Полученные в работе [118.] данные указывают на перспективность использования кремниевых наночастиц как соносенсибилизаторов для терапии рака.

## Выводы из литературного обзора

В литературном обзоре рассмотрены методы синтеза, структурные и физико-химические свойства пористых наноматериалов кремния, включая электрохимическое травление и металл-стимулированное химическое травление. Эти методы позволяют создавать наноструктуры кремния с различной пористостью и морфологией, что определяет их использование в биомедицинских целях. Электрохимическое травление кристаллического кремния позволяет получать пористые пленки с контролируруемыми параметрами, такими как плотность тока и концентрация используемых растворов. МСХТ, используется для создания кремниевых нанонитей с высокой степенью однородности и упорядоченности на больших площадях, что делает его перспективным для синтеза структур с нужными характеристиками.

Исследования показали, что пористость НЧ-ПК играет ключевую роль в определении их физико-химических свойств и, следовательно, биомедицинского потенциала. Более высокая пористость способствует увеличению площади поверхности и улучшению взаимодействия с окружающей средой. При этом размер пор влияет на их биодegradацию:

микропористые и мезопористые наночастицы быстрее разлагаются в физиологических растворах, выделяя ортокремниевую кислоту, которая безопасно выводится из организма. Скорость деградации наночастиц можно регулировать поверхностной модификацией, например, путем ПЭГилирования, что позволяет продлить время действия наночастиц в организме.

Важным аспектом является цитотоксичность наночастиц кремния. Она зависит от их размера, морфологии и поверхности. Исследования показали, что наночастицы с модифицированной поверхностью, такие как термически окисленные или покрытые ПЭГ, обладают меньшей цитотоксичностью, что делает их более перспективными для использования в терапевтических системах доставки лекарств и наномедицины.

Пористый кремний также рассматривается в контексте применения в фотодинамической и фототермической терапии. Наночастицы ПК могут выступать в роли сенситизаторов ультразвука, способствуя эффективному уничтожению клеток за счет локализации кавитационных процессов. Это делает ПК перспективным для разработки новых методов лечения рака.

Таким образом, пористый кремний и его наночастицы обладают значительным потенциалом для применения в биомедицине благодаря своей регулируемой структуре, биodeградируемости и возможности функционализации поверхности. Они могут использоваться в качестве систем доставки лекарств, терапевтических агентов и сенситизаторов, что открывает перспективы для их дальнейшего изучения и применения в терапии различных заболеваний.

## Экспериментальные результаты и их обсуждение

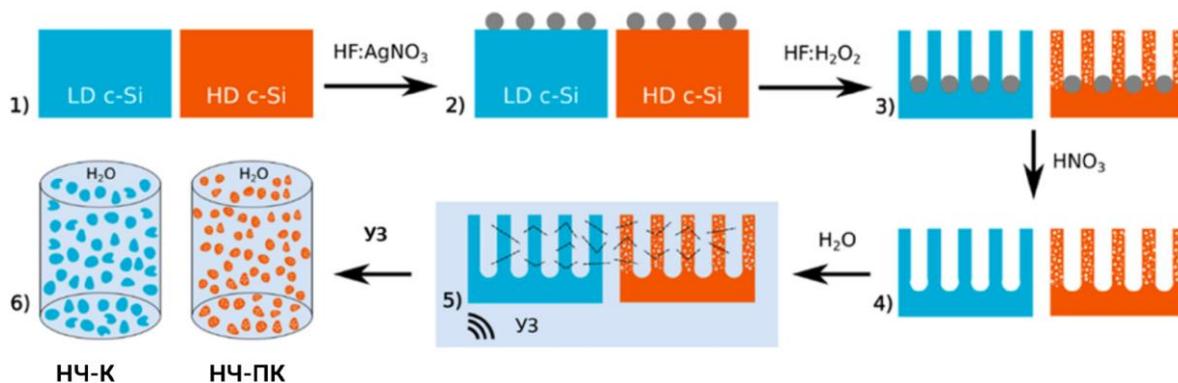
### Глава 3. Разработка методов получения наночастиц пористого кремния. Исследование структурных и оптических свойств полученных образцов

#### 3.1. Метод получения наночастиц пористого кремния из массивов кремниевых нанонитей. Структурные и оптические свойства полученных образцов

В работе был разработан новый метод получения суспензий наночастиц кремния путем измельчения массивов кремниевых нанонитей. Массивы нанонитей кремния получали методом металл-стимулированного химического травления (МСХТ). На первом этапе метода пластину c-Si (100) погружали в смесь 0,01М AgNO<sub>3</sub> и 5М HF в объемном соотношении 1:1 на 15 секунд. В результате на поверхность c-Si осаждаются наночастицы серебра (Ag). Затем пластину c-Si помещали в смесь 5М HF и 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в объемном соотношении 10:1, где происходил процесс травления. Для того, чтобы удалить наночастицы серебра, образцы погружались в 35% водный раствор азотной кислоты (HNO<sub>3</sub>) на 15 минут. Затем образцы промывали 3 раза дистиллированной водой (Millipore) и сушили при комнатной температуре на воздухе.

Отметим, что МСХТ высоколегированного c-Si с удельным сопротивлением 0,001 Ом\*см приводит к образованию пористых кремниевых нанонитей (ПК-НН), а травление низколегированного c-Si с удельным сопротивлением 1 Ом\*см приводит к образованию непористых кремниевых нанонитей (К-НН).

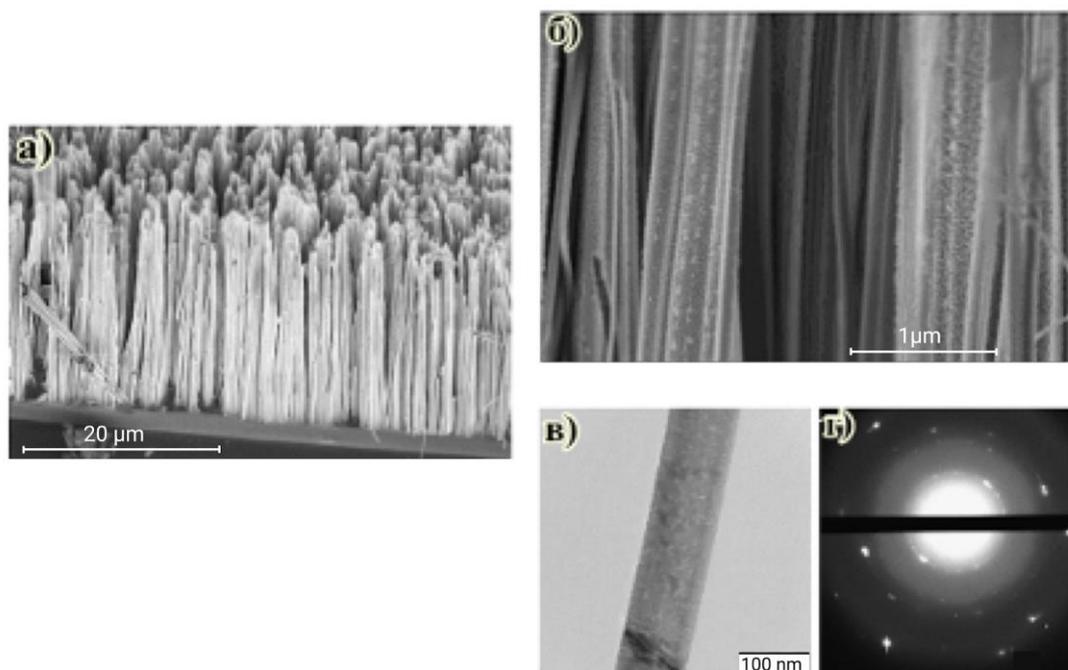
Затем полученные кремниевые пластины с массивами кремниевых нанонитей подвергали УЗ обработке в УЗ-ванне (Elmasonic US bath 37 КГц) в течение 12 ч, в результате которой происходит отрыв нанонитей от подложки и измельчение их до наночастиц. После ультразвукового воздействия полученные растворы наночастиц седиментировались в течение 24 ч или и центрифугировались течение 5 мин при 1300 об/мин для удаления крупных не перемолотых нанонитей, полученный супернатант КНЧ использовали в эксперименте. В результате получали суспензии пористых (НЧ-ПК) и непористых (НЧ-К) наночастиц. Схема процесса получения наночастиц из кремниевых нанонитей представлена на рисунке 3.1.



**Рисунок 3.1** Схема процесса получения непористых (синий) и пористых (оранжевый) наночастиц кремния измельчением массивов пористых и непористых кремниевых нанонитей.

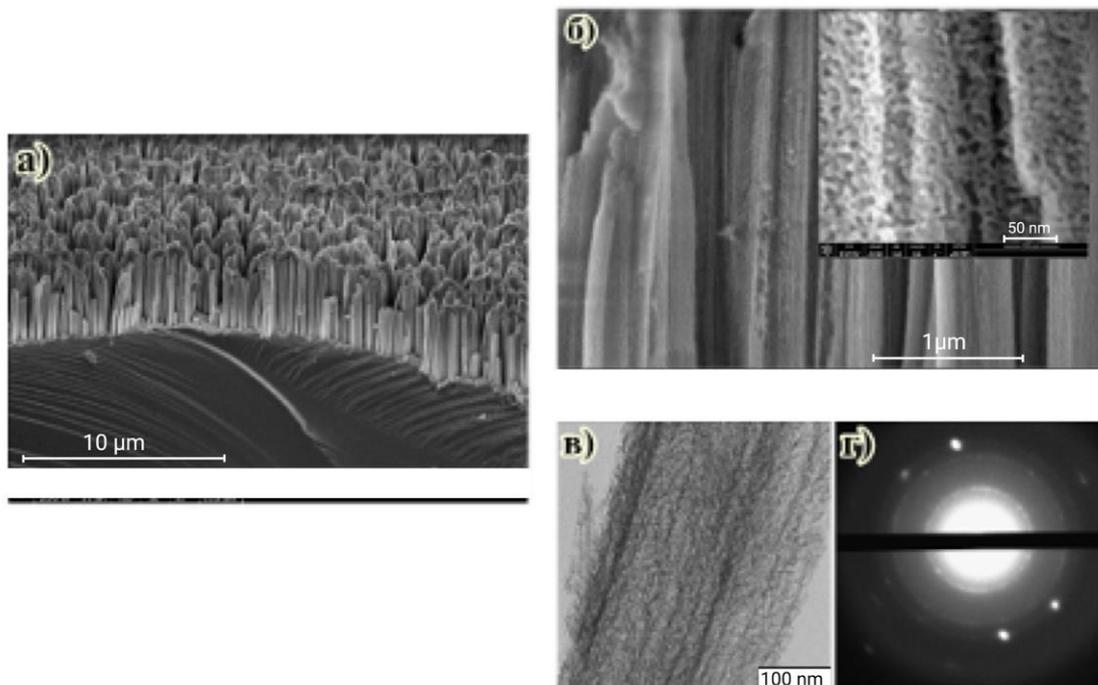
Структурные исследования полученных образцов проводились с использованием сканирующего электронного микроскопа (Carl Zeiss ULTRA 55, FE-SEM) и просвечивающего электронного микроскопа (LEO912 AB OMEGA). Для определения размера и дзета-потенциала (ZP) наночастиц кремния по данным динамического светорассеяния (ДРС) использовался прибор Malvern Zetasizer Nano ZS. Измерение спектров пропускания инфракрасного излучения образцов осуществлялось с использованием ИК-спектрометра с обратным Фурье-преобразованием Bruker IFS 66v/S в спектральном диапазоне  $6000\text{--}400\text{ см}^{-1}$  и разрешением  $2\text{ см}^{-1}$ . Фотолюминесценция (ФЛ) возбуждалась с помощью излучения аргонового лазера с ионами  $\text{Ar}^+$  на длине волны 364 нм (мощность 10 мВт, диаметр пятна 1 мм). Сигнал ФЛ регистрировался с использованием монохроматора с дифракционной решеткой (MS750, SOLAR ТП), оснащенного ПЗС-матрицей.

На рисунке 3.2 представлены микрофотографии сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) К-НН, время МСХТ составляло 20 минут. Видно, что К-НН представляют собой массив вытянутых вдоль кристаллографического направления  $[100]$  нитевидные структуры диаметром 150-350 нм и высотой 10 мкм (рисунок 3.2 а,б). На рисунке 3.2 (в) показан снимок ПЭМ одиночной кремниевой нанонити. Видно, что она имеет однородную непористую структуру. Наличие ярких рефлексов и колец в представленной картине дифракции электронов, полученные в геометрии “на прохождение”, свидетельствует о сохранении нанонитями кристаллической структуры. [34.]



**Рисунок 3.2** Микрофотографии СЭМ образцов К-НН: а) СЭМ бокового склола образца, б) увеличенное изображение СЭМ К-НН, вид сбоку, в) микрофотография ПЭМ единичной нанонити, г) картина электронной дифракции от К-НН.

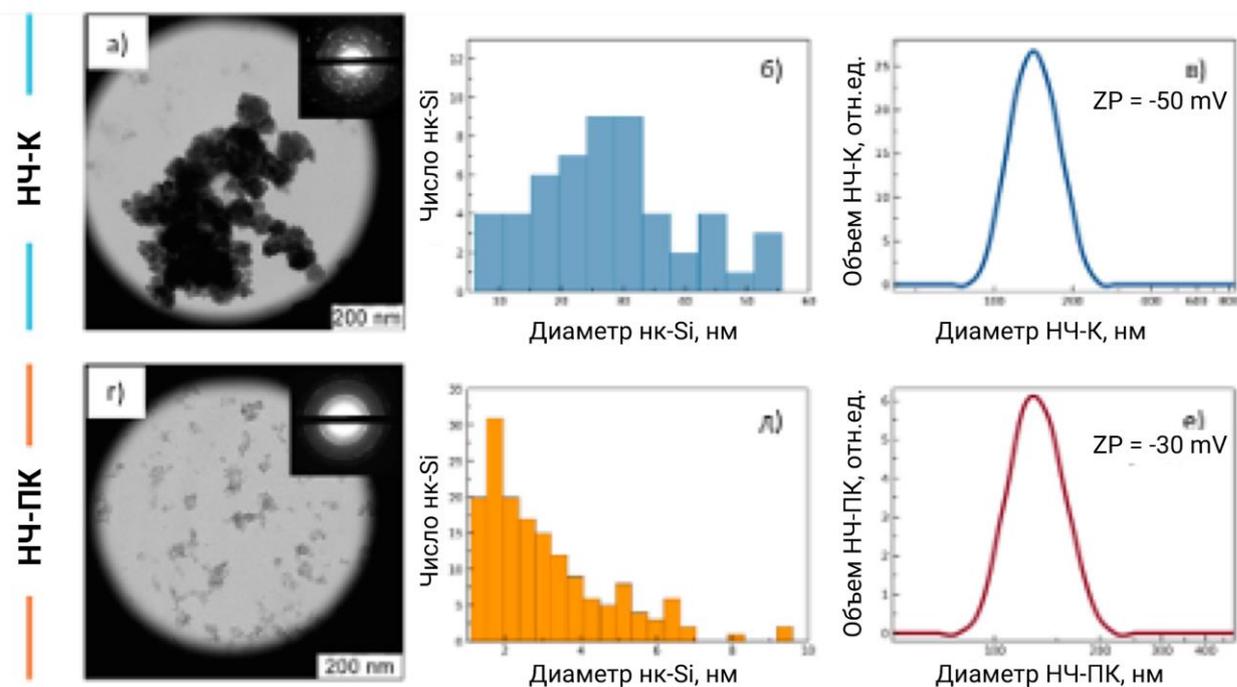
На рисунке 3.3 представлены микрофотографии СЭМ и ПЭМ ПК-НН, время МСХТ 20 минут. Видно, что в результате травления образуется массив вытянутых вдоль кристаллографического направления  $[100]$  нитевидных наноструктур высотой около 5 мкм, диаметром 100-300 нм (рисунок 3.3 а, б). На вставке к рисунку 3.3 б и на ПЭМ микрофотографии на рисунке 3.2 в видно, что полученные нанонити имеют пористую структуру. Картины дифракции электронов, полученные в геометрии “на прохождение”, свидетельствует о наличие в пористом объеме ПК-НН мелких нанокристаллов кремния (нк-Si) [34.].



**Рисунок 3.3** Микрофотографии СЭМ образцов ПК-НН: а) СЭМ бокового скола образца, б) увеличенное изображение СЭМ ПК-НН, вид сбоку, в) микрофотография ПЭМ единичной нанонити, г) картина электронной дифракции от ПК-НН.

Основываясь на данных ПЭМ и СЭМ можно сделать вывод, что образцы нанонитей кремния, полученные на подложке кристаллического кремния с высоким удельным сопротивлением ( $1 \text{ Ом}\cdot\text{см}$ ), обладают непористой структурой, в то время, как образцы, полученные на подложке с более низким удельным сопротивлением ( $0.001 \text{ Ом}\cdot\text{см}$ ) – пористые. Отметим, что пористость образцов может оказывать значительное влияние на их физико-химические и биоактивные свойства.

Исследование структурных свойств НЧ-К и НЧ-ПК, полученных УЗ диспергацией массивов К-НН и ПК-НН, проводилось методами ПЭМ и динамического рассеяния света (ДРС) (рисунок 3.4).

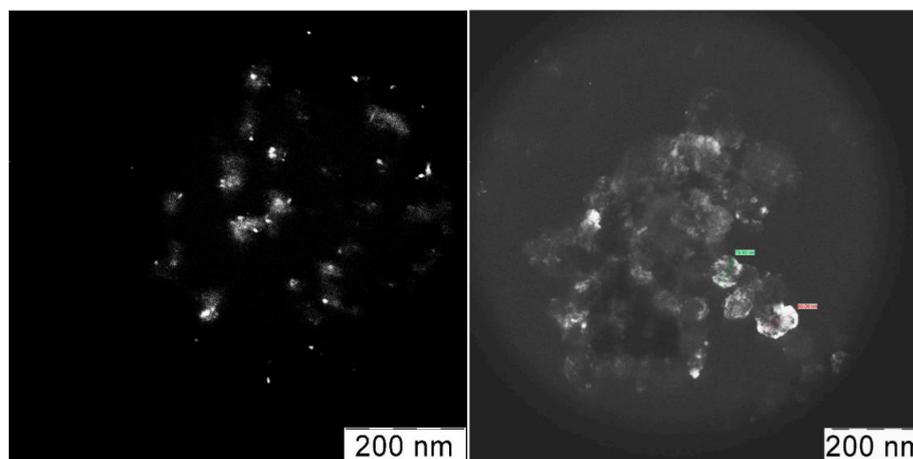


**Рисунок 3.4** Микрофотографии ПЭМ а) НЧ-К и г) НЧ-ПК. На вставках в правых верхних углах ПЭМ изображений представлены соответствующие картины дифракции электронов от наночастиц. Распределения размеров нк-Si в б) НЧ-К и в д) НЧ-ПК, полученные из изображений ПЭМ наночастиц в темном поле. Данные ДРС: распределения гидродинамического диаметра для НЧ-К в) и НЧ-ПК е).

Изображения ПЭМ позволяют оценить типичный размер получаемых наночастиц, который находится в диапазоне от 100 до 300 нм и соответствует измерениям ДРС (рисунок 3.4 в, е). Наночастицы характеризуются отрицательным дзета-потенциалом ( $ZP$ ), который составил  $-50$  и  $-30$  мВ для НЧ-К и НЧ-ПК, соответственно. Такие значения  $ZP$  обуславливают отсутствие тенденции к агрегации частиц в суспензии. Полученные картины дифракции электронов от наночастиц показывают значительную разницу между НЧ-К и НЧ-ПК (вставка к рисунку 3.4 а, б). Непористые НЧ-К демонстрируют ярко выраженные изолированные узкие дифракционные пики, соответствующие небольшому количеству беспорядочно ориентированных относительно больших ( $> 7$  нм) нк-Si, что указывает на непористую структуру образцов. Напротив, НЧ-ПК имеют несколько расширенных концентрированных колец, соответствующих огромному количеству мелких ( $< 5$  нм) нк-Si. Это также указывает на пористую структуру НЧ-ПК, так как диаметр самих наночастиц намного больше, чем размер, составляющих их нк-Si.

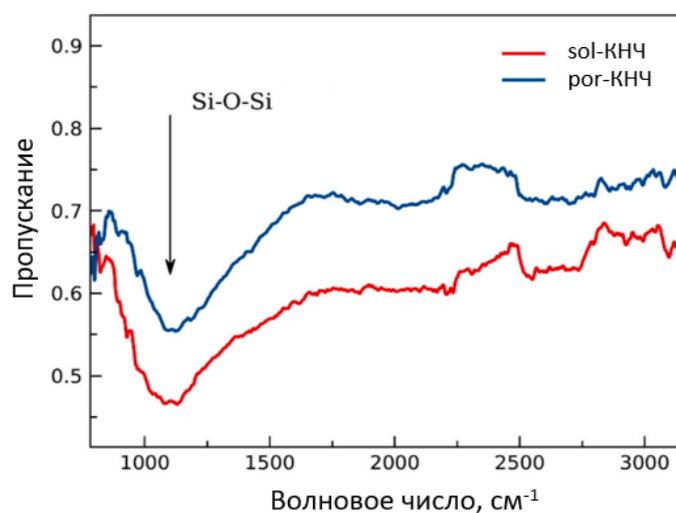
Для расчета распределения размеров нк-Si в полученных наночастицах применялась обработка их темнопольного ПЭМ-изображения (рисунок 3.5) с помощью программы

ImageJ. Средний диаметр нк-Si оказался равным 30 нм для НЧ-К и 3 нм и НЧ-ПК соответственно. Гистограммы распределения размеров нк-Si для НЧ-К и НЧ-ПК, полученные из изображений ПЭМ наночастиц в темном поле, представлены на рисунках 3.5 б, д.



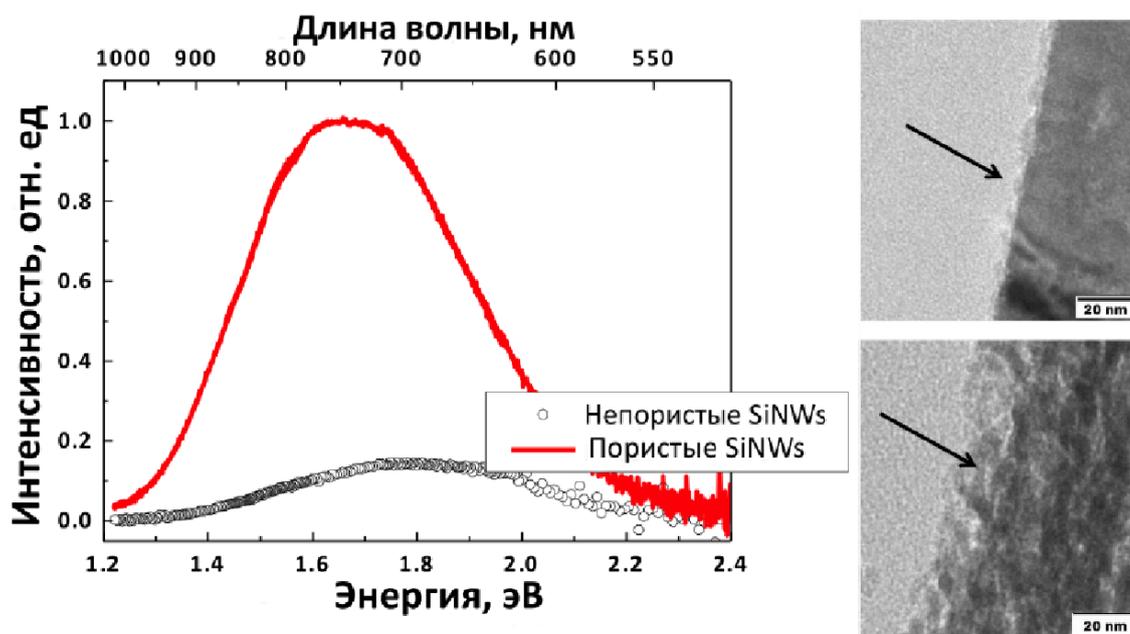
**Рисунок 3.5** Темнопольные ПЭМ-изображения ПК-НЧ (слева) и К-НЧ (справа).

В спектрах ИК-пропускания полученных наночастиц наблюдается заметная широкая полоса Si-O-Si при  $1100\text{ см}^{-1}$ , что обуславливает наличие оксидного слоя на поверхности нк-Si (рисунок 3.6). В основном оксид появляется из-за обработки массивов нанонитей в  $\text{HNO}_3$  для избавления от частиц Ag после процесса МСХТ, а также он возникает при помолё нанонитей до наночастиц. Из-за присутствия оксидного слоя оба образца хорошо диспергируются в водной среде, что обеспечивается их гидрофильными свойствами их поверхности.



**Рисунок 3.6** Спектры пропускания ИК-поглощения порошков К-НЧ и ПК-НЧ, высушенных из их водных суспензий.

На рисунке 3.7 представлены спектры ФЛ массивов К-НН и ПК-НН. Оба образца характеризуется широким спектром ФЛ с максимумами в области длин волн около 680 нм для К-НН и 750 нм для ПК-НН. Причиной ФЛ в обоих случаях является излучательная аннигиляция экситонов, образующихся в кремниевых нанокристаллах малых размеров при их фотовозбуждении (см обзор литературы Глава 1). Такие мелкие нанокристаллы появляются на поверхности непористых К-НН при их химическом травлении и в объеме пористых КНН (см изображения ПЭМ на рисунке 3.7). Широкий спектр ФЛ образцов вызван распределением кремниевых нанокристаллов по размеру. Согласно полученным результатам, большая примерно на порядок интенсивность ФЛ наблюдается у ПК-НН по сравнению с непористыми образцами, что связано с наличием в них большего числа ФЛ нк-Si малых размеров (см. данные ПЭМ на рис.3.4 и 3.5).



**Рисунок 3.7** Спектры К-НН (черные круги) и ПК-НН (красная линия). ПЭМ К-НН (вверху справа) и ПК-НН (внизу справа).

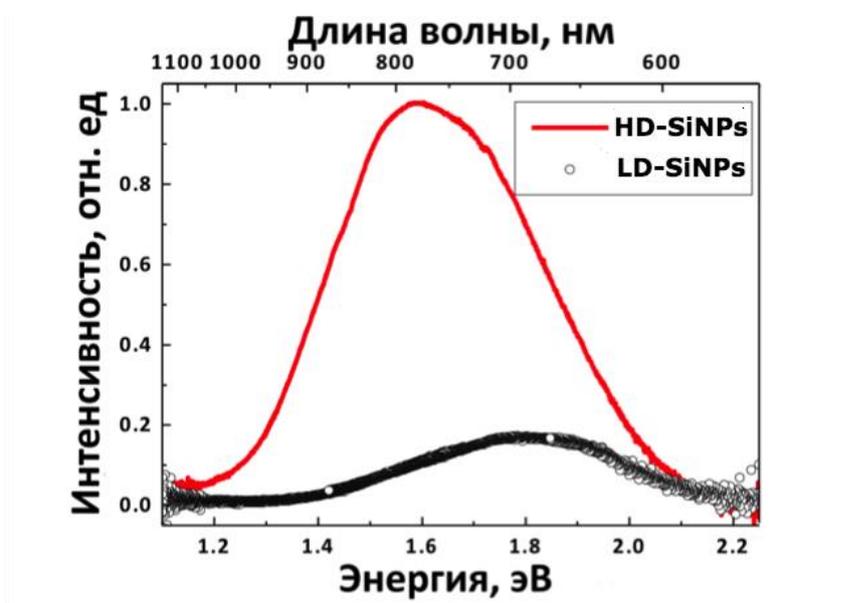
Положение максимума спектра ФЛ,  $E$ , связано со средним размером нк-Si,  $d$ , в соответствии с эмпирической формулой [119.]:

$$E(d) = E_0 + \frac{3.73}{d^{1.39}}, \quad (3.1)$$

где  $E_0$  — ширина запрещенной зоны в c-Si (1.12 эВ). Таким образом, сдвиг максимума спектра в коротковолновую область отражает уменьшение среднего диаметра нк-Si.

Рассчитанный из спектров ФЛ по формуле (3.1) средний диаметр нанокристаллов на поверхности (для непористых) и в объёме (для пористых) нанонитей, составил  $d \approx 2,0$  нм для К-НН, и  $d \approx 2,6$  нм для ПК-НН.

На рисунке 3.8 представлены спектры ФЛ НЧ-К и НЧ-ПК, полученных УЗ измельчением непористых пористых нанонитей.



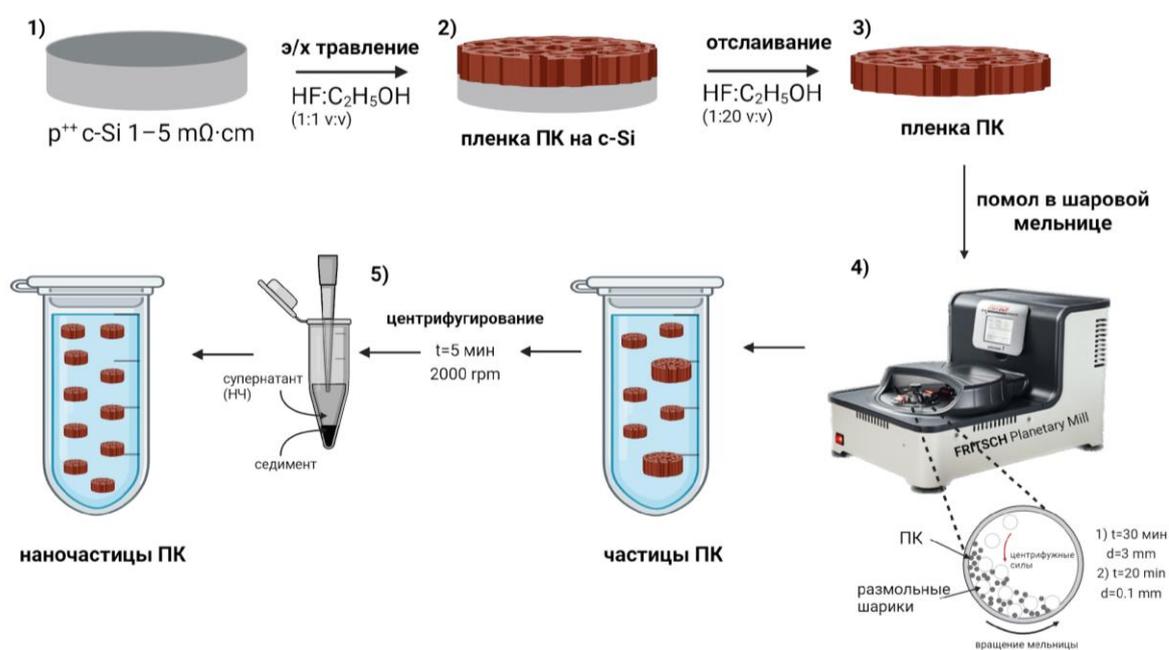
**Рисунок 3.8** Спектры ФЛ водных суспензий НЧ-К (черные круги) и НЧ-ПК (красная линия).

Видно, что форма спектра ФЛ наночастиц схожи с спектрами ФЛ для нанонитей, использовавшихся для их изготовления. Большая интенсивность ФЛ пористых образцов по сравнению с непористыми также объясняется наличием большего количества мелких фотолюминесцирующих нанокристаллов в пористом объеме наночастиц.

### **3.2. Метод получения наночастиц пористого кремния из пленок пористого кремния. Структурные и оптические свойства полученных образцов**

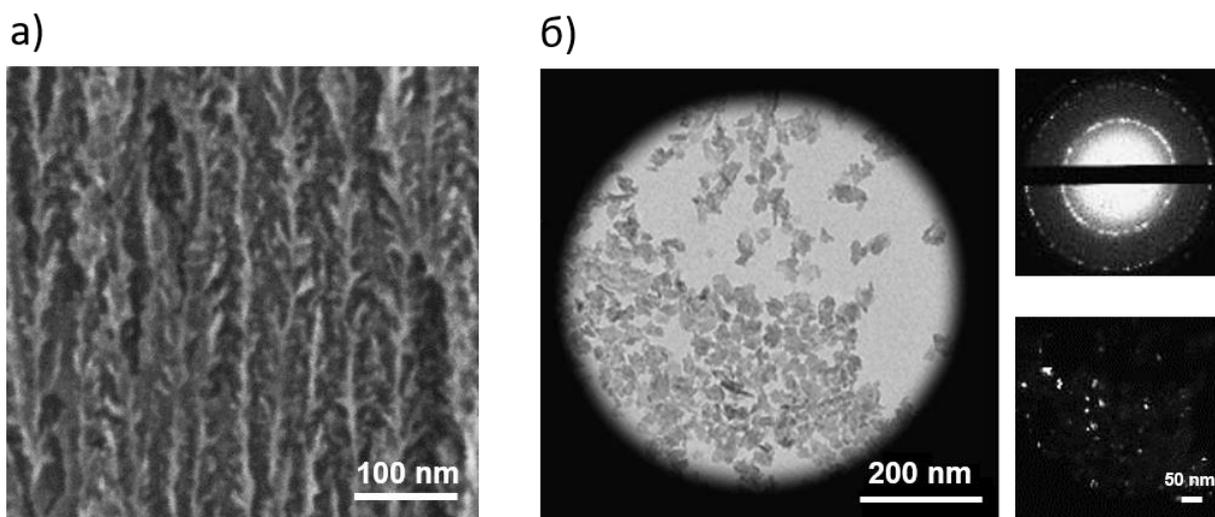
Отработана методика получения коллоидных растворов НЧ-ПК с помощью измельчения пористых кремниевых (ПК) пленок (Рис. 3.9). Пленки ПК формировались стандартным методом электрохимического травления пластин с-Si (100) p++ 1-5 мОм·см в растворе HF(50%):C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH взятом в соотношении 1:1 при плотности тока травления 50 мА/см<sup>2</sup> в течение 1 ч (1). Пленка отслаивалась кратковременным увеличением плотности тока до 600 мА/см<sup>2</sup> (2). Затем пленку ПК промывали 3 раза дистиллированной водой

(Millipore) и сушили при комнатной температуре на воздухе. Для получения водных или спиртовых суспензий НЧ-ПК осуществлялся помол полученных пленок ПК в планетарной мельнице FRITSCH «Pulverisette 7 premium line» в стаканах  $ZrO_2$  в течение 30 минут в присутствии дистиллированной воды или спирта (30 мин  $ZrO_2$  шариками 3 мм, 20 мин  $ZrO_2$  шариками 0.1 мм) (3). После измельчения полученные растворы центрифугировались течение 5 мин при 2000 об/мин для удаления крупных частиц, полученный супернатант НЧ-ПК использовали в эксперименте. Схема процесса получения НЧ-ПК методом измельчения пленок ПК, полученных электрохимическим травлением с-Si, представлена на рисунке 3.9.



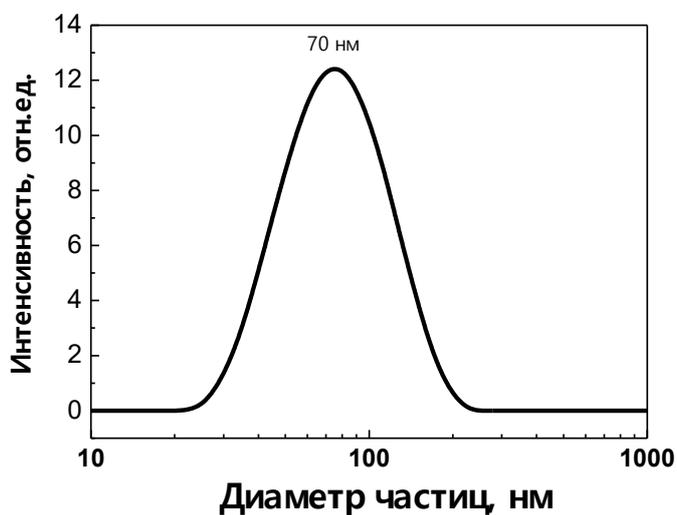
**Рисунок 3.9** Схема процесса получения НЧ-ПК методом измельчения пленок ПК, полученных электрохимическим травлением с-Si.

Изображение поперечного сечения пленки ПК, полученное с помощью СЭМ, показано на рисунке 3.10 а. Пленки ПК, полученные электрохимическим травлением, состоят из дендритных мезопор (темных областей), примерно выровненных по направлению травления. Типичный размер пор лежит в диапазоне от 10 до 30 нм. Микрофотография НЧ-ПК, полученных механическим измельчением пленок ПК в шаровой мельнице представлена на рис. 3.10 б. НЧ-ПК имеют характерный диаметр 50-100 нм. Кристалличность наночастиц была подтверждена картинами дифракции электронов, где заметно большее количество ярких пятен, лежащих на дифракционных кольцах, а также темнопольными ПЭМ-изображениями, рассчитанный из которых размер нк-Si составил ~10 нм. Следует отметить, что вследствие размеров нк-Si, далеких от условий КРЭ, такие наночастицы не обладали ФЛ свойствами.



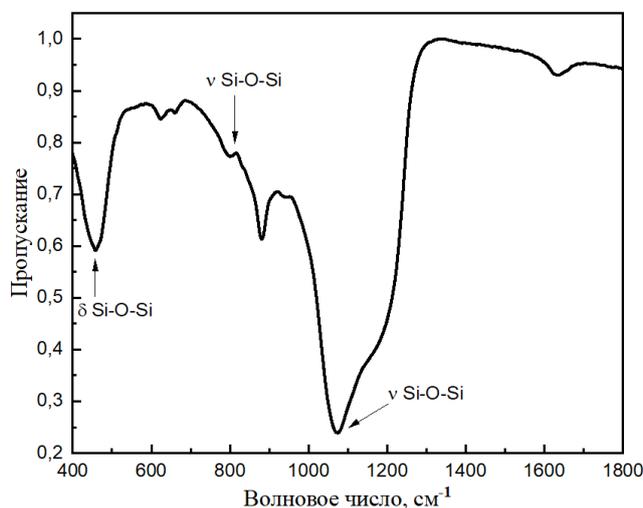
**Рисунок 3.10.** а) микрофотография СЭМ пористой пленки ПК, вид сбоку; б) микрофотография ПЭМ НЧ-ПК, в правом верхнем углу – картина дифракции электронов от НЧ-ПК, в правом нижнем углу – изображение в режиме темного поля.

Методом ДРС был измерен диаметр и дзета-потенциал НЧ-ПК (рисунок 3.11), который составил 70 нм и -54 мВ. Представленные данные в достаточной степени согласуются с результатами ПЭМ.



**Рисунок 3.11.** Распределение гидродинамического диаметра наночастиц НЧ-ПК, полученных измельчением пленок ПК.

ИК-спектроскопия подтвердила, что в процессе водного помола в шаровой мельнице, поверхность нанокристаллов НЧ-ПК окисляется. Окисление наночастиц четко видно на их ИК-спектре (рисунок 3.12), который включает как минимум 3 полосы поглощения, связанные с Si-O-Si группами: маятниковое вблизи  $460\text{ см}^{-1}$ , симметричное валентное вблизи  $800\text{ см}^{-1}$  и антисимметричное валентное колебания около  $1075\text{ см}^{-1}$ .

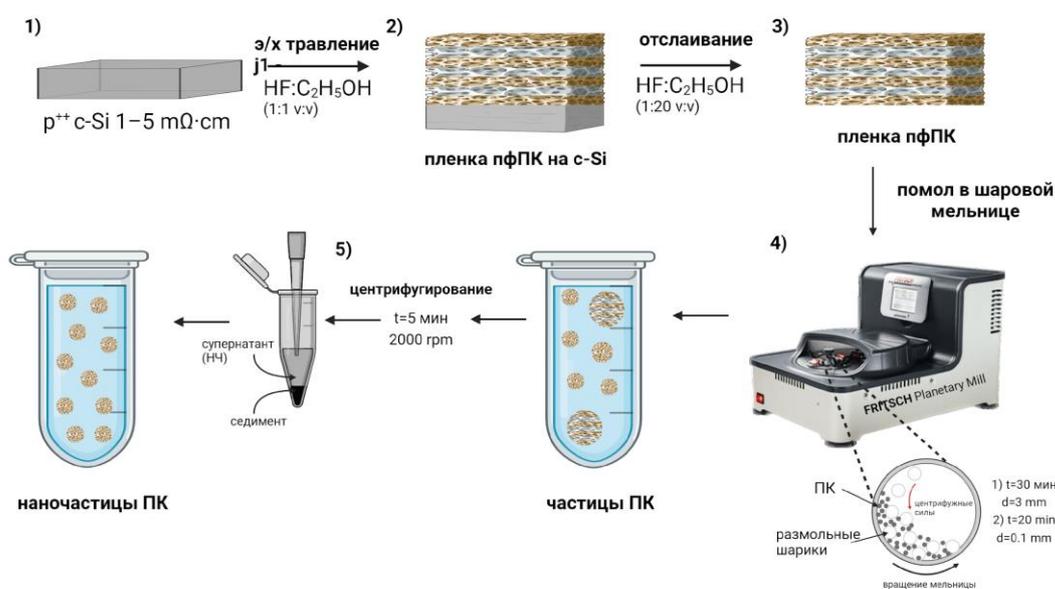


**Рисунок 3.12.** Спектр пропускания ИК-излучения НЧ-ПК, полученных измельчением пленок ПК.

### **3.3. Метод получения наночастиц пористого кремния из пленок перфорированного пористого кремния. Структурные и оптические свойства полученных образцов**

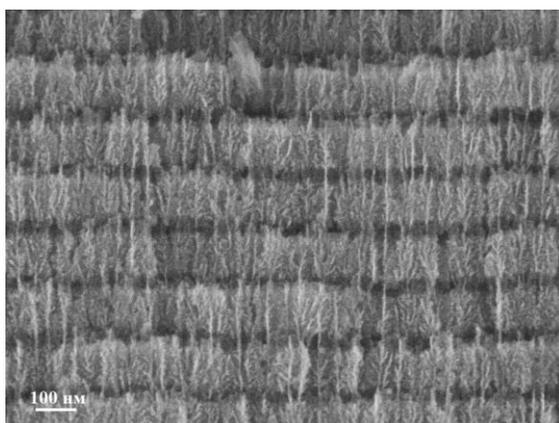
Отработана методика получения НЧ-ПК из пленок перфорированного ПК (пфПК). ПфПК которые синтезировали с использованием метода электрохимического травления монокристаллических пластин кремния с ориентацией поверхности (100), р типа проводимости, с удельным сопротивлением  $0.001-0.005\text{ Ом}\cdot\text{см}$ . Электролитом служил раствор этанола и плавиковой кислоты (50 % HF) в соотношении 1:1. Процесс травления состоял из чередования импульсов тока различной плотности ( $50\text{ mA/cm}^2$  3 с,  $100\text{ mA/cm}^2$  1 с), что приводило к образованию двух типов слоев: первичные слои с низкой пористостью и перфорированные слои с высокой пористостью (см. рисунок 3.13 (1)). Пленка отслаивалась в растворе этанола и плавиковой кислоты (50 % HF) в соотношении 20:1 и плотности тока  $70\text{ mA/cm}^2$  (2). Затем полученную пленку ПК промывали 3 раза дистиллированной водой (Millipore) и сушили при комнатной температуре на воздухе. Для

получения водных или спиртовых суспензий НЧ-ПК осуществлялся помол полученных пленок ПК в планетарной мельнице FRITSCH «Pulverisette 7 premium line» в стаканах  $ZrO_2$  в течение 30 минут в присутствии дистиллированной воды или спирта (30 мин  $ZrO_2$  шариками 3 мм, 20 мин  $ZrO_2$  шариками 0.1 мм) (3). После измельчения полученные растворы центрифугировались течение 5 мин при 2000 об/мин для удаления крупных частиц, полученный супернатант НЧ-ПК использовали в эксперименте. Схема процесса получения НЧ-ПК методом измельчения пленок ПК, полученных электрохимическим травлением с-Si, представлена на рисунке 3.13.

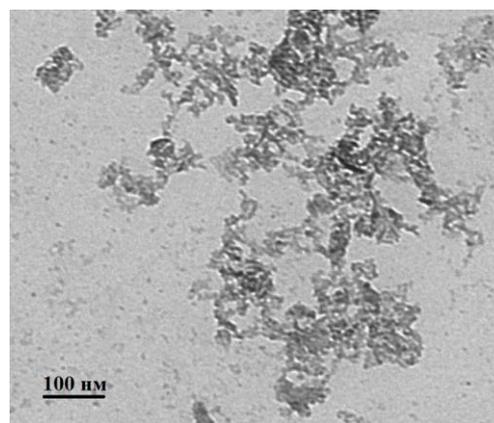


**Рисунок 3.13** Схема процесса получения НЧ-ПК методом измельчения пленок ПК, полученных электрохимическим травлением с-Si.

На рисунке 3.14 представлены микрофотографии СЭМ для исходных пленок пфПК в поперечном сечении, а также ПЭМ изображения НЧ-ПК, полученных механическим измельчением указанных пленок. Из изображения на рисунке 3.14 а можно заметить, что в структуре пленки чередуются слои с низкой пористостью (светлые участки) и с высокой пористостью (тёмные крупные поры). При механическом измельчении в планетарной мельнице разрывы кремниевых связей (Si-Si) происходят в первую очередь преимущественно в областях с высокой пористостью, хотя и слои с более низкой пористостью также могут разрушаться.



*a)*



*б)*

**Рисунок 3.14** а) Микрофотография СЭМ пленки пфПК в поперечном сечении. б) Микрофотография ПЭМ НЧ-ПК (б).

Из рисунка (рис. 3.14) видно, что размер полученных НЧ-ПК варьируется от 100 до 300 нм, что соответствует результатам измерений диаметра частиц с использованием метода ДРС. ZP наночастиц составил -30 мВ.

Были отработаны методы модификации поверхности пленок пфПК для получения гидрофильных пористых наночастиц (гфил-НЧ-ПК), гидрофобных пористых наночастиц (гфоб-НЧ-ПК) и амфифильных пористых наночастицы (амфил-НЧ-ПК).

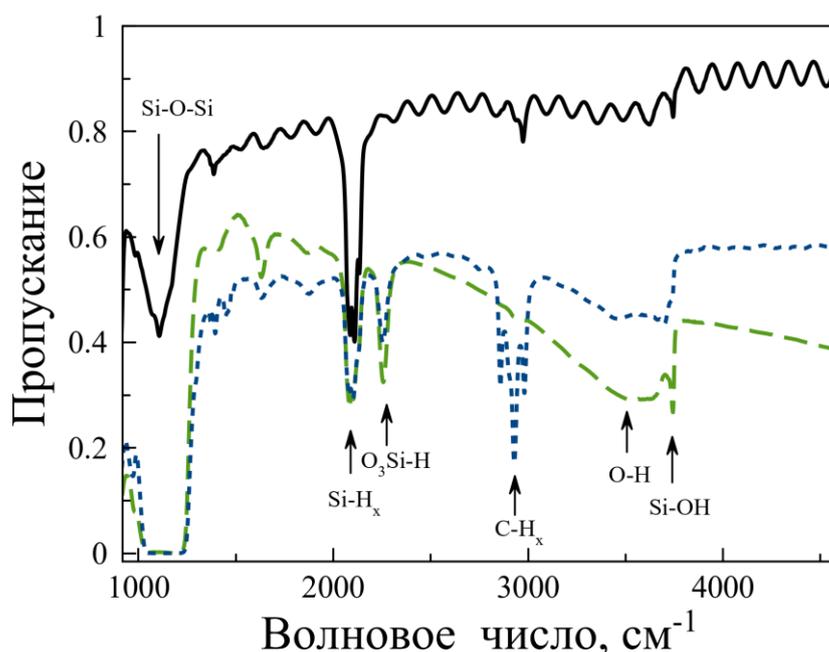
Для создания гидрофильных гфил-НЧ-ПК использовался метод механического измельчения полученных пленок ПК в планетарной мельнице. Измельчение проводилось с использованием шаров диаметром 5 мм и затем 100 мкм, что обеспечивало образование наночастиц со средним размером порядка 100 нм. Процесс измельчения проходил в этиловом спирте.

Гфоб-НЧ-ПК модифицировались путём насыщения поверхности кремния молекулами ОДС, при этом процесс предварительно включал обработку поверхности раствором "пираньи" (смесь серной кислоты и перекиси водорода), чтобы увеличить количество гидроксильных групп на поверхности для улучшенной конъюгации с ОДС.

Амфил-НЧ-ПК получались путём модификации поверхности пленок пористого кремния молекулами триметоксиоктадецилсилана (ОДС). Пленки кремния инкубировались в смеси толуола и ОДС при температуре 70°C в течение 12 часов. После этого пленки измельчались таким же образом, как и гфил-НЧ-ПК.

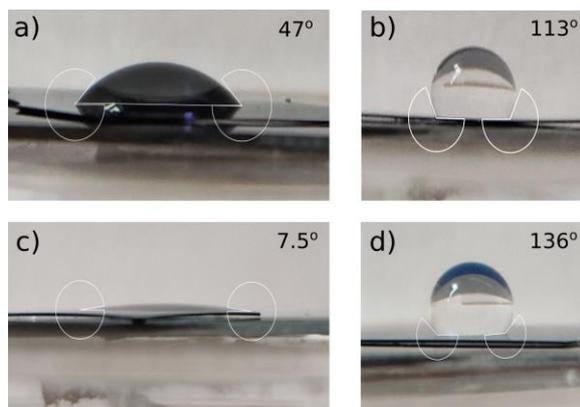
Для оценки химического состава поверхности были проведены измерения ИК-спектров пропускания пленок пфПК на различных этапах обработки (рисунок 3.15.). На исходном образце, полученном сразу после электрохимического травления (чёрная

сплошная линия), наблюдался слабый пик в области около  $1100\text{ см}^{-1}$ , соответствующий связям Si-O-Si, при этом большая часть поверхности была покрыта Si-H<sub>x</sub> связями. После обработки в растворе "пираньи" (зелёная пунктирная линия) происходило значительное окисление поверхности, что привело к почти полному поглощению на связях Si-O-Si и формированию Si-OH групп, необходимых для последующей функционализации молекулами ОДС. Связи Si-H при этом не исчезали полностью, но возникали связи O-Si-H, что указывает на частичное окисление и встраивание атомов кислорода в кристаллическую структуру кремния, что подтверждалось увеличением интенсивности пика Si-O-Si.



**Рисунок 3.15** ИК-спектры пропускания пленок пфПК сразу после приготовления (чёрная сплошная кривая), после окисления в растворе пираньи (зеленая кривая в черточку) и после покрытия ОДС (синяя кривая в точку)

После обработки ОДС (синяя штриховая линия) спектры показали чётко выраженные пики, соответствующие C-H<sub>x</sub> связям, что указывает на успешное покрытие поверхности молекулами ОДС. При этом линии, характерные для Si-OH групп, полностью исчезли, что связано с реакцией присоединения ОДС, в ходе которой образовывались спирты, выделяющие атомы кислорода и водорода из Si-OH связей. В результате такой обработки пористый кремний приобрёл гидрофобные свойства, что было подтверждено измерениями контактного угла, который значительно превышал  $90^\circ$  (рисунок 3.16).



**Рисунок 3.16** Измерения контактного угла для капли воды на пленке перфорированного ПК: а) в исходном состоянии, б) после покрытия С18 без предварительной обработки раствором пираньи, с) после обработки раствором пираньи, д) после обработки раствором пираньи и покрытия С18.

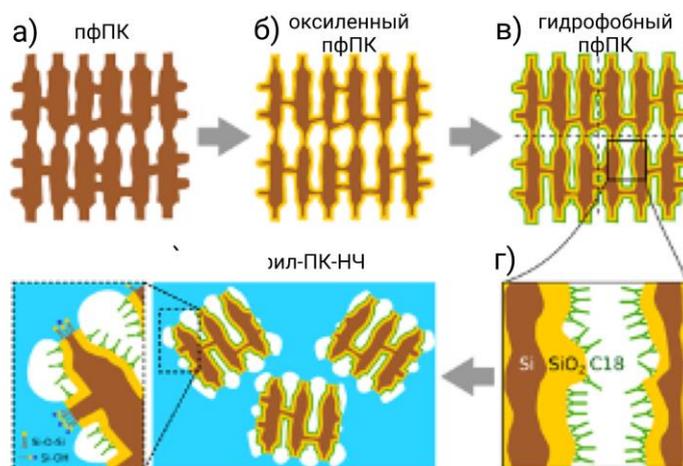
В работе впервые разработана оригинальная методика формирования амфил-ПК-НЧ, у которых внутренняя поверхность является гидрофобной, а внешняя — гидрофильной. Для формирования оксидной оболочки на поверхности нк-Si в пленках пфПК, пленки инкубировали в водных растворах декагидрата тетрабората натрия ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  – 32 мМ) в соответствии с методикой, описанной в работах [119.]. Оптимальное время окисления составляло 150 минут, что было определено с помощью мониторинга интегрированной интенсивности ФЛ. Затем пленки промывали раствором лимонной кислоты (150 мМ) и деионизированной водой.

Гидрофобное покрытие пфПК (взятого с массой около 400 мг) было выполнено путем конъюгации с триметоксиоктадецилсиланом (С18) в толуоле (1:20 по объему). Смесь нагревали в песочной бане при  $80^\circ\text{C}$  в течение 12 часов. Затем избыток С18 удаляли, промывая ПК чистым толуолом 4 раза, после чего пленки переносили в этанол. Пленки, покрытые С18, измельчали в планетарной мельнице (Fritsch Pulverizette 7 Premium line). Измельчение проводили в заполненных этанолом стаканах из  $\text{ZrO}_2$  объемом 20 мл с шарами диаметром 3 мм в течение 30 минут, затем с шарами диаметром 0,1 мм в течение 20–30 минут при скорости вращения 1100 об/мин.

Дополнительный отбор по размеру осуществляли с помощью центрифугирования полученных наночастиц. Трехкратное центрифугирование при 2000 об/мин в течение 2 минут позволило удалить крупные частицы. Затем проводилось трехкратное центрифугирование при 11000 об/мин в течение 15 минут для удаления мелких наночастиц из супернатанта. После каждого центрифугирования осадок ресуспендировали в ультразвуковой ванне (Elmasonic S 30 H). На заключительном этапе амфил-ПК-НЧ

переносили в деионизированную воду через центрифугирование с заменой растворителя и выдерживали 24 часа перед проведением экспериментов.

Схема изготовления амфил-ПК-НЧ представлена на рисунке 3.17.



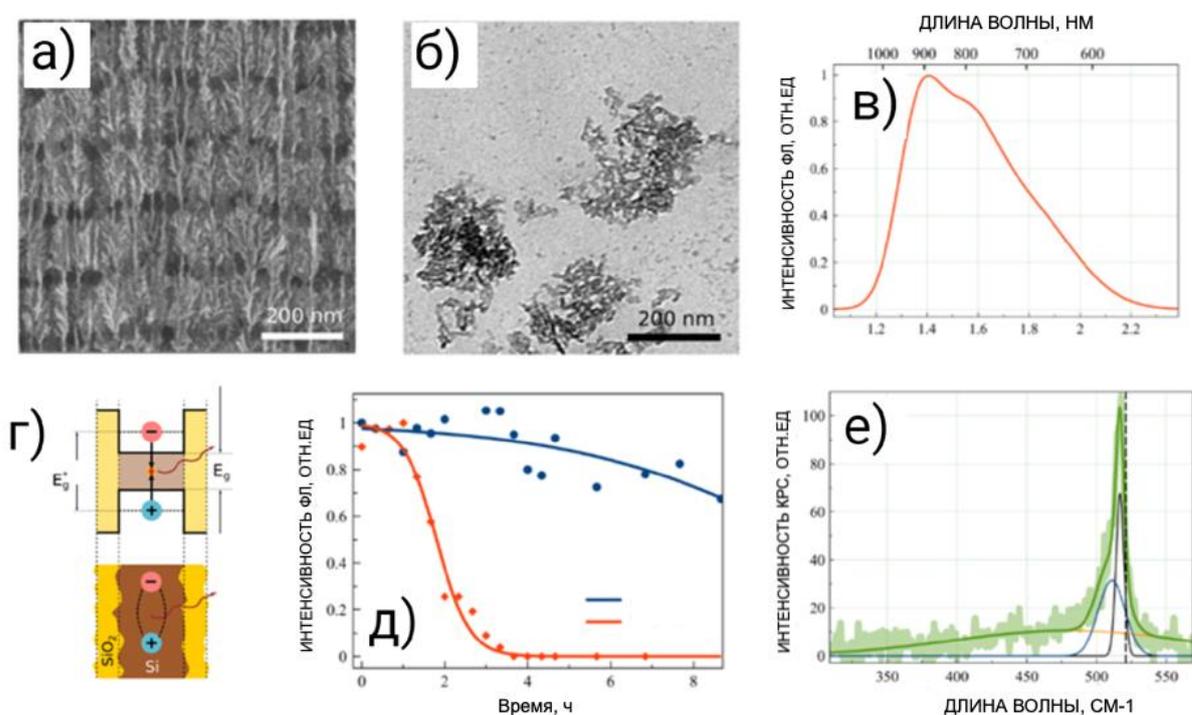
**Рисунок 3.17** Схематическое изображение формирования амфил-ПК-НЧ. Si скелет показан коричневым цветом, гидрофильный оксидный слой - желтым, гидрофобное покрытие ODS (C18) - зеленым. 4 стадии представляют результаты электрохимического формирования перфорированных слоев ПК (а), окисления пфПК боратом ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) (б), ковалентного связывания ODS (в-г), механического измельчения слоев пфПК и формирования амфил-ПК-НЧ (д). Увеличенный участок поверхности амфил-ПК-НЧ (е).

Рассмотрим еще раз наиболее подробно методику получения амфил-ПК-НЧ: они формируются с помощью метода «сверху вниз», который начинается с получения пленки пфПК (рисунок 3.17 а). Размер пор в таком пористом слое сравним с толщиной нанонитей кремниевого остова и составляет около 10-20 нм. Такая морфология хорошо подходит для успешной загрузки низкомолекулярных лекарств. Однако, в данном случае согласно условиям квантово-размерного эффекта (КРЭ), диаметр нанонитей в пфПК слишком велик для их эффективной ФЛ в красной области спектра. Поэтому для активации ФЛ было использовано частичное окисление кремниевого остова в растворе тетрабората натрия, что приводило к уменьшению толщины нанонитей кремния и формированию структуры типа ядро/оболочка Si/SiO<sub>2</sub> (рисунок 3.17 б).

На следующем этапе (рисунок 3.17. в, г) поры пфПК покрывались гидрофобным веществом - октадецилсиланом (C18), ковалентно связанным с поверхностью наночастиц за счет образования Si-O-Si связей на месте, существующих Si-OH. Для большей эффективности концентрация Si-OH групп была увеличена результате обработки пфПК раствором пираньи ( $3\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Затем пленки пфПК были измельчены в планетарной мельнице в этаноле для получения амфил-ПК-НЧ (рисунок 3.17 д). В результате измельчения появилась новая внешняя поверхность наночастиц. Эта поверхность частично состояла из  $\text{SiO}_2$ , а частично из Si с большим количеством оборванных связей, т. е. не покрытых молекулами C18. Свежая поверхность наночастиц быстро окислялась в жидкости и пассивировалась кислородом и гидроксильными группами (рисунок 3.17 е). Таким образом получались амфифильные наночастицы, которые были гидрофильны снаружи и оставались гидрофобны внутри.

Для подтверждения того, что полученные амфил-ПК-НЧ обладают требуемыми свойствами, они были исследованы с применением физико-химических методов (рисунок 3.18).



**Рисунок 3.18** а) СЭМ изображение поперечного сечения слоя пфПК после обработок; б) ПЭМ изображение амфил-ПК-НЧ; в) Спектр ФЛ амфил-ПК-НЧ. г) Схематическое изображение механизмов экситонной ФЛ в нанонитях, составляющих кремниевый остов наночастиц (ядро/оболочка Si/SiO<sub>2</sub> нанонитей показана коричневым/желтым; электрон (розовый) и дырка (голубой), соединенные в экситон; красные стрелки показывают испускание фотона). д) Стабильность ФЛ амфил-ПК-НЧ (синий) и амфил-ПК-НЧ (красный) в физиологических условиях (PBS, 37 °C). Точки представляют экспериментальные полученные интегральные интенсивности ФЛ образцов. е) спектр КРС амфил-ПК-НЧ. Экспериментальные данные - светло-зеленый, черная резкая полоса соответствует

нанокристаллическому Si, оранжевая широкая полоса - аморфному Si, синяя полоса - оксиду SiO<sub>2</sub>, вертикальная пунктирная линия - положению полосы объемного Si.

Изображение СЭМ поперечного среза пленки пфПК после описанных выше обработок показывает, слой сохраняет свою морфологию (рисунок 3.18а). Размер наночастиц, получаемых измельчением такой пленки частично определяется толщиной первичных слоев, хотя последние могут быть дополнительно измельчены до меньших размеров за счет высокой энергии измельчения в шаровой мельнице. На изображении СЭМ отчетливо видны наноразмерный остов кремния и мезопоры в промежутках между кремниевыми нанонитями. В результате измельчения были получены амфил-ПК-НЧ с размером около 200 нм, которые также имели пористую структуру, как и слои пфПК (рисунок 3.18 б). Данная оценка размера хорошо согласуется с оценкой гидродинамического диаметра наночастиц, полученной с помощью динамического рассеяния света. Это позволяет судить об отсутствии значимой агломерации амфил-ПК-НЧ и доказывает гидрофильные свойства их внешней поверхности. Дзета-потенциал амфил-ПК-НЧ составлял около -30 мВ, что характерно для обычных гидрофильных наночастиц с естественным оксидом на поверхности.

Типичный спектр ФЛ суспензии амфил-ПК-НЧ показан на рисунке 3.18 с. Широкая полоса ФЛ объясняется разбросом квантовых нитей/точек по размерам в объеме наночастиц. Более высокая энергия излучения (более короткая длина волны),  $E_g^*$ , соответствует большим квантовым точкам Si, с диаметром  $d$ . Согласно оценкам на основе модели квантового-размерного эффекта (см формулу 3.1),  $d$  находится в диапазоне от 2,5 до 8 нм. Схематическое изображение механизмов экситонной ФЛ в нанонитях, составляющих кремниевый остов амфил-ПК-НЧ представлен на рис. 3.17 г. Эффективная ФЛ наночастиц возможна благодаря ограничению экситонов, то есть связанных электронов (розовые круги) и дырок (голубые круги), которые возникают в мелких нк-Si, ограниченных оболочкой SiO<sub>2</sub> с более широкой запрещенной зоной. Из-за непрямой запрещенной зоны кремния характерные времена затухания ФЛ составляют десятки микросекунд, поэтому эту полосу ФЛ называют медленной (англ. S-band).

Согласно данным, представленным на рисунке 3.18 д, типичное время тушения ФЛ при их инкубации в физиологических условиях (ПБС, 37 °С) составляет около 1-3 часов для гфил-ПК-НЧ, тогда как для амфил-ПК-НЧ оно составило примерно 12 часов. Это можно связать с медленным растворением амфифильных наночастиц, что является плюсом для использования их в качестве систем доставки лекарств, так как максимальное накопление наноконтейнеров в опухолях обычно достигается через 8-12 часов циркуляции в кровотоке.

Гидрофобные поры предположительно частично защищают амфил-ПК-НЧ от гидролиза, что приводит к замедлению их растворения.

На рисунке 3.18 е показан спектр КРС амфил-ПК-НЧ. Наиболее интенсивный пик соответствует рассеянию на фонах в нанокристаллах кремния. Положение пика кристаллического соответствует  $520.5 \text{ см}^{-1}$ , что показано вертикальной пунктирной линией, однако из-за размерного эффекта ограничения фононов в нанокристаллах наблюдаемый пик (чёрная линия) сдвинут влево примерно на  $4 \text{ см}^{-1}$ , что соответствует размеру нанокристаллов 2-3 нм. Помимо этого, в спектре присутствуют: широкая линия рассеяния аморфного кремния с максимумом вблизи  $480 \text{ см}^{-1}$ , а также линия рассеяния аморфного диоксида кремния с максимумом  $510 \text{ см}^{-1}$ .

Таким образом, амфифильные наночастицы, с одной стороны, обладают гидрофильной поверхностью, способствующей их биосовместимости, а с другой — гидрофобной внутренней структурой, позволяющей захватывать газ и создавать кавитационные ядра для ультразвукового воздействия. В Главе 6 рассматривается продолжение наших исследований по разработке эффективных соносенсибилизаторов, способных избирательно разрушать раковые клетки за счет уникальных свойств амфил-ПК-НЧ в сочетании с терапевтическим УЗ.

## **Глава 4. Исследования цитотоксических свойств кремниевых наночастиц**

Исследование цитотоксических свойств наночастиц играет ключевую роль в развитии наномедицины и биомедицинских приложений, таких как терапия рака и разработка новых систем доставки лекарств. Важность этого направления обусловлена необходимостью оценки безопасности и эффективности наночастиц при взаимодействии с живыми клетками, что напрямую влияет на их потенциальное применение в клинической практике. В представленном исследовании цитотоксичность образцов изучена совместно с коллегами из института теоретической и экспериментальной биофизики и факультета фундаментальной медицины МГУ.

#### **4.1. Исследования цитотоксичности наночастиц, полученных измельчением кремниевых нанонитей**

Для исследования цитотоксических свойств наночастиц *in vitro* использовали несколько подходов:

##### *Вестерн-блот анализ*

Для обнаружения гибели клеток методом Вестерн-блоттинга использовали расщепление эффекторной каспазы-3 и PARP (поли (АДФ-рибоза)-полимераза). Эти белки являются маркерами апоптоза: PARP участвует в репарации повреждений ДНК, а каспаза-3 в различных морфологических и биохимических событиях при апоптозе. Накопление расщепленных фрагментов (p19/p17) эффекторной каспазы-3 и расщепление PARP каспазой-3 приводит к ее инактивации и отражает интенсивность апоптоза в клетках [[120.],[121.],[122.]].

Исследования проводились с использованием клеток карциномы молочной железы MCF-7. Клетки инкубировали с НЧ-К или НЧ-ПК в концентрациях 400 и 800 мкг/мл в течение 24 ч. Использовался ингибитор протеинкиназы широкого спектра действия стауроспорин (STS) в концентрации 0,25 мкМ в течение 4 ч в качестве положительного контроля индукции апоптоза, в клетках MCF-7 STS вызывал расщепление PARP. Тубулин использовали в качестве контроля загрузки.

##### *Проточная цитометрия*

В данной работе метод проточной цитометрии использовался для оценки способности наночастиц вызывать эффективную элиминацию клеток. Количество живых клеток оценивалось их подсчетом с использованием проточного цитометра FACSCanto II (BD Biosciences). Производили анализ клеток MCF-7 с использованием двойного окрашивания Аннексин V-FITC / PI. Белок аннексин V специфично связывается с фосфатидилсерином, который появляется на поверхности апоптотических и некротических клеток. PI (йодид пропидия) проникает только в клетки с повреждённой мембраной. В результате апоптотические клетки окрашиваются только аннексином V, связанным с производной флуоресцеина FITC, поскольку они сохраняют целостность мембраны на ранних стадиях апоптоза, в то время как некротические клетки окрашиваются обоими реагентами. Этот подход обычно применяется для оценки популяции апоптотических и некротических клеток. Ингибитор протеинкиназы широкого спектра действия стауроспорин (STS) в концентрации 0,25 мкМ в течение 4 ч использовали в качестве положительного контроля индукции апоптоза в клетках MCF-7. Измерения проводили с

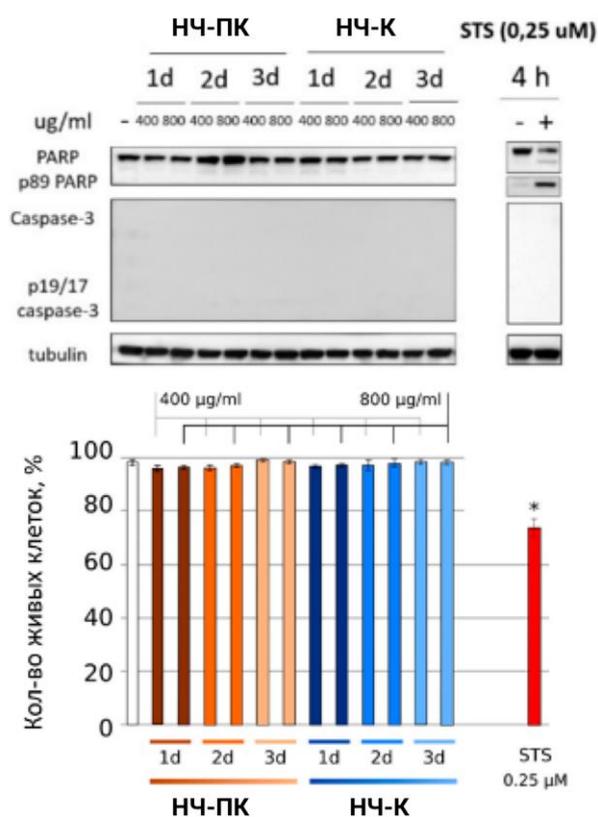
клетками, которые инкубировали с НЧ-К или НЧ-ПК в концентрациях 400 и 800 мкг/мл в течение 24, 48 и 72 ч соответственно.

Использовался subG1 тест для обнаружения клеток, которые содержат небольшие фрагменты своей ДНК на поздней стадии апоптоза из-за активности эндонуклеаз. Процент популяции subG1 отражает количество апоптотических клеток [[122.],[123.]]. ДНК клеток окрашивали с помощью PI.

#### *МТТ тест*

Анализ МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) оценивает метаболическую активность клеток как показатель жизнеспособности клеток. Основой метода является способность живых клеток восстанавливать желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы формазана. Восстановление МТТ зависит от клеточной метаболической активности. Клетки с низким уровнем метаболизма восстанавливают очень мало МТТ в отличие от быстро делящихся. Уменьшение количества жизнеспособных клеток вызывает снижение метаболической активности культуры. Это уменьшение напрямую связано с количеством образовавшегося пурпурного формазана. Исследование проводилось с помощью планшет-ридера (Spark 20M, Tecan, Швейцария), определяющего оптическую плотность.

Результаты вестерн-блот анализа (рисунок 4.1 а) показали, что при инкубации клеток MCF-7 как НЧ-К, так и с НЧ-ПК не приводила к образованию активного фрагмента p17/19 каспазы-3 и последующему отщеплению ее субстрата – PARP, что указывало на отсутствие некроза и апоптоза клеток при инкубации с наночастицами различных концентраций. Эти результаты были подтверждены методом проточной цитометрии (рисунок 4.1 б) с двойным окрашиванием аннексин V-FITC / PI, который также показал незначительную популяцию апоптотических и некротических клеток через 1, 2 и 3 дня инкубации.



**Рисунок 4.1** а) Вестерн-блот анализ общего количества клеточных лизатов клеток MCF-7 после обработки наночастицами НЧ-К и НЧ-ПК, и положительный контроль для индукции апоптоза – STS. Тубулин использовали в качестве контроля загрузки. б) проточная цитометрия с окрашивания AnnexinV-FITC/ PI. Обозначение: d – дни (24 часа).

Из вышеописанного можно сделать вывод о низкой цитотоксичности наночастиц кремния, изготовленных из непористых и пористых кремниевых нанонитей, при их инкубации с раковыми клетками MCF-7 вплоть до концентраций 800 мкг/мл и времени инкубации до 3 дней.

#### **4.2. Исследования цитотоксичности наночастиц, полученных измельчением пленок перфорированного пористого кремния**

Эксперименты *in vitro* проводились с использованием клеточной линии человеческого лейкоза K562, предоставленной отделом токсикологии Каролинского института (Стокгольм, Швеция). Клетки выращивали в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в среде RPMI1640 (Gibco, Waltham, MA, США), содержащей 4,5 г/л глюкозы (Gibco), с 10% FBS (Gibco), 1 mM пирувата натрия (PanEco, Москва, Россия) и смесью антибиотиков и

антимикотиков (Gibco). Все клетки пересевались каждые три-четыре дня и поддерживались в логарифмической фазе роста для проведения экспериментов. Перед обработкой наночастицами культуральную среду заменяли на свежую. Клетки обрабатывали наночастицами в концентрациях от 50 до 1000 мкг/мл.

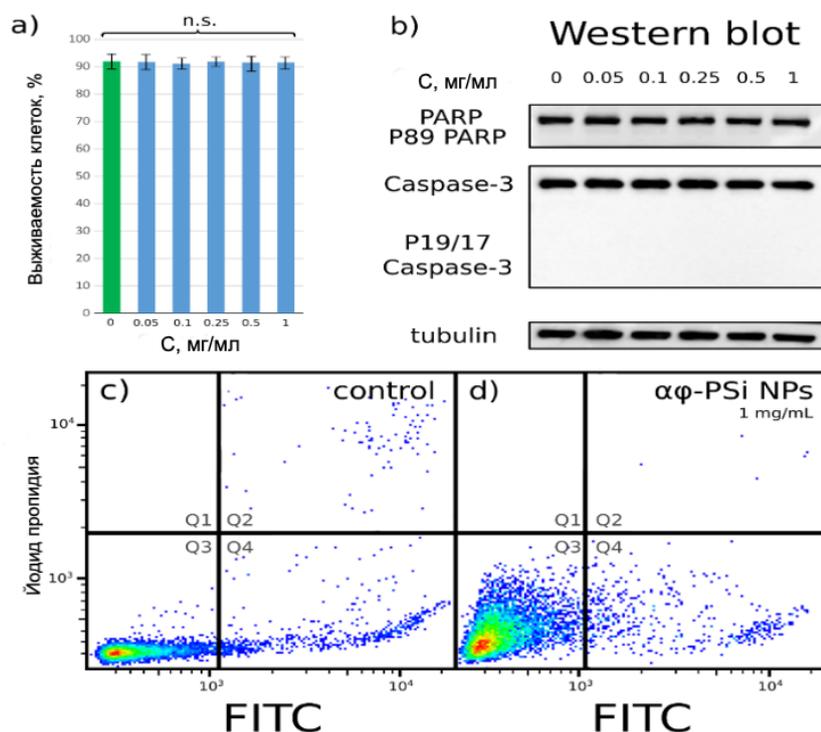
Для проведения гель-электрофореза и Вестерн-блот анализа клетки центрифугировали (1000 gcf, 4 мин, +4°C) и дважды промывали охлажденным раствором фосфатного буферного солевого раствора (ПБС) (PanEco). Затем осадок клеток лизировали в буфере для радиоиммунопреципитации (RIPA) (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5% SDS, 0,5% натрия дезоксихолата, 1% NP-40, 1 mM фенилметилсульфонилфторид (PMSF) и коктейлем ингибиторов протеаз cOmplete™ (Roche, Базель, Швейцария)) в течение 20 минут на льду. Лизаты центрифугировали (16000 gcf, 20 мин, 4°C), и супернатанты использовали для дальнейшего анализа: часть супернатанта отбирали для измерения концентрации белка с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, США). Затем образцы смешивали с загрузочным буфером Лэммли и кипятили в течение 7 минут. Равное количество (20–40 мкг) белковых экстрактов разделяли методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии лаурилсульфата натрия (SDS-PAGE) при 100 мВ, затем переносили на нитроцеллюлозные мембраны в течение 2 часов при 110 В. После переноса мембраны блокировали в течение 1 часа 5% обезжиренным молоком в буфере с трисом (TBS) при комнатной температуре, затем инкубировали с первичными антителами (1:1000) в течение ночи, а затем с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (от 1:2500 до 1:5000) в течение 1 часа с 2,5% обезжиренным молоком в TBS при комнатной температуре. Детекция проводилась с использованием ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, США) и системы ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, Hercules, CA, США).

Для Вестерн-блота использовались следующие первичные антитела: полные и расщепленные антитела против каспазы-3 (#9662) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, США); антитела против Poly(ADP Ribose) Polymerase (PARP) (#137653) и антитела против  $\alpha$ -тубулина мыши (#7291) (оба - Abcam, Cambridge, UK). Вторичными антителами служили антитела против мышинового или кроличьего IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Abcam, ab97046 и ab97200 соответственно).

Флуоресцентная активация клеток (FACS). После указанного времени обработки клетки отделяли от чашек с помощью 0,25% трипсина (Gibco) и переносили в кондиционированную среду. Затем клетки центрифугировали (200–300 g, 5 мин, 4°C), дважды промывали холодным PBS (Paneco, Сингапур), и осадок ресуспендировали в PBS

(100 мкл на 1 миллион клеток). Около  $10^5$  клеток (10 мкл) переносили в 200 мкл  $1\times$  буфера для связывания аннексина (BD Biosciences, San Jose, CA, США), и добавляли 2 мкл Annexin V-FITC (Invitrogen). Образцы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем добавляли 5 мкл пропидия йодида (50 мкг/мл) (BD Biosciences) в каждый образец. Анализ популяции клеток проводился через 5 минут инкубации в темноте при комнатной температуре с использованием цитометра BD FACS Canto II (BD Biosciences).

Таким образом, цитотоксичность амфил-ПК-НЧ в диапазоне концентраций от 50 до 1000 мкг/мл в клетках K562 оценивалась двумя независимыми методами, с помощью Вестерн-блот анализа и проточной цитометрией (рисунок 4.2). Клетки инкубировались с наночастицами в течение 24 часов. Расщепление маркеров апоптоза - эффекторной каспазы-3 и поли (АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) анализировали на предмет обнаружения гибели клеток. Поскольку PARP участвует в процессе репарации повреждений ДНК, а эффекторная каспаза-3 играет важную роль в большинстве биохимических событий, связанных с апоптозом, то расщепление этих маркеров указывает на интенсивность апоптоза в клетках.



**Рисунок 4.2** Исследование цитотоксичности амфил-ПК-НЧ. а) Гистограмма данных анализа проточной цитометрии (ПЦ) для клеток K562 после 24 часов инкубации с наночастицами. Результаты представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение (SD),  $n = 4$ . n. s. - не значительные: значительные различия по сравнению с контрольными

клетками. б) Вестерн-блот анализ клеток K562 после 24 часов инкубации с амфил-ПК-НЧ (0,05-1 мг/мл). Тубулин использовался в качестве контроля. Изображения проточного цитометрического анализа с окрашиванием Annexin V-FITC/PI в клетках K562: в) - контрольные клетки и г) – клетки с αф-ПК-НЧ (1 мг/мл). Окрашивание Annexin V/PI: -/-, жизнеспособные клетки (Q3); +/- апоптотические клетки (Q4); ++ поздние апоптотические клетки (Q2); +/- некротические клетки (Q1).

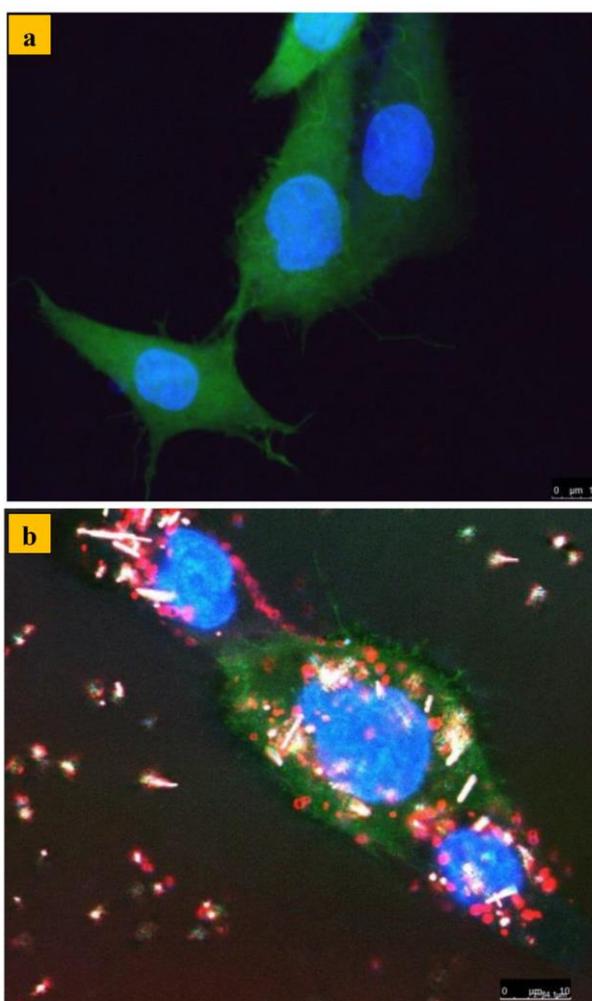
Отсутствие накопления активных фрагментов p17/19 каспазы-3 и последующего расщепления ее субстрата PARP отражало нетоксические свойства амфил-ПК-НЧ по отношению к клеткам K562: наночастицы не индуцировали апоптоз клеток при выбранных диапазонах концентраций (рисунок 4.2 б). Аналогичные результаты были получены при использовании проточного цитометрического анализа с двойным окрашиванием с использованием аннексина V-FITC в сочетании с йодистым пропидия (PI). Этот метод обычно применяется для оценки популяции апоптотических и некротических клеток. Проточный цитометрический анализ с использованием аннексина V-FITC/PI показал, что αф-ПК-НЧ не снижали жизнеспособность клеток по сравнению с контрольными клетками после 24-часовой инкубации вплоть до концентраций наночастиц 1000 мкг/мл (рис. 4.2в, г).

### **4.3. Исследования локализации пористых наночастиц кремния в живых клетках методом люминесцентной конфокальной микроскопии**

Эксперименты по конфокальной люминесцентной микроскопии проводились с использованием оптического микроскопа Leica TCS SP5 с возбуждением при длинах волн 405 нм и 488 нм. Для получения изображений использовали масляный объектив с увеличением 63 и числовой апертурой 1.40. В экспериментах *in vitro* по исследованию НЧ-ПК, полученных измельчением ПК-НН, использовали клетки CF2Th (тимус собаки), в которые был введен ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). За 30 часов до анализа флуоресценции в культуру CF2Th добавляли индуктор RSL-1, что стимулировало синтез GFP. Длина волны свечения GFP составляет около 515 нм (зеленый свет). НЧ-ПК вводили в клетки CF2Th через 5 часов после введения индуктора и за 24 часа до проведения измерений. Ядра клеток окрашивали с помощью 5 мкг Hoechst (PanEco Ltd., Москва, Россия) за 30 минут до эксперимента. Длина волны свечения Hoechst составляет около 460 нм (синий свет).

Микрофотографии люминесцентной конфокальной микроскопии живых клеток CF2Th с НЧ-ПК, полученными измельчением массивов ПК-НН в нетоксичной концентрации 0,1 мг/мл и без них (контрольная группа) представлены на рисунках 4.3 (а, б) соответственно. Зеленый, синий и красный цвета соответствуют люминесценции мембран клеток, ядер и ФЛ КНЧ.

Значительное свечение ПК-НЧ наблюдалось в клетках через 24 часа после инкубации. Явно видно, что большая часть наночастиц проникает внутрь клеток и локализуется в их цитоплазме. Предполагается, что наночастицы проникают в клетки через механизм эндоцитоза [121.]. Локализация ПК-НЧ в цитоплазме клеток была подтверждена z-сканированием клеток.

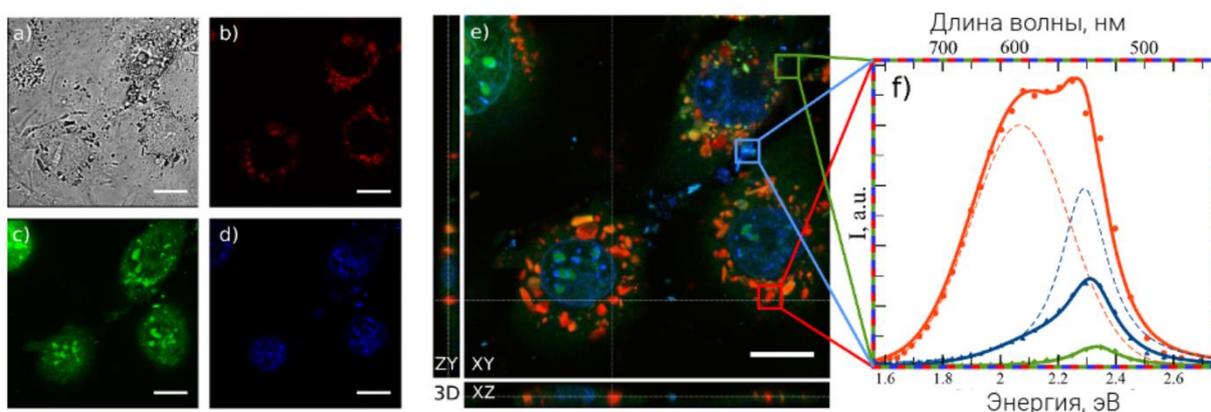


**Рисунок 4.3** Микрофотографии люминесцентной конфокальной микроскопии живых клеток CF2Th *in vitro*. а) Контрольная группа и б) клетки с ПК-НЧ. Зеленый, синий и красный цвета соответствуют свечению мембран клеток, ядер и ПК-НЧ, соответственно. Шкала изображений: 10 мкм.

В экспериментах с амфил-ПК-НЧ, наночастицы с концентрацией 0.2 мг/мл инкубировались с клетками мышиных эмбриональных фибробластов 3Т3 НИН в течение 24

часов перед началом экспериментов. Затем клетки окрашивали, добавляя 3 мг/мл Calcein-AM (Sigma) для окрашивания цитоплазмы и 5 мг/мл бисбензимида Н 33342 (Hoechst, Calbiochem) для окрашивания ядра.

На рисунке 4.4 показаны флуоресцентные изображения клеток 3Т3 NIH после 24 часов инкубации в среде, содержащей амфил-ПК-НЧ. На рисунке 4.4 а-г показаны светлопольное изображение клеток, ФЛ амфил-ПК-НЧ (красным), цитоплазмы (зеленым) и клеточных ядер (синим), соответственно. На рисунке 4.4 д показано совмещенное изображение всех трех цветов в трёх проекциях. Спектры ФЛ соответствующих областей изображения показаны на рис. 4.4 д. Из рисунков видно, что амфил-ПК-НЧ находятся в цитоплазме клеток и сохраняют эффективную ФЛ внутри клеток. Спектр их излучения сдвинут в область больших энергий, что может объясняться частичным окислением в процессе инкубации, что приводит к увеличению оксидной оболочки, а следовательно, уменьшению кремниевых нанокристаллов. Наночастицы, которые не попали в цитоплазму клеток и остались в межклеточном пространстве, светятся характерным голубым светом. Это свидетельствует об их полном окислении, поэтому в таких наночастицах доминирующую роль играет быстрая (F-band) ФЛ, связанная с рекомбинацией на дефектах в широкозонном диоксиде кремния.



**Рисунок 4.4** Конфокальная люминесцентная биовизуализация клеток 3Т3 NIH с амфил-ПК-НЧ *in vitro*. а) светлопольное изображение клеток; б) фотолюминесценция амфил-ПК-НЧ показана красным цветом; в) цитоплазма клеток окрашена кальцеином АМ (зеленый); г) ядра клеток окрашены Hoechst (синий); (е) объединенное трехпроекционное изображение ФЛ клетки (использованы изображения б, в и г), которое показывает интернализацию красных ФЛ амфил-ПК-НЧ в цитоплазме клеток (зеленый) и синих излучающих окисленных наночастиц вне клеток; (д) типичные спектры ФЛ амфил-ПК-НЧ (сплошная красная линия - внутри клеток и сплошная синяя линия - вне клеток) и их

разложение на экситонную полосу (пунктирная красная линия) и оксидную полосу (пунктирная синяя линия). Зеленый спектр соответствует автофлуоресценции клеток.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что амфил-ПК-НЧ активно проникают в клетки и локализуются в цитоплазме через механизм эндоцитоза, который представляет собой процесс захвата клеткой внешних частиц путем их поглощения через клеточную мембрану и образования везикул (пузырьков), которые транспортируют эти частицы внутрь клетки. Для ПК-НЧ важную роль в эндоцитозе играет их размер, форма, заряд и модификация поверхности. Например, амфифильные наночастицы, которые сочетают гидрофильные и гидрофобные свойства, могут легче взаимодействовать с липидным бислоем клеточной мембраны, что облегчает процесс их поглощения. Негативно заряженные наночастицы часто лучше поглощаются клетками благодаря электростатическим взаимодействиям с положительно заряженными участками мембраны.

Конфокальная микроскопия продемонстрировала, что через 24 часа после инкубации значительная часть ПК-НЧ сохраняет фотолюминесценцию внутри клеток, что позволяет эффективно отслеживать их расположение. Наблюдается разница в спектрах фотолюминесценции наночастиц в зависимости от их местоположения: внутри клеток они демонстрируют сдвиг ФЛ спектра в область больших энергий, что связано с частичным окислением и уменьшением размера нанокристаллов. Наночастицы, которые не проникают в клетки и остаются в межклеточном пространстве, проявляют голубое свечение, что свидетельствует о полном окислении и доминировании быстрых переходов в оксидированной оболочке. Эти результаты подтверждают, что ПК-НЧ обладают достаточной стабильностью ФЛ, что делает их перспективными для дальнейших исследований в области клеточной биовизуализации.

## **Глава 5. Исследования растворения наночастиц кремния в модельных биожидкостях и живых клетках оптическими методами люминесцентной конфокальной микроскопии и комбинационного рассеяния света**

Оптические методы, такие как люминесцентная конфокальная микроскопия и комбинационное (рамановское) рассеяние света, являются высокоинформативными инструментами для изучения поведения наночастиц кремния в биологических системах и

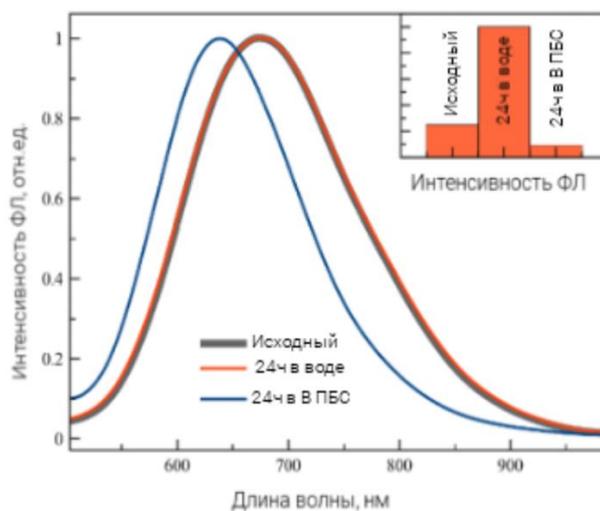
их растворения в модельных биологических жидкостях. Эти методы позволяют не только визуализировать локализацию наночастиц в живых клетках, но и оценивать изменения их структурных и оптических свойств на молекулярном уровне в реальном времени.

### **5.1. Квантово-размерный эффект в кремниевых нанокристаллах при их растворении в модельных биологических жидкостях**

НЧ-ПК были получены ультразвуковой диспергацией в воде массивов ПК-НН по процедуре, описанной выше в Главе 3. Для исследования растворения кремниевых наночастиц (КНЧ) в модельных жидкостях, таких как деионизированная вода (Millipore) и натрий-фосфатный буфер (ПБС), в диализный мешок (поры 4,5 кДа) помещали 3 мл суспензии наночастиц с концентрацией 0,5 мг/мл. Затем мешок погружали в исследуемые растворы объемом 1 л при температуре 37°C (в условиях термостата Binder FD 23). Известно, что диализный мешок пропускает малые молекулы и ионы, но задерживает коллоидные наночастицы. В представленных экспериментах диализные мешки использовались с целью создания модельной системы, эмулирующей живую клетку, где происходит непрерывный ионный обмен, и путем естественного метаболизма поддерживается низкая концентрация продуктов растворения НЧ-ПК (кремниевой кислоты) во внутриклеточной среде.

Для измерения ФЛ и спектров КРС использовали 0,1 мл суспензии НЧ-ПК, высушенной на металлической пластине. Спектры ФЛ регистрировали при возбуждении непрерывным ионным лазером на длине волны 364 нм (мощность 10 мВт, диаметр пятна 1 мм), используя монохроматор (MS750, SOLAR ТП) с ПЗС-матрицей. Измерение спектров КРС проводили с помощью конфокального микроскопа Confotec™ MR350 с возбуждением лазером на 633 нм и мощностью 1 мВт, чтобы минимизировать перегрев образцов.

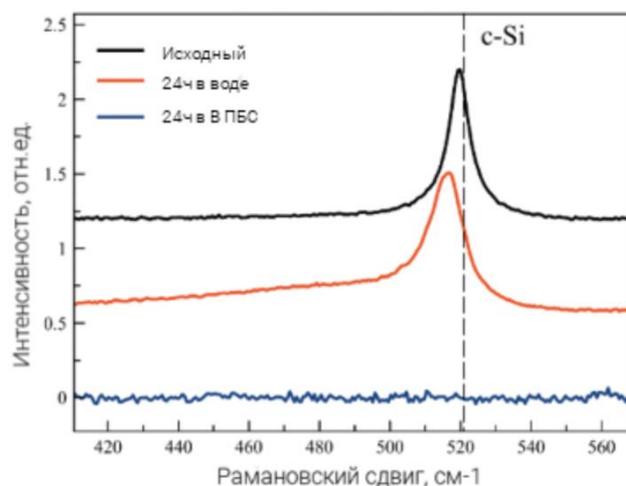
На рисунке 5.1 представлены спектры ФЛ исходных НЧ-ПК (черная кривая), а также НЧ-ПК после 24 часов инкубации в диализных мешках в воде (красная кривая) и в растворе ПБС (синяя кривая) при 37 °С. На вставке к рисунку представлены соответствующие относительные интенсивности сигналов ФЛ.



**Рисунок 5.1** Спектры ФЛ НЧ-ПК: исходный (черная кривая), спустя 24 часа инкубации в диализных мешках в воде (красная кривая) и в ПБС (синяя кривая) при 37 °С. На вставке к рисунку представлены соответствующие относительные интенсивности сигналов ФЛ.

Из рисунка 5.1 видно, что положение максимума спектра ФЛ НЧ-ПК при их инкубации в воде остается неизменным, в то время как инкубация наночастиц в ПБС приводит к существенному сдвигу максимума ФЛ с 675 нм до 630 нм. Такой сдвиг обусловлен КРЭ в нк-Si при их растворении. Действительно, КРЭ заключается во вторичном квантовании энергии носителей заряда, как электронов, так и дырок, в квантовой точке - нк-Si (в нашем случае), что приводит к увеличению эффективной ширины запрещенной зоны. Эта энергия соответствует энергии излучаемых фотонов фотолуминесцирующими нк-Si, таким образом, что положение максимума спектра ФЛ,  $E$ , связано со средним размером нк-Si,  $d$ , в соответствии с эмпирической формулой (3.1). Вычисленные по формуле (3.1) средние размеры нанокристаллов составляют 3.2 нм для начальных образцов, и не изменяются после их инкубации в воде. Однако, инкубация в ПБС приводит к уменьшению размеров нанокристаллов до 2.6 нм. При этом, как видно из вставки к рисунку 5.1, интенсивность ФЛ существенно увеличивается после инкубации КНЧ в воде, что свидетельствует о пассивации центров безызлучательной рекомбинации ФЛ. После инкубации в ПБС напротив, интенсивность ФЛ значительно уменьшается, что может свидетельствовать как об образовании новых центров безызлучательной рекомбинации экситонов, так и о растворении нанокристаллов кремния.

На рисунке 5.2 представлены спектры КРС исходных НЧ-ПК, а также после 24 часов инкубации в воде и ПБС при 37 °С.



**Рисунок 5.2** Спектры КРС НЧ-ПК: исходный (черная кривая), спустя 24 часа инкубации в адиализных мешках в воде (красная кривая) и в ПБС (синяя кривая) при 37 °С. Штрихованной вертикальной линией показано положение максимума КРС c-Si.

В исходных суспензиях НЧ-ПК наблюдается характерная для нанокристаллического кремния линия рассеяния с положением максимума, сдвинутого на величину  $\Delta\omega$  относительно  $520,5 \text{ см}^{-1}$ , соответствующей продольным колебаниям оптических фононов (ТО) в c-Si (показано штрихованной линией на рисунке 5.2). Такой низкочастотный сдвиг КРС происходит из-за квантового ограничения фононов, возникающим в нанокристаллах малых размеров, и связан с их диаметром  $d$  соотношением [44.]:

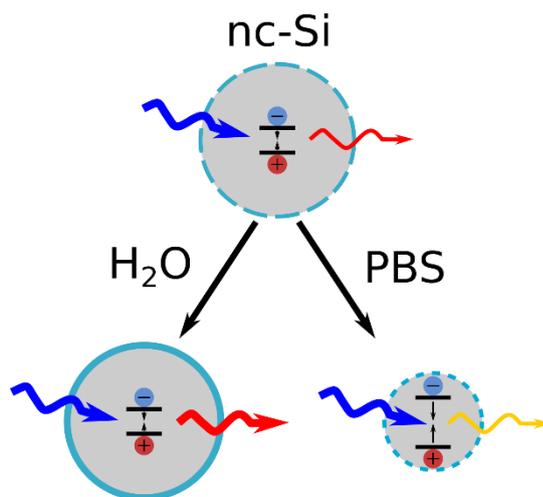
$$\Delta\omega = -52.3 \left( \frac{0.543}{d} \right)^{1.586} \quad (5.1)$$

Вычисленные по формуле (5.1) значения  $d$  составляют: для исходных нк-Si — 5.5 нм, после инкубации в воде — 3.3 нм, после инкубации в ПБС сигнала КРС не обнаружено. Отметим, что оценки размеров нк-Si, полученные методами КРС и ФЛ, могут отличаться, т. к. распределение нк-Si по размерам в НЧ-ПК достаточно широкое, а вклады нк-Si с разными размерами в интенсивности спектров обоих типов могут различаться на порядки. Тем не менее, представленные данные КРС позволяют утверждать, что при инкубации в воде происходит незначительное окисление поверхности, сопровождающееся незначительным уменьшением размеров нанокристаллов, в то время как инкубация в PBS приводит к быстрому растворению наночастиц.

Но основе полученных экспериментальных результатов предложена феноменологическая модель растворения НЧ-ПК (схематично показана на рисунке 5.3). Поверхность нк-Si после изготовления покрыта слоем  $\text{SiO}_2$ , образование которого в

процессе МСХТ сопровождается появлением дефектов - оборванных кремниевых связей, являющихся центрами безызлучательной рекомбинации экситонов (электрон-дырочных пар, образующихся при фотовозбуждении нк-Si), поэтому эффективность ФЛ свежеприготовленных НЧ-ПК мала (см изображение нк-Si в верхней части рисунка 5.3). Инкубация в воде (нижняя левая часть рисунка 5.3) приводит к пассивации дефектов, что, в свою очередь, приводит к росту интенсивности ФЛ. При этом, сформированная оксидная оболочка достаточно стабильна, и размер нк-Si меняется относительно слабо при их дальнейшей инкубации в воде, о чем свидетельствует сохранение интенсивного сигнала КРС.

Механизм растворения НЧ-ПК в ПБС иной (см нижнюю правую часть рисунка 5.3). В этом случае происходит формирование слоя аморфного оксида кремния, который в солевом растворе растворяется значительно быстрее, чем в деионизованной воде. В результате эффективность ФЛ падает, а средний размер нк-Si быстро уменьшается в процессе растворения. Уменьшение размера нк-Si приводит к сдвигу спектра в коротковолновую область.

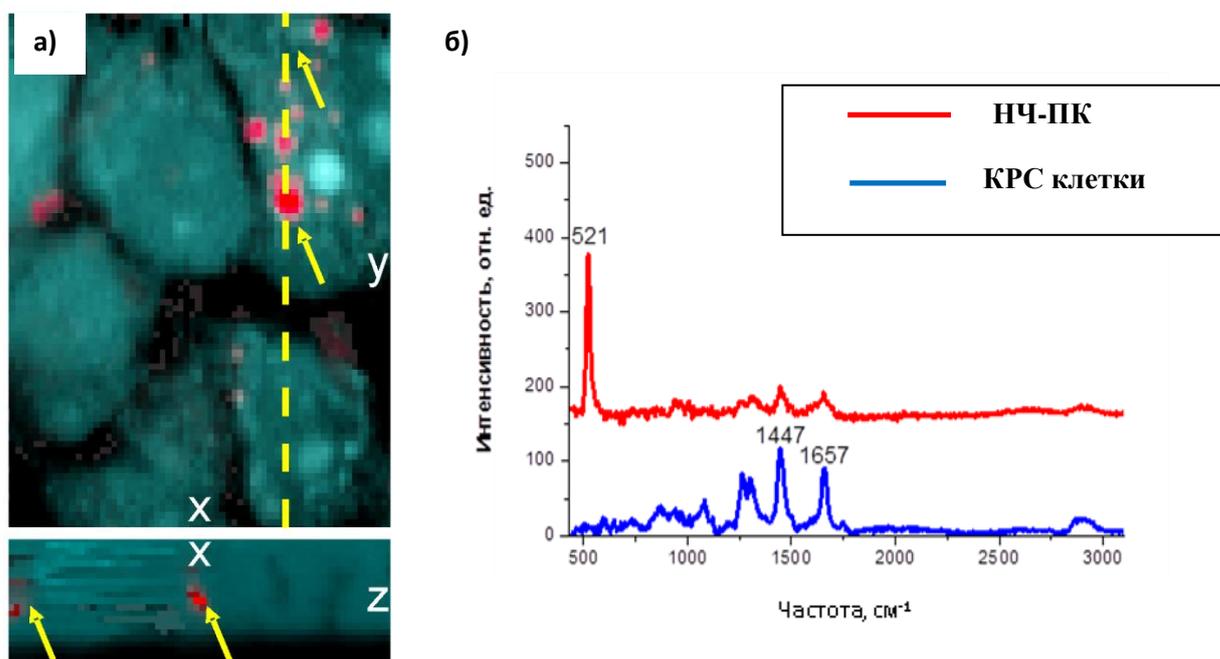


**Рисунок 5.3** Механизм растворения нк-Si (nc-Si) в воде и ПБС. Исходный нк-Si показан сверху. Голубым показана оксидная оболочка, пунктиром обозначено наличие дефектов на поверхности nc-Si, штрихованной линией обозначен слой аморфного оксида кремния. Синяя стрелка — возбуждающее излучение, красная и желтые — эмиссия. Круги со знаками «-» и «+» - электроны и дырки: экситоны, возникающие при фотовозбуждении нк-Si. Показаны также уровни энергии носителей заряда, энергетический зазор между которыми увеличивается в нк-Si в PBS. Короткие вертикальные стрелки — рекомбинация электронов и дырок в nc-Si.

## 5.2. Исследование визуализации и биодegradации пористых кремниевых наночастиц в клетках методом спектроскопии комбинационного рассеяния

Впервые в работе было показано, что нелюминесцирующие НЧ-ПК можно визуализировать в клетках с помощью спектроскопии КРС. НЧ-ПК получали измельчением пленок ПК в шаровой мельнице (см Главу 3). В данных экспериментах наночастицы инкубировались с клетками MCF-7 различные периоды времени. Спектр КРС клеток и НЧ-ПК снимался с помощью прибора WITec, Ulm, Germany (длина волны возбуждения 785 нм, мощность лазера 50 мВт).

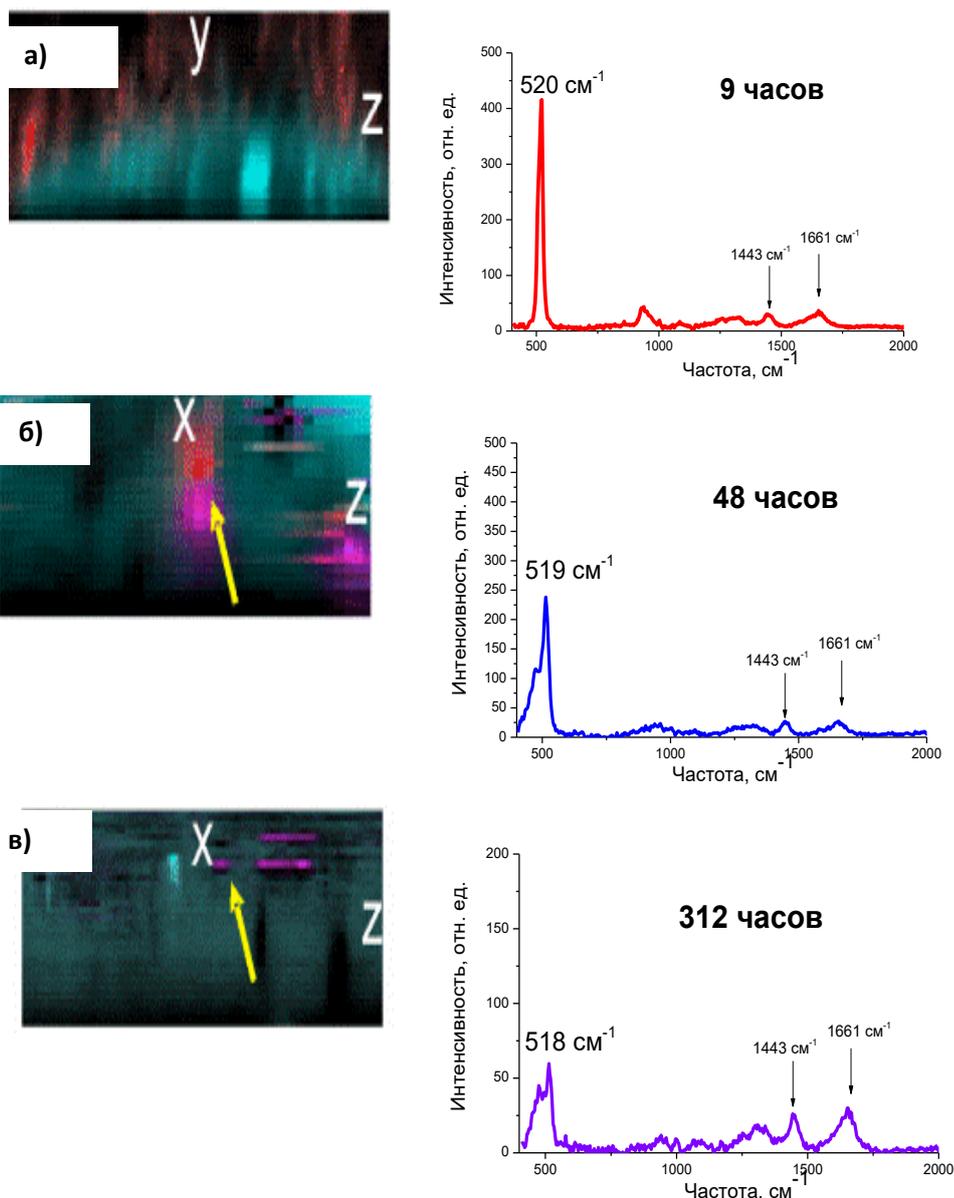
На рисунке 5.4 а представлено восстановленное из спектров КРС изображение клеток MCF-7 (синим) и находящихся в них НЧ-ПК (красные точки). Спектры КРС от наночастиц (красная кривая) и клеток (синяя кривая) представлены на рисунке 5.4 б.



**Рисунок 5.4** (а) Изображение клетки MCF-7 (синий), вид сверху (слева сверху) в разрезе клетки (слева внизу), место разреза указано пунктирной линией, и НЧ-ПК (красные точки, указаны стрелками), полученное реконструкцией их сигналов КРС. (б) Спектр КРС НЧ-ПК, находящихся внутри клетки (красная кривая) и компонентов клетки (синяя кривая).

Биодegradация НЧ-ПК в клетках MCF-7 оценивалась по сдвигу и изменению их спектра КРС, и практически была аналогичной представленным выше результатам модельных экспериментов в ПБС. На рисунке 5.5 представлены спектры КРС для наночастиц (справа), и восстановленные из спектров КРС x(y)z изображения клеток и

наночастиц (слева) (сканирование по глубине) для различных времен инкубации (9, 48, 312 часов).

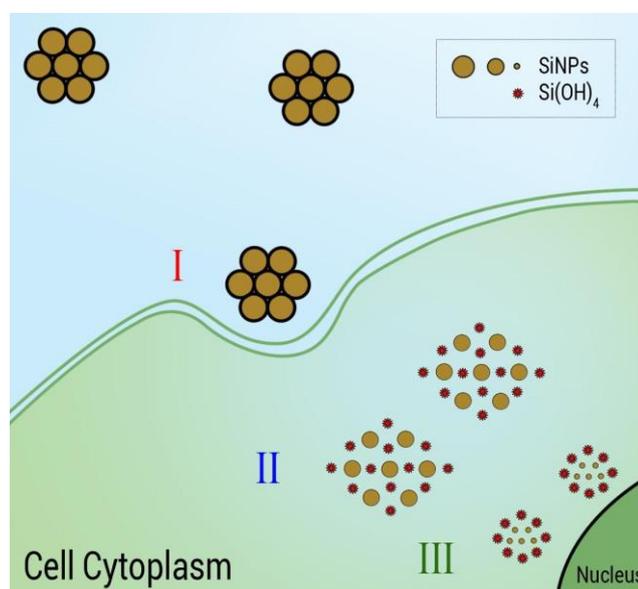


**Рисунок 5.5** Спектры КРС для НЧ-ПК (справа), и восстановленные из спектров КРС хz изображения клеток и НЧ-ПК (слева) для различных времен инкубации (а-9, б-48, в-312 часов).

Согласно данным, восстановленным по спектрам КРС (см рисунок 5.5, левый столбец), видно, что после 9 часов инкубации НЧ-ПК находятся на мембране клетки. Затем, через 24-48 часов инкубации, наночастицы проникают через клеточную мембрану и локализуются в ее цитоплазме. При этом наличие аморфной фазы кремния в спектрах КРС указывает на частичную биodeградацию образцов. Наконец, спустя 312 часов инкубации НЧ-ПК с клетками, происходит почти полная биodeградация наночастиц, о чем свидетельствуют восстановленные из спектров КРС картинки частиц в клетках, а также

резкое уменьшение интенсивности сигнала КРС частиц, его сдвиг в область меньших частот и рост аморфной составляющей.

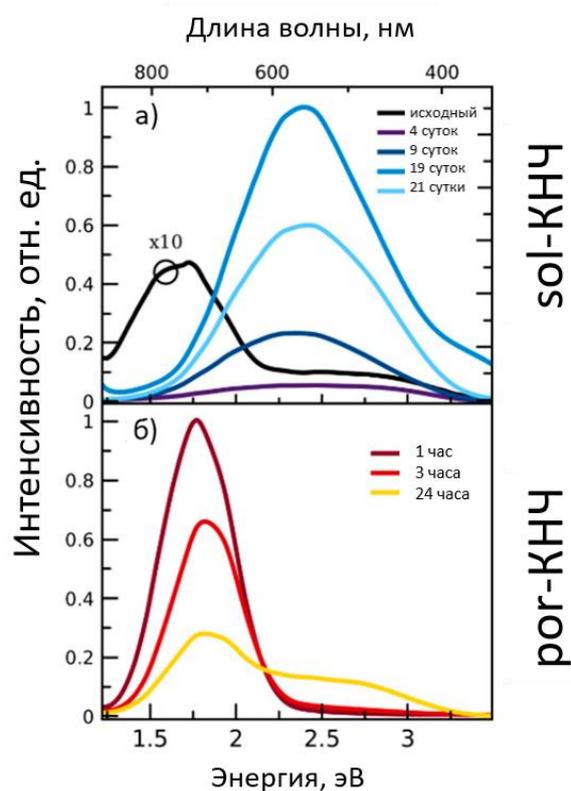
На основании проведенных исследований предложена модель захвата и биодegradации пористых кремниевых наночастиц раковыми клетками, которая представлена схематически на рисунке 5.6. После инкубации в течение 5–9 часов наночастицы локализуются на мембране клеток (Этап I на рисунке 5.6). Затем, по истечении 24 часов, наночастицы начинают проникать в цитоплазму клетки и концентрируются на периферии ядра. В этот период происходит частичная биодegradация наночастиц (Этап II на рисунке 5.6). На следующем этапе биодegradации наблюдается резкое уменьшение размеров наночастиц и их полное растворение с выделением ортокремниевой кислоты  $\text{Si}(\text{OH})_4$ , как показано на Этапе III на рисунке 5.6.



**Рисунок 5.6** Схематическое изображение процесса биодegradации НЧ-ПК в клетках, на основе данных КРС

### **5.3. Исследование растворения пористых и непористых наночастиц кремния в модельных биологических жидкостях и клеточных культурах**

В работе проводилось сравнение растворения непористых К-НЧ и пористых ПК-НЧ при их инкубации в диализных мешках в воде, фосфатно-солевом буфере  $\text{pH}=7$  (ПБС, PBS) или в живых клетках. Методика получения наночастиц описана в Главе 3. На рисунке 5.7 показано изменение спектров ФЛ и КРС образцов со временем при их инкубации в ПБС при  $37^\circ\text{C}$ .



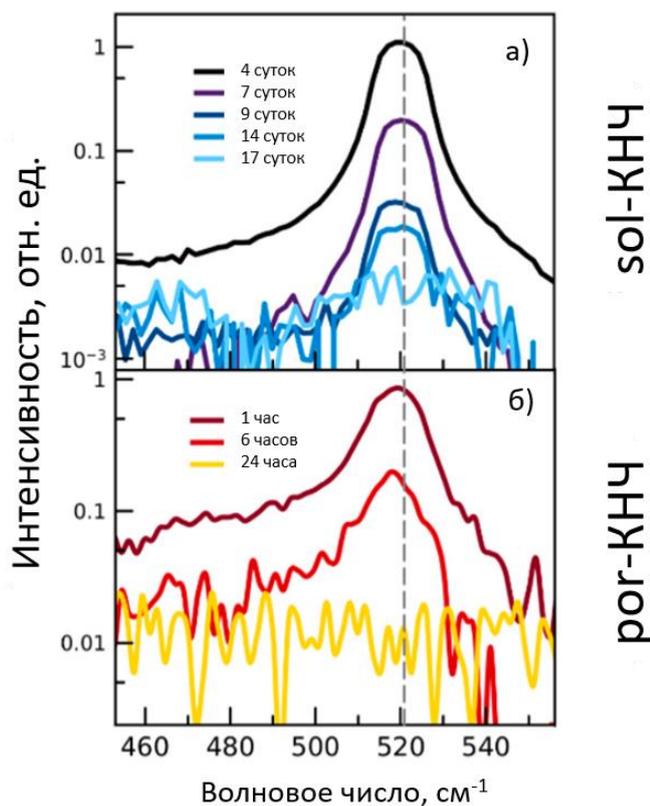
**Рисунок 5.7** Спектры фотолюминесценции а) К-НЧ и б) НЧ-ПК при инкубации в ПБС (37 °С). Цвета показывают инкубационный период. Черная кривая ФЛ для исходных К-НЧ (график А) была умножена на коэффициент 10.

Из представленных данных видно, что экситонная полоса ФЛ К-НЧ быстро исчезает после начала инкубации, поскольку тонкий слой мелких nc-Si присутствует на поверхности наночастиц лишь изначально, но он быстро растворяется, и полоса исчезает. Высокоэнергетическая полоса (2,3 эВ), слабо выраженная в спектре ФЛ исходных К-НЧ (на рисунке 5.7 а обозначен как исходный), резко увеличивается с увеличением времени инкубации. Это связано с ростом аморфного слоя, который можно рассматривать как оболочку большого не флуоресцирующего кристалла Si. Изменения интенсивности ФЛ показывают, что аморфный слой незначителен в исходных К-НЧ, затем растет в процессе инкубации (~20 суток) и, наконец, начинает растворяться после перехода всего ядра Si в аморфную фазу через 20 суток.

Аналогичные процессы происходят и с НЧ-ПК, т.е. уменьшение экситонной полосы и усиление дефектной полосы (рисунке 5.7 б). Однако структура НЧ-ПК иная: они состоят из гораздо большего количества мелких нк-Si. Таким образом, низкоэнергетическая полоса (1,7–1,8 эВ) исчезает вместе с растворением малых нк-Si, но часть из них тем не менее переходит в аморфную фазу и дает вклад в высокоэнергетические полосы (2,5–3,5 эВ).

Все экситонные полосы ФЛ могут быть использованы для оценки среднего диаметра  $\text{Si}$  в образцах. В соответствии с формулой (3.1) положения пиков для НЧ-К и НЧ-ПК соответствует размерам нс-Si в 5 нм и 3 нм, соответственно. Однако эта оценка для НЧ-К не может быть применена для оценки нк-Si во всем образце, так как она характеризует лишь малую долю мелких нанокристаллов, присутствующих на поверхности частиц. В то время как, оценки, сделанные для НЧ-ПК, дают значения хорошо согласующиеся с результатами обработки темнопольного изображения ПЭМ. Деграция частиц сопровождается уменьшением размера нанокристаллического ядра (размеры нк-Si уменьшаются с 3 нм до 2,5 нм), что видно по небольшому сдвигу экситонной полосы ФЛ в сторону более высоких энергий.

На рисунке 5.8 представлены спектры комбинационного рассеяния света от НЧ-К и НЧ-ПК со временем при их инкубации в ПБС 37 °С.



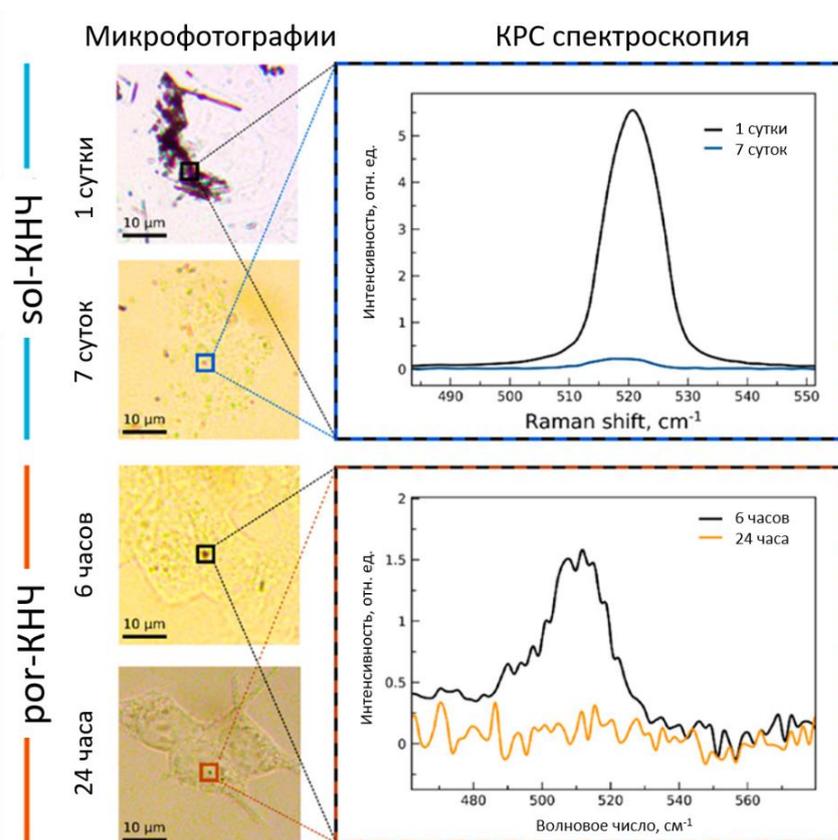
**Рисунок 5.8** Спектры комбинационного рассеяния света а) К-НЧ и б) НЧ-ПК при инкубации в ПБС (37 °С). Вертикальная пунктирная серая линия указывает на 520,5  $\text{cm}^{-1}$ , что соответствует положению полосы комбинационного рассеяния с-Si.

Нанокристаллы в К-НЧ (с диаметром  $> 7$  нм) слишком велики, чтобы их можно было описать в рамках подхода квантово-размерного ограничения, поэтому полоса комбинационного рассеяния не демонстрирует какого-либо значительного сдвига от полосы c-Si на  $520,5 \text{ см}^{-1}$  (рисунок 5.8 а) при их инкубации в ПБС. Эти данные согласуются с измерениями ПЭМ и ФЛ для К-НЧ. Вклад мелких нк-Si в общий сигнал КРС незначителен. Следовательно, пик комбинационного рассеяния не меняет своего положения на оси частот и не может быть использован для контроля процесса растворения. Таким образом, информацию о растворении К-НЧ может давать только интенсивность КРС, которая уменьшается со временем их инкубации в ПБС.

В спектрах КРС наночастиц НЧ-ПК (рисунок 5.8 б) после 1 и 6 ч инкубации наблюдается низкочастотный сдвиг максимума по сравнению с полосой c-Si, спектр уширяется, появляется плечо при  $480 \text{ см}^{-1}$ , что соответствует рассеянию света в аморфном кремнии. Диаметр нк-Si в пор-КНЧ, рассчитанный по положению максимума спектров КРС по формуле (5.1), составил около 4 нм через 1 час инкубации и около 3 нм через 6 ч. Отсутствие сигнала КРС через 24 ч инкубации свидетельствует о полном растворении НЧ-ПК.

Следовательно, как спектры комбинационного рассеяния, так и спектры ФЛ показывают, что типичное время растворения составляет около 15–21 суток для НЧ-К и 24 ч для НЧ-ПК. Различие объясняется разными размерами нк-Si, а также их различной удельной поверхностью.

На рисунке 5.9 показаны оптические изображения и спектры комбинационного рассеяния пористых и непористых наночастиц при различном времени инкубации с клетками MCF-7.



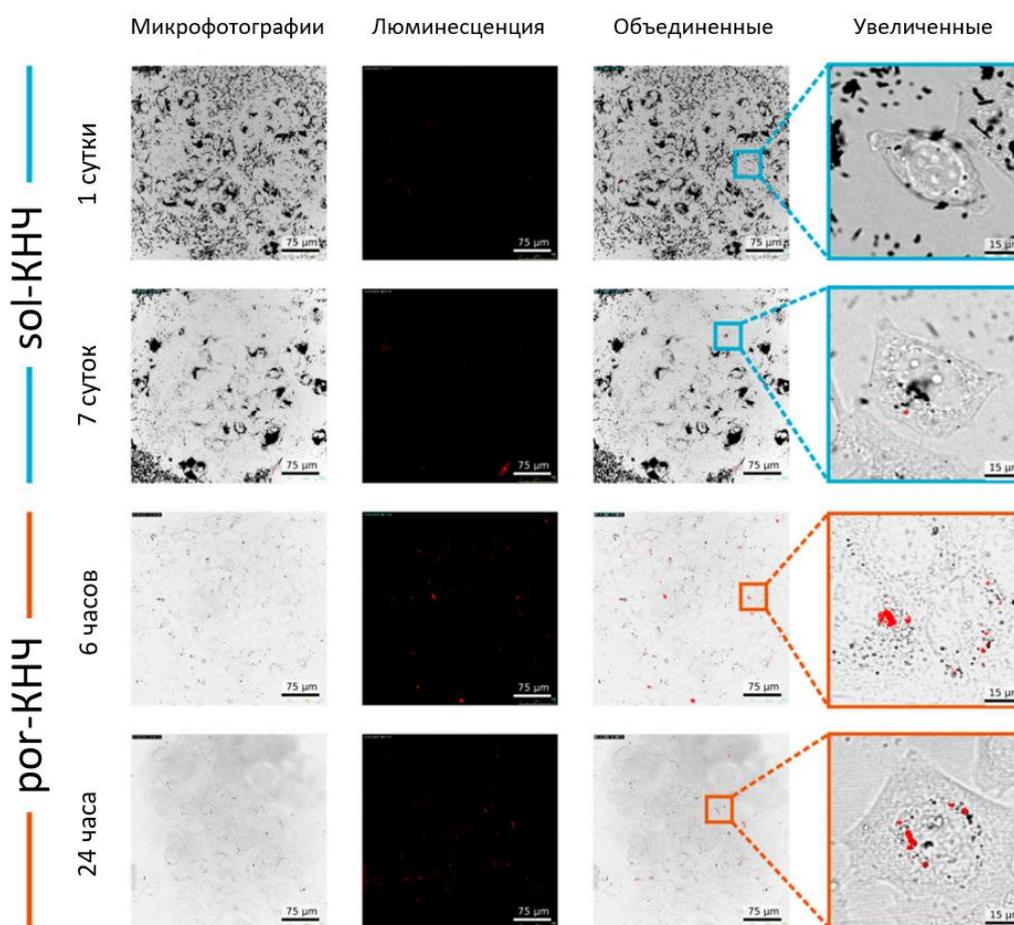
**Рисунок 5.9** Оптические микрофотографии клеток MCF-7 с наночастицами кремния (черные точки) и спектры КРС наночастиц при их инкубации с клетками в течение 1 и 7 суток для НЧ-К, и 6 и 24 ч для НЧ-ПК. Красными квадратами обведены наночастицы, из которых были получены соответствующие сигналы КРС.

Изображения НЧ-К получали через 1 и 7 суток инкубации с клетками. Из спектра КРС видно, что в течение 1 суток инкубации непористые наночастицы не растворяются. Это подтверждается также тем, что на микрофотографии клетки присутствует много темных пятен, соответствующих НЧ-К. Данным частицам соответствует интенсивная полоса КРС вблизи  $520.5 \text{ см}^{-1}$ . На следующем изображении видно, что после 7 суток инкубации количество НЧ-К в клетках намного меньше, а сигнал КРС слабее. Тем не менее, он по-прежнему четко выражен, смещения полосы не обнаружено; что согласуется с предыдущими результатами, полученными при инкубации частиц в ПБС.

Типичный спектр НЧ-ПК в клетках представляет собой суперпозицию уширенной и сдвинутой полосы нк-Si вблизи  $520 \text{ см}^{-1}$  и менее выраженной полосы аморфного оксида кремния, расположенной около  $480 \text{ см}^{-1}$ , что указывает на частичную биodeградацию НЧ-ПК уже после 6 ч их инкубации с клетками. Полная биodeградация НЧ-ПК наблюдалась через 24 ч инкубации. Были проверены все темные пятна на в клетках, однако признаков полосы комбинационного рассеяния от пс-Si не было обнаружено. Тем не менее, согласно

спектрам ФЛ, могут присутствовать некоторые очень маленькие НЧ-ПК. Такие маленькие и сильно деградировавшие НЧ-ПК могут не иметь контраста в КРС визуализации, в то время как от них можно наблюдать ФЛ. Данные, полученные с помощью КРС визуализации НЧ-ПК в клетках, также согласуются с экспериментом для ПБС.

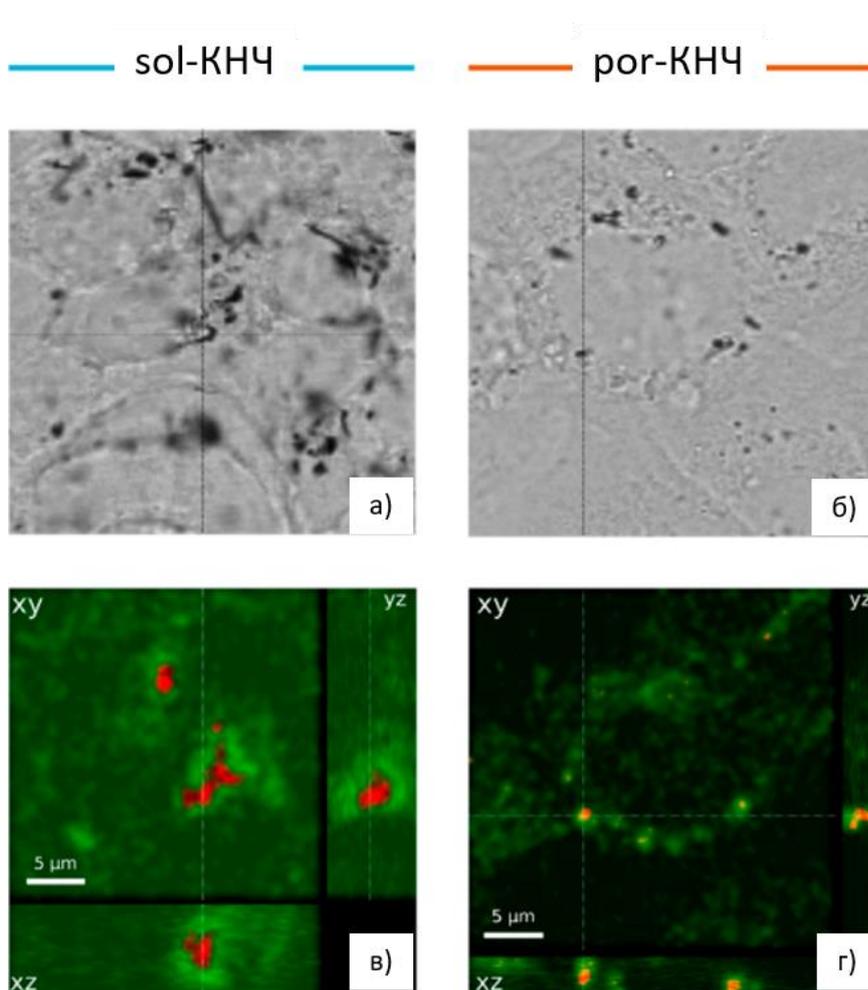
Метод люминесцентной визуализации лучше применим к НЧ-ПК из-за большего количества в них мелких люминесцентных нк-Si, чем для НЧ-К. На рисунке 5.10 показаны микрофотографии клеток MCF-7 (первый столбец), флуоресценция (второй столбец), объединенные изображения (третий столбец) и выбранное увеличение объединенных изображений (четвертый столбец).



**Рисунок 5.10** Микрофотографии клеток MCF-7 (первый столбец), флуоресценция (второй столбец), объединенные изображения клеток и ФЛ (третий столбец) и увеличенные фрагменты объединенных изображений (четвертый столбец) с инкубированными НЧ-К и НЧ-ПК.

НЧ-К через 1 сутки инкубации с клетками проявляют слабую люминесценцию. Однако через 7 суток инкубации с клетками ФЛ увеличивается, и НЧ-К становятся более заметными. Напротив, НЧ-ПК детектируются в большом количестве внутри цитоплазмы клеток сразу после 9 ч инкубации. Через 24 ч происходит биодеградация por-КНЧ, и их сигнал ФЛ намного слабее (меньше красных точек по сравнению с инкубацией в 9 ч).

Важным вопросом для правильной интерпретации полученных результатов является проверка успешной интернализации наночастиц в клетки. На рисунке 5.11 показаны три вида поперечного сечения трехмерного сканирования клеток, которые показывают, что наночастицы действительно расположены внутри клеток, а не на поверхности чашки Петри или над клетками. Чаще всего частицы локализуются в области, окружающей клеточные ядра. Клетки визуализируются по их автофлуоресценции.



**Рисунок 5.11** Сверху – оптическая микрофотография клеток MCF-7, инкубированных с НЧ-К и НЧ-ПК в течение 9 ч. Снизу – конфокальные изображения интернализированных НЧ-К и НЧ-ПК в той же клетке. Красные точки на фотографии соответствуют наночастицам,

зеленые – аутофлуоресценции клеток. Все три сечения в трехмерном пространстве показаны для того, чтобы показать, что частицы действительно находятся внутри клеток.

Таким образом, в ходе исследований проведено сравнение процессов растворения пористых и непористых кремниевых наночастиц в условиях инкубации в диализных мешках в модельных биологических жидкостях и в живых клетках. Полученные результаты показали, что пористые наночастицы растворяются значительно быстрее, чем непористые, что объясняется их более высокой удельной поверхностью и меньшими размерами нанокристаллов. Спектральные методы, такие как ФЛ и КРС, продемонстрировали различия в поведении наночастиц в процессе растворения. Исчезновение экситонной полосы ФЛ указывает на постепенное растворение нанокристаллов кремния, тогда как усиление дефектной полосы связано с ростом аморфного оксидного слоя. Спектры КРС позволили наблюдать изменения структуры наночастиц на различных стадиях их растворения, что подтверждало результаты ФЛ. В условиях инкубации в живых клетках было показано, что пористые наночастицы быстрее интернализуются и деградируют, что делает их более перспективными для биомедицинских приложений. Эти результаты подчеркивают важность выбора типа наночастиц в зависимости от требуемой скорости деградации и задач терапевтического или диагностического применения.

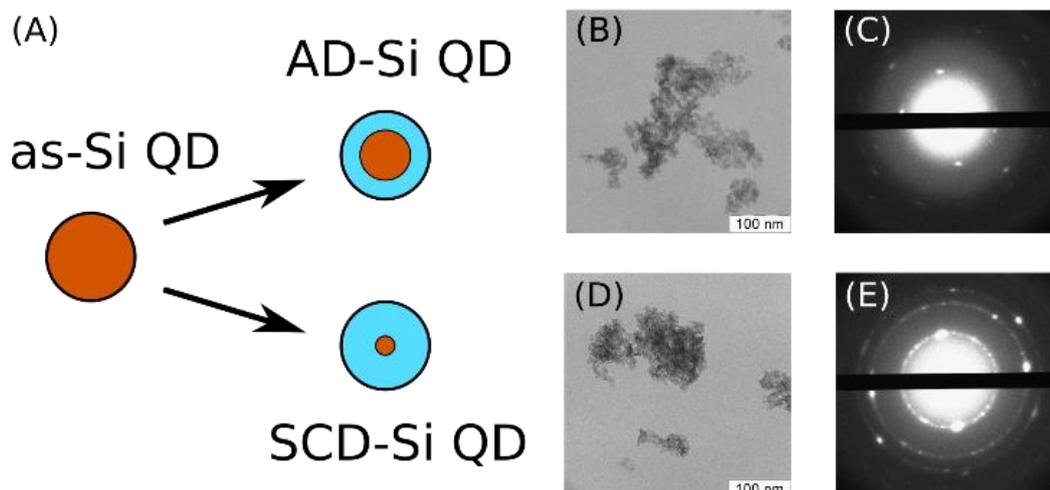
#### **5.4. Влияние метода сушки и предварительной обработки поверхности наночастиц пористого кремния на их цитотоксичность и скорость растворения в модельных жидкостях и живых клетках**

Регулирование скорости биodeградации НЧ-ПК имеет ключевое значение для их применения в диагностике и терапии. Способность контролировать скорость их растворения позволяет адаптировать их характеристики для специфических биомедицинских задач, таких как длительная визуализация или адресная доставка лекарств.

Образцы НЧ-ПК изготавливались измельчением пленок ПК. После окончания процесса травления пленки ПК промывали в метаноле для удаления остатков раствора HF и сушили на горячей пластине при температуре около 60 °C для дальнейшей воздушной сушки (AD) или хранили в этаноле для последующей сверхкритической сушки (SCD). Для AD-НЧ-ПК пленки ПК измельчались в планетарной шаровой мельнице Fritsch Pulverisette 6 при 300 об/мин в течение 1 минуты, а затем помещались в вращающуюся печь Carbolite

HTR 11/75 при температуре 600-700 °C на 16 часов в атмосфере с 1% кислорода (остальная часть – азот). Для SCD-НЧ-ПК пленки заполнялись жидким CO<sub>2</sub>, а затем подвергались стандартной процедуре высушивания в критической точке с использованием сушилки Quorum K850, как было описано ранее. Затем их окисляли в тех же условиях, что и при процессе AD. Наконец, обе пробы дополнительно сушили при 120 °C в течение 24 часов в вакуумной печи, после чего хранили на воздухе при комнатной температуре. Перед экспериментом полученные порошки частиц измельчали в агатовом ступке в течение 2-5 минут.

На рисунке 5.12 а представлена схематическая иллюстрация нк-Si в свежеприготовленной НЧ-ПК (as-нк-Si) и ее структура «ядро-оболочка», которые возникают после процессов сушки наночастиц на воздухе (AD-нк-Si) или сверхкритической сушки (SCD- нк-Si), затем измельчения и отжига при температуре 600 °C в течение 16 часов в среде с 1% кислорода.



**Рисунок 5.12** а) Схематическое изображение свежеприготовленного нанокристалла кремния (as- нк-Si) и его структуры "ядро-оболочка" после сушки на воздухе (AD-нк-Si) или сверхкритической сушки (SCD- нк-Si), а также последующего измельчения и отжига при температуре 600 °C в течение 16 часов в атмосфере с содержанием 1% кислорода. б) Изображение ПЭМ AD-нк-Si. в) Электронная дифракционная картина AD-нк-Si. г) Изображение ПЭМ SCD- нк-Si. д) Электронная дифракционная картина SCD-нк-Si.

Согласно микрофотографиям ПЭМ, представленным на рисунке 5.12 б, г, частицы обоих типов состоят из мелких кремниевых нанокристаллов и пор. Кристалличность частиц была подтверждена результатами электронной дифракции, полученными в геометрии "на прохождение" (рисунок 5.12 в, д). Стоит отметить, что на дифракционной картине SCD- нк-Si наблюдается больше ярких точек, расположенных на дифракционных кольцах, по

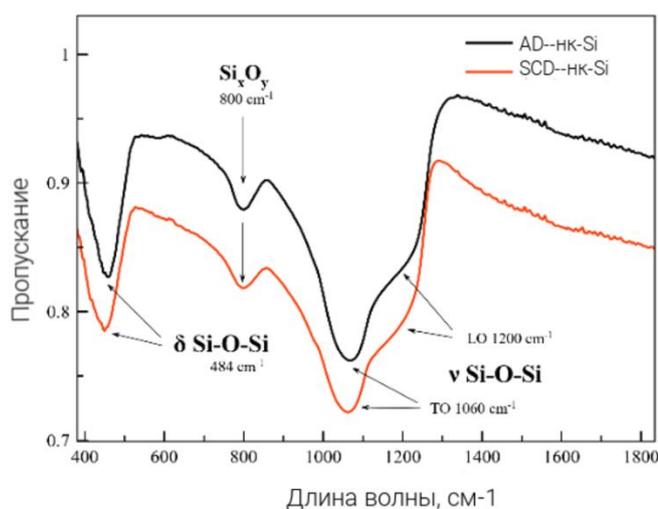
сравнению с AD-нк-Si, что свидетельствует о большей поликристалличности их структуры. Распределение размеров нк-Si внутри частиц было рассчитано по темнопольным изображениям ПЭМ. Средний диаметр AD- и SCD- нк-Si составил 4 нм и 2,5 нм соответственно. Для определения таких параметров наночастиц, как их удельная поверхность, объем пор и их диаметров, был проведен анализ адсорбции/десорбции азота (см. таблицу 5.1).

**Таблица 5.1.** Анализ адсорбции азота для термически пассивированных нк-Si после сушки на воздухе (AD) и сверхкритической сушки (SCD).

Тип образца	AD- нк-Si	SCD- нк-Si
Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	224	365
Объем пор, см <sup>3</sup> /г	0.91	1.762
Диаметр пор, нм	15,3	17,2

Большие значения удельной поверхности для SCD- нк-Si по сравнению с AD- нк-Si указывают на менее выраженное сжатие пор в этих образцах во время процесса сушки.

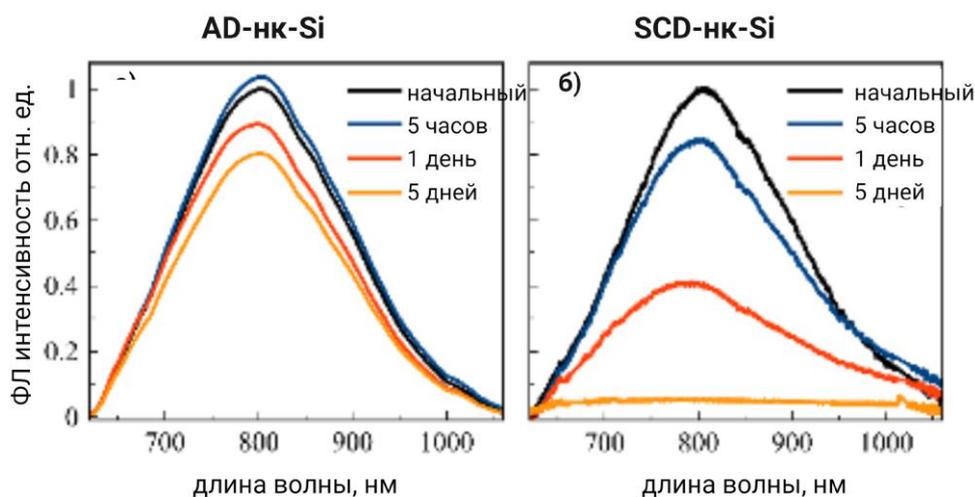
Спектры ИК пропускания для AD- и SCD-нк-Si представлены на рисунке 5.13. ИК-спектры обоих образцов показывают наличие различных полос поглощения, которые соответствуют деформационным колебаниям  $\delta$ Si-O-Si на 484 см<sup>-1</sup>, колебаниям Si<sub>x</sub>O<sub>y</sub> на 800 см<sup>-1</sup>, колебаниям  $\nu$ Si-O-Si поперечные на 1060 см<sup>-1</sup> и продольные на 1200 см<sup>-1</sup>. Таким образом, обе структуры имеют схожую поверхностную химию.



**Рисунок 5.13** Спектры ИК пропускания AD-нк-Si (черный) и SCD-нк-Si (красный).

По результатам ПЭМ и ИК анализов, и AD-нк-Si, и SCD-нк-Si обладают структурой "ядро-оболочка", где ядро состоит из Si нанокристалла (или квантовой точки кремния), а оболочка — из слоя SiO<sub>2</sub>.

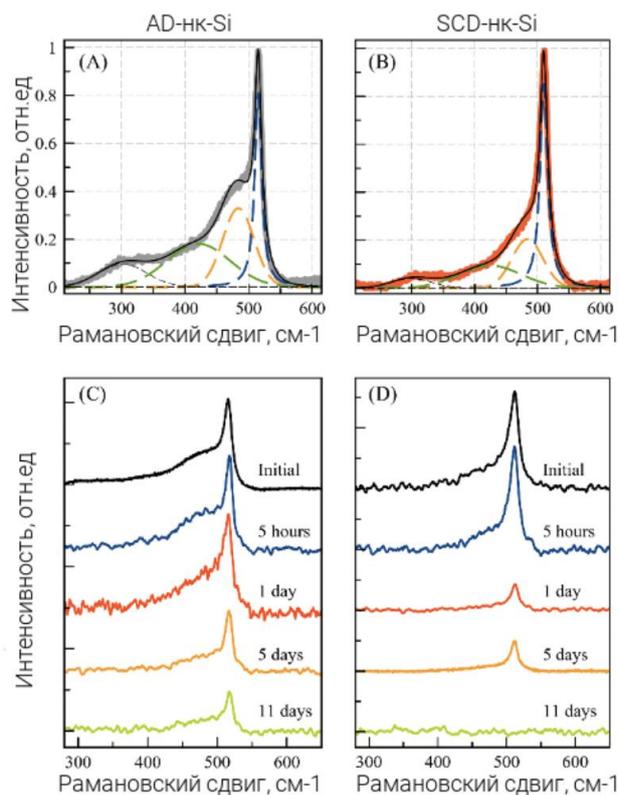
Изменения в спектрах ФЛ в процессе хранения образцов в диализном мешке в ПБС при комнатной температуре (RT) представлены на рисунке 5.14.



**Рисунок 5.14** Спектры ФЛ AD-нк-Si а) и SCD-нк-Si б) в различные времена хранения образцов в диализном мешке в ПБС при комнатной температуре.

Оба образца характеризуются широкими спектрами ФЛ с максимумом около 800 нм, что хорошо объясняется радиационной рекомбинацией экситонов, локализованных в нк-Si размером около 2-6 нм. В процессе растворения интенсивность ФЛ AD-нк-Si незначительно увеличивалась в течение первых 5 часов инкубации, что можно объяснить пассивацией оборванных связей кремния. Затем, по мере дальнейшей инкубации образцов в течение 5 дней, наблюдалось небольшое затухание ФЛ, что свидетельствует о стабильности ФЛ свойств AD-нк-Si. В противоположность этому, интенсивность ФЛ SCD-нк-Si значительно уменьшилась и сместилась в синюю область уже после одного дня инкубации, а через 5 дней полностью исчезла. Это связано с уменьшением размеров SCD-нк-Si и их полным растворением в растворе ПБС.

На рисунке 5.15 представлены КРС образцов AD-нк-Si а) и SCD-нк-Si б), а также изменения в этих спектрах в процессе хранения образцов в диализном мешке в растворе PBS при комнатной температуре (C, D).



**Рисунок 5.15** Спектры КРС AD-нк-Si а) и SCD-нк-Si б). Изменения в КРС спектрах образцов в различные времена хранения в диализном мешке в ПБС при комнатной температуре в,г).

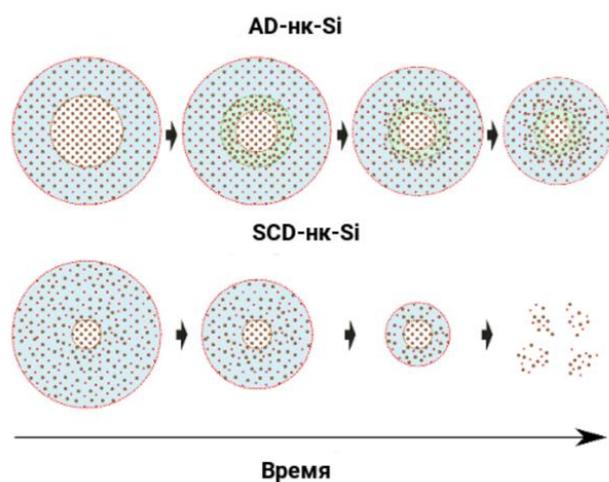
Средний диаметр кристаллического ядра, рассчитанный по уравнению, составляет около 4-5 нм для исходных AD-нк-Si и около 2 нм для исходных SCD-нк-Si. Незначительное различие в размерах нанокристаллов, рассчитанных по данным ФЛ и КРС/ТЕМ, можно объяснить более высокой квантовой эффективностью ФЛ для больших нк-Si по сравнению с малыми, а также тем, что многие из нк-Si могут не светиться. Таким образом, можно предположить, что определение размеров нк-Si по их спектрам КРС более точно для всей совокупности частиц. Деконволюция спектров комбинационного рассеяния (КРС) с помощью гауссовых функций выявила наличие полос, характерных для аморфного кремния (a-Si) при  $480\text{ см}^{-1}$  и  $328\text{ см}^{-1}$ , а также полосы аморфного диоксида кремния ( $\text{SiO}_2$ ) при  $420\text{ см}^{-1}$ . По полученным результатам видно, что доля аморфных компонентов выше у AD-нк-Si по сравнению с SCD-нк-Si, что объясняется повреждением структуры под действием капиллярных сил в AD-нк-Si, чего удастся избежать в SCD-нк-Si.

Анализ спектров комбинационного рассеяния, представленных на рисунке 5.15, показывает, что AD-нк-Si обладают высокой стабильностью и медленным растворением в используемых условиях. Это подтверждается высокой интенсивностью сигнала, которая снижается в два раза только спустя 11 дней инкубации. Рост плеча аморфной полосы при

480  $\text{cm}^{-1}$  указывает на дополнительную аморфизацию образца AD-нк-Si в процессе растворения.

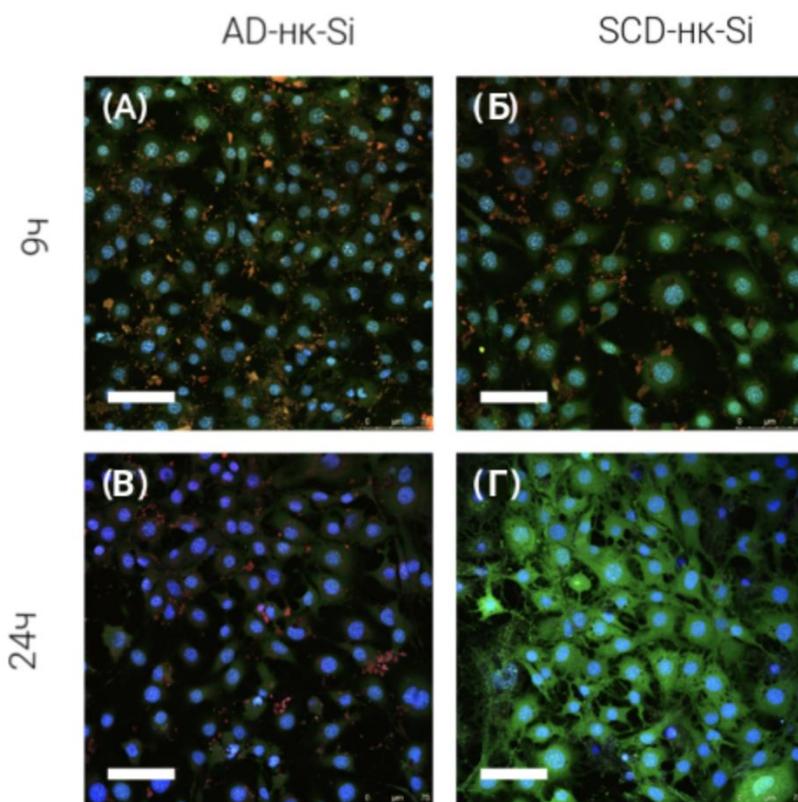
В отличие от них, SCD-нк-Si растворяются значительно быстрее. Уже через 5 дней интенсивность сигнала падает в три раза, а через 11 дней сигнал полностью исчезает, что свидетельствует о полном растворении частиц. При этом аморфизация нанокристаллов не наблюдалась, что можно объяснить их изначально небольшим размером нанокристаллического кремниевого ядра в SCD-нк-Si.

Схематическое изображение процесса растворения нк-Si, основанное на этих измерениях КРС, представлено на рисунке 5.16.



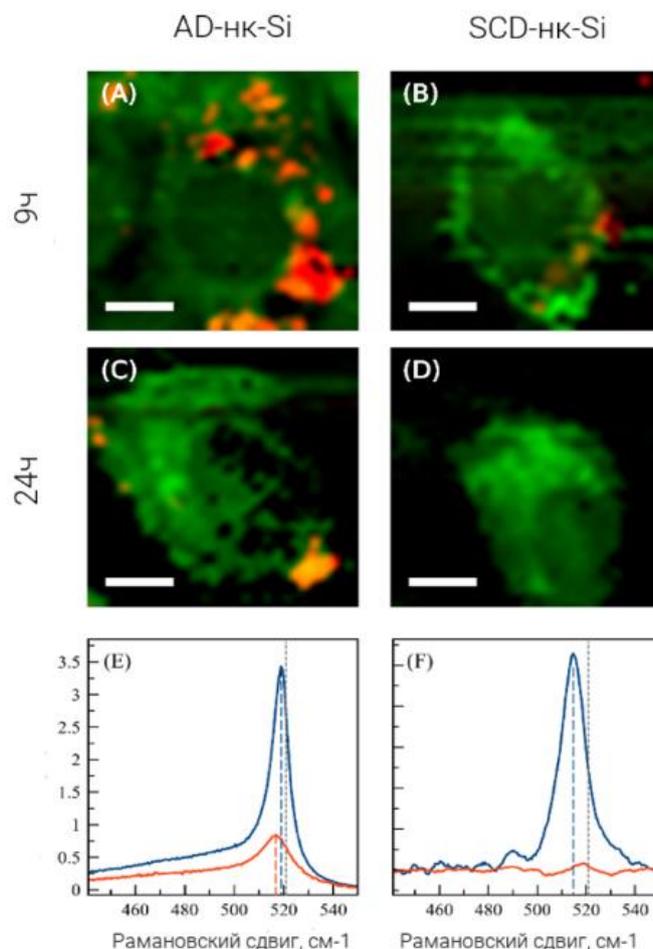
**Рисунок 5.16** Схематическое представление процесса растворения AD-нк-Si и SCD-нк-Si. Нанокристаллическое ядро кремния показано коричневым цветом, слой  $\text{SiO}_2$  — синим, а аморфный слой — зеленым.

Наличие фотолюминесцентных свойств у полученных нк-Si позволяет использовать их в качестве люминесцентных меток для визуализации клеток. На рисунках 5.17 а и б представлены конфокальные люминесцентные изображения клеток 3Т3 НИН после 9 часов инкубации с нк-Si. На изображениях четко видно эффективное свечение как AD-, так и SCD- нк-Si, локализующихся на мембранах клеток и в цитоплазме.



**Рисунок 5.17** Конфокальные люминесцентные изображения клеток 3Т3 НИИ, инкубированных с 200 мг/мл AD-нк-Si и SCD-нк-Si: а и б — после 9 часов инкубации, в и г — после 24 часов. Масштабная линейка: 75 мкм.

Из микрофотографий 5.17 в и г отчетливо видно, что спустя 24 часа инкубации AD-нк-Si сохраняют свою ФЛ, в то время как SCD-нк-Si больше не видны. Чтобы понять, связано ли это исчезновение ФЛ с полным растворением SCD-нк-Si или с появлением центров безызлучательной рекомбинации экситонов в процессе инкубации, были проведены измерения спектров КРС образцов внутри клеток, которые представлены на рисунке 5.18.



**Рисунок 5.18** Изображения КРС клеток 3Т3 NIH, инкубированных с 200 мг/мл AD-нк-Si и SCD-нк-Si: а и б — после 9 часов инкубации, в и г — после 24 часов. Масштабная линейка: 10 мкм. Соответствующие спектры КРС AD-нк-Si д) или SCD-нк-Si е) после 9 и 24 часов инкубации с клетками.

Следует обратить внимание, что изображения КРС клеток, представленные на рисунке 5.18, были получены на основе спектров комбинационного рассеяния света от клеток и нк-Si. Зеленый цвет на изображениях (а-г) соответствует компонентам клетки в спектре КРС: амид-I на  $1632\text{ см}^{-1}$  и полоса деформации  $\text{CH}_2$  на  $1452\text{ см}^{-1}$ .

Спектры КРС для AD-нк-Si и SCD-нк-Si, измеренные непосредственно внутри клеток, представлены на рисунке 5.18 (д, е). Для AD-нк-Si размер нанокристаллического ядра, рассчитанный по формуле 5.1, составлял 5 нм после 9 часов и уменьшался до 2,8 нм после 24 часов инкубации с клетками. Наряду с низкочастотным сдвигом максимума КРС, наблюдается снижение интенсивности сигнала и увеличение аморфной фазы, что свидетельствует о частичном растворении нанокристаллов.

Для SCD-нк-Si размер нанокристаллического ядра составлял 2 нм после 9 часов инкубации, и через 24 часа сигнал КРС полностью исчезал, указывая на их полное

растворение. Полученные результаты подчеркивают значительное влияние предварительной обработки поверхности на скорость растворения люминесцентных наночастиц.

Впервые в представленной работе была применена комбинация методов люминесцентной и КРС микроспектроскопии для изучения скорости растворения нанокристаллов кремния в живых клетках. Полученные результаты показали, что предварительная обработка поверхности оказывает значительное влияние на скорость растворения нанокристаллов, что делает их подходящими для разработки систем контролируемой доставки лекарственных препаратов. Такие системы могут обеспечить более точное высвобождение лекарств в целевых участках, например, в зонах опухолей, минимизируя при этом негативное воздействие на здоровые ткани.

## **Глава 6. Биосовместимые наночастицы пористого кремния как эффективные сенсители терапевтического ультразвука для уничтожения раковых клеток и бактерий**

Наночастицы пористого кремния являются перспективным материалом для применения в биомедицинских исследованиях благодаря их уникальным физико-химическим свойствам в сочетании с биосовместимостью и биodeградируемостью. В представленной главе исследуется способность НЧ-ПК снижать порог акустической кавитации, что показано открывает возможность для управления цитотоксическими свойствами наночастиц, включая разрушение раковых клеток и бактерий при совместном воздействии на них наночастицами и ультразвуком. В представленной главе исследована кавитационная активность водных суспензий НЧ-ПК с различной степенью гидрофильности/гидрофобности поверхности, что является важным для понимания механизмов их взаимодействия с ультразвуковыми волнами.

### **6.1. Исследование кавитационной активности водных суспензий пористых кремниевых наночастиц с различной степенью гидрофобности поверхности**

Для исследования кавитационной активности были подготовлены суспензии трёх типов наночастиц пористого кремния – гидрофильные наночастицы (гфил-НЧ-ПК), гидрофобные наночастицы (гфоб-НЧ-ПК), и амфифильные наночастицы (амфил-НЧ-ПК).

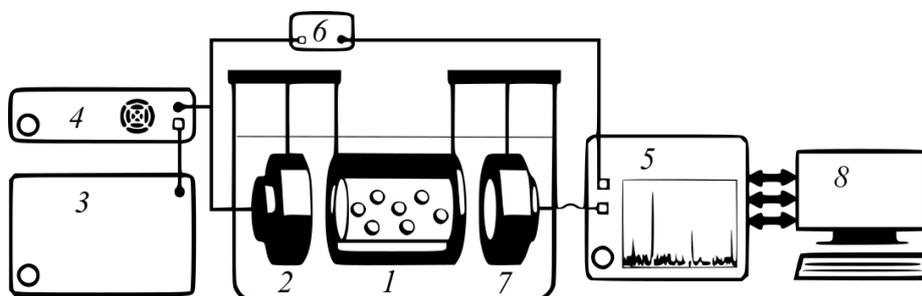
Измерения порогов акустической кавитации проводились в гидробассейне, заполненном отстоявшейся водой (рис. 6.1a). Суспензия НЧ-ПК заливалась в цилиндрическую кювету 1, изготовленную из плексигласа с внутренним диаметром 15 мм и длиной 20 мм. Торцы кюветы заклеивались тонкой звукопрозрачной пленкой. Ультразвуковой (УЗ) пучок, сформированный пьезоэлектрическим излучателем 2 с резонансной частотой 2,08 МГц и диаметром 10 мм, направлялся через кювету с суспензией наночастиц. Для возбуждения излучателя 2 использовалось переменное напряжение, генерируемое сигналом с генератора 3 Tektronix AFG3021B, усиленным широкополосным усилителем мощности 4. Амплитуда напряжения, подаваемого на излучатель, измерялась с помощью осциллографа 5 Tektronix TDS3032B, подключённого через делитель напряжения 6. Ультразвуковые волны, проходившие через суспензию и рассеянные на неоднородностях и кавитационных пузырьках, регистрировались пьезоэлектрическим приёмником 7 с резонансной частотой 1,04 МГц, а сигнал фиксировался осциллографом 5.

Излучатель 2 размещался на расстоянии 5 мм от торца кюветы, в то время как приёмник 7 находился на расстоянии не менее 20 см от противоположного торца. Такое расположение обеспечивало условия для формирования бегущих волн в кювете, что исключало образование стоячих волн между излучателем и приёмником. Дифракционный максимум давления для УЗ пучка диаметром 10 мм при частоте 2,08 МГц находился на расстоянии 33 мм от излучателя, что было на 3 мм ближе к дальнему торцу кюветы. Таким образом, дифракционной расходимостью пучка можно было пренебречь, считая, что амплитуда давления в пределах поперечного сечения пучка была постоянной.

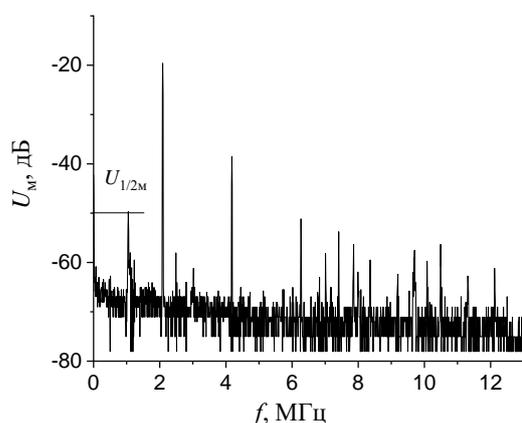
Амплитуда давления УЗ волны определялась по радиационному давлению на поглотитель, и на основании этих данных строилась зависимость амплитуды давления от подаваемого на излучатель напряжения. Это позволяло с высокой точностью измерять амплитуду давления УЗ волны при возникновении кавитации. Генератор сигналов 3 и осциллограф 5 были подключены к персональному компьютеру 8, через который осуществлялся сбор данных и управление экспериментом с использованием программы, написанной на платформе LabVIEW.

Порог кавитации определялся по амплитуде давления УЗ волны, при которой в спектре сигнала, регистрируемого приёмником, появлялась субгармоника основной частоты с заметной амплитудой. Частота приёмника 7 (1,04 МГц) совпадала с частотой субгармоники излучаемой волны, что обеспечивало высокую чувствительность метода регистрации кавитации. Спектр сигнала приёмника вычислялся с использованием

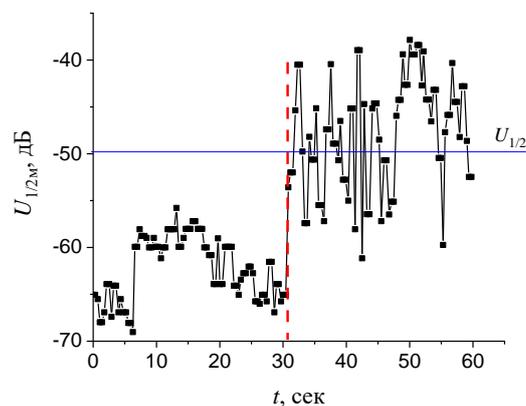
встроенного в осциллограф 5 блока быстрого преобразования Фурье (БПФ). Для вычисления спектра использовалась временная реализация длительностью 0,1 мс (10 000 точек), что давало разрешение спектра с дискретностью 20 кГц.



*a*



*б*



*в*

**Рисунок 6.1** Экспериментальная установка для измерения порогов акустической кавитации (*a*). 1 – кювета с суспензией, 2 – УЗ излучатель, 3 – генератор сигналов, 4 – усилитель мощности, 5 – осциллограф, 6 – делитель напряжения, 7 – УЗ приёмник, 8 – персональный компьютер. Спектр сигнала, зарегистрированного приёмником в фиксированный момент времени в режиме кавитации (*б*). Зависимость амплитуды субгармоники (суспензия типа А,  $P_{ак} = 313$  кПа) от времени после начала излучения (*в*). Начиная с 31-й секунды амплитуда субгармоники резко возрастает, что соответствует началу инерционной кавитации.

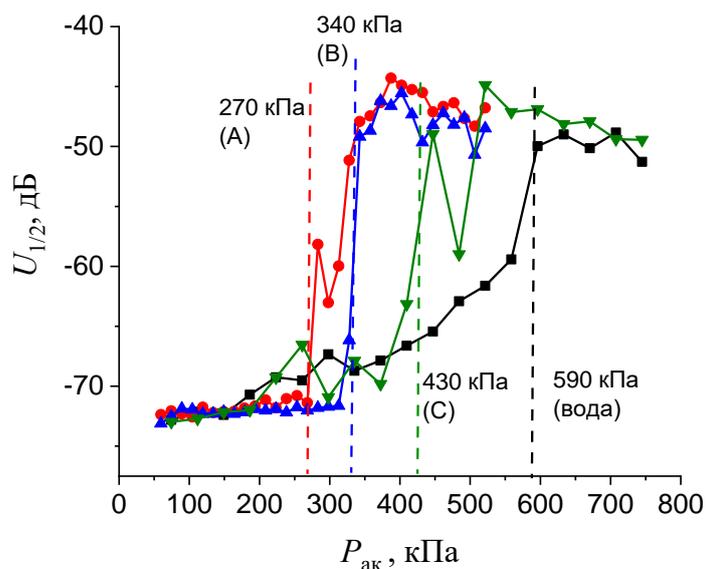
Измерения проводились в автоматическом режиме по следующему алгоритму. На начальном этапе на ультразвуковой излучатель подавалось напряжение, при котором амплитуда давления  $P_{ак}$  излучаемой волны была заведомо меньше порога кавитации  $P_{пор}$ . Ультразвуковое воздействие продолжалось в течение 60 секунд, после чего делалась пауза

продолжительностью 30 секунд, в течение которой излучение не подавалось. В этот период кавитационные пузырьки, образовавшиеся в суспензии, выходили за пределы зоны облучения, подготавливая жидкость к следующему циклу измерений. По окончании паузы напряжение на излучателе увеличивалось на фиксированную величину, что приводило к росту амплитуды давления. Шаг увеличения давления составлял от 5 до 6 кПа. Процесс прекращался при достижении  $P_{ак} \approx 650$  кПа. Спектр акустического сигнала  $U_m$ , зарегистрированного приемником в определённый момент времени, измерялся и записывался в память компьютера с дискретностью 0.4 сек. Здесь индекс «м» означает мгновенный. Отметим, что мгновенная амплитуда субгармоники  $U_{1/2m}$  сильно флуктуирует от реализации к реализации, что обусловлено стохастическим характером её генерации и постоянно флуктуирующим числом кавитационных пузырьков. На рис.1в показана зависимость амплитуды субгармоники  $U_{1/2m}$  от времени при амплитуде  $P_{ак} \approx P_{пор}$ . Сразу после начала излучения ( $t=0$ ) амплитуда субгармоники флуктуирует на уровне шума (-65 дБ), затем, начиная с 31-й секунды, ее значение резко возрастает и флуктуирует относительно более высокого уровня (-50 дБ). Для каждого значения амплитуды давления  $P_{ак}$  вычислялось значение субгармоники  $U_{1/2}$ , усреднённое по интервалу времени  $T$ , в течение которого наблюдалось превышение амплитуды субгармоники над шумом:

$$U_{1/2} = \frac{1}{T} \int_0^T U_{1/2m}(t) dt$$

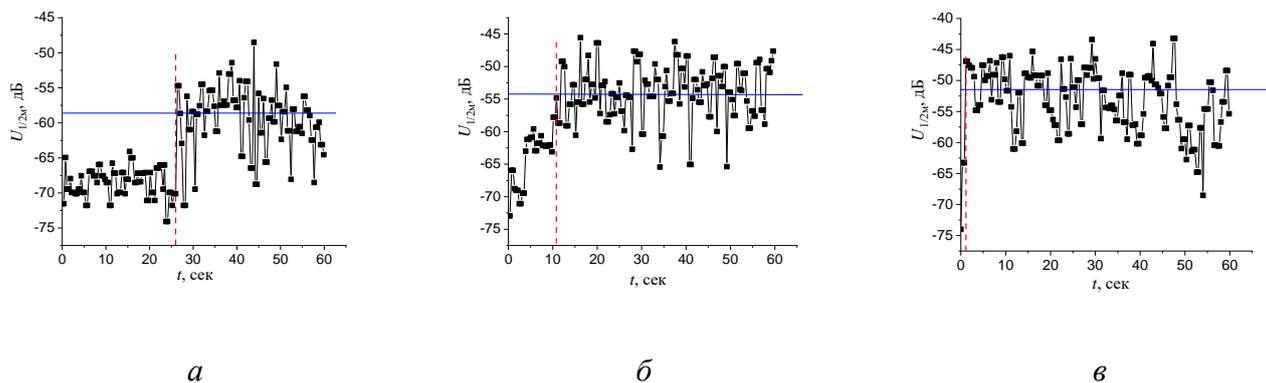
, где  $U_{1/2m}(t)$  – мгновенное значение амплитуды субгармоники. Если скачкообразного роста  $U_{1/2m}(t)$  не наблюдалось, то в качестве  $U_{1/2}$  использовалось среднее значение шума.

На рис.3 показаны результаты измерений порогов акустической кавитации  $P_{пор}$  в свежеприготовленных суспензиях гфил-НЧ-ПК, гфоб-НЧ-ПК и амфил-НЧ-ПК. Концентрация НЧ-ПК составляла 1 мг/мл. Значения пороговых значений акустического давления, где наблюдался резкий скачок амплитуды субгармоники в суспензии, отмечены штриховыми линиями. Наименьший порог  $P_{пор} = 270 \pm 3$  кПа был зарегистрирован в суспензии типа гфил-НЧ-ПК. В суспензиях гфоб-НЧ-ПК и амфил-НЧ-ПК значения  $P_{пор}$  были выше и составляли  $340 \pm 4$  кПа и  $430 \pm 4$  кПа соответственно. В деионизированной воде, которая использовалась для приготовления суспензий,  $P_{пор} = 590 \pm 4$  кПа. Погрешность измерения пороговых значений не превышала 3%.



**Рисунок 6.2** Зависимости амплитуды субгармоники  $U_{1/2}$  от амплитуды акустического давления, измеренные в свежеприготовленных суспензиях пКНЧ (гфил-НЧ-ПК, гфоб-НЧ-ПК и амфил-НЧ-ПК) с концентрацией 1 мг/мл. Символами показаны измерения в суспензиях амфил-НЧ-ПК (●), гфоб-НЧ-ПК (▲), гфил-НЧ-ПК (▼) и в дистиллированной воде (■). Штриховыми линиями отмечены пороги акустической кавитации.

Следует отметить, что при пороговых амплитудах давления кавитация не возникает мгновенно после начала ультразвукового воздействия, а начинается с определённой задержкой (рисунок 6.1в). На рисунке 6.3 представлены зависимости амплитуды субгармоники  $U_{1/2м}$  от времени для суспензии амфил-НЧ-ПК с концентрацией 1 мг/мл, измеренные при различных значениях амплитуды акустического давления. По мере увеличения амплитуды  $P_{ак}$ , задержка между началом ультразвукового воздействия и появлением кавитации сокращается с 26 до 1 секунды (Таблица 6.1.). Когда амплитуда  $P_{ак}$  превышает пороговое значение  $P_{пор}$  примерно на 60 кПа, задержка полностью исчезает, и кавитация возникает немедленно.



**Рисунок 6.3** Зависимости амплитуды субгармоники  $U_{1/2M}$  от времени, измеренные в свежеприготовленной суспензии амфил-НЧ-ПК (концентрация 1 мг/мл) при  $P_{ак}=271$  кПа (**а**), 302 кПа (**б**), 317 кПа (**в**). Пунктирными линиями показано время, когда начинается процесс инерционной кавитации в суспензии, сплошными линиями – среднее значение амплитуды субграмоники при кавитации.

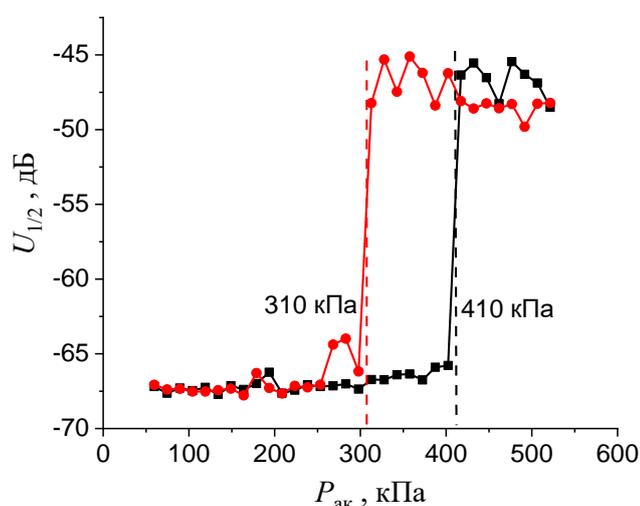
Амплитуда субгармоники демонстрирует значительные колебания, однако её среднее значение остаётся относительно стабильным. В свежеприготовленной суспензии амфил-НЧ-ПК с концентрацией 1 мг/мл при пороговом значении давления  $P_{ак} = 271$  кПа её среднее значение составляет -58 дБ (Таблица 6.1), что примерно на 10 дБ выше уровня шума. С дальнейшим увеличением амплитуды давления  $P_{ак}$  амплитуда субгармоники  $U_{1/2}$  несколько возрастает до -51 дБ, а затем колеблется около среднего значения -50 дБ с дисперсией приблизительно 3 дБ. Следует отметить, что при превышении порога кавитации на 60-100 кПа амплитуда  $U_{1/2}$  слабо зависит от концентрации суспензии или типа наночастиц. В большинстве случаев амплитуда стабилизируется на уровне -50 дБ, что также характерно и для дистиллированной воды.

**Таблица 6.1** Время начала инерционной кавитации  $t_{кав}$ , и среднее значение амплитуды субграмоники  $U_{1/2}$ , измеренные в свежеприготовленной суспензии амфифильных пКНЧ типа А с концентрацией 1 мг/мл.

$P_{ак}, \text{кПа}$	$t_{кав}, \text{сек}$	$U_{1/2}, \text{дБ}$
271	26	-58
302	11	-54
317	1	-52
332	0	-51

В ранее опубликованных работах [122.],[123.] с суспензиями амфифильных наночастиц пористого кремния, полученных обработкой в гексане, с частично окисленной химической поверхностью и покрытых полиэтиленгликолем, было установлено, что такие наночастицы довольно быстро утрачивают свою кавитационную активность. Уже через день порог кавитации для этих суспензий практически сравнялся с чистой водой. Для изучения скорости деградации кавитационной активности были проведены измерения на протяжении двух недель хранения амфил-НЧ-ПК в воде. Использовались образцы с концентрацией наночастиц 0,1 мг/мл и 0,8 мг/мл. В обеих свежеприготовленных суспензиях порог кавитации составил  $270 \pm 3$  кПа (рис. 5.3).

На рисунке 6.4 представлены результаты измерений порога кавитации в суспензиях с разной концентрацией амфил-НЧ-ПК после пяти дней хранения в воде. Было установлено, что порог кавитации увеличился в обеих суспензиях по сравнению с исходными образцами. В суспензии с более низкой концентрацией (0,1 мг/мл) порог кавитации увеличился на 140 кПа, достигнув 410 кПа, в то время как в более концентрированной суспензии (0,8 мг/мл) рост составил всего 40 кПа.

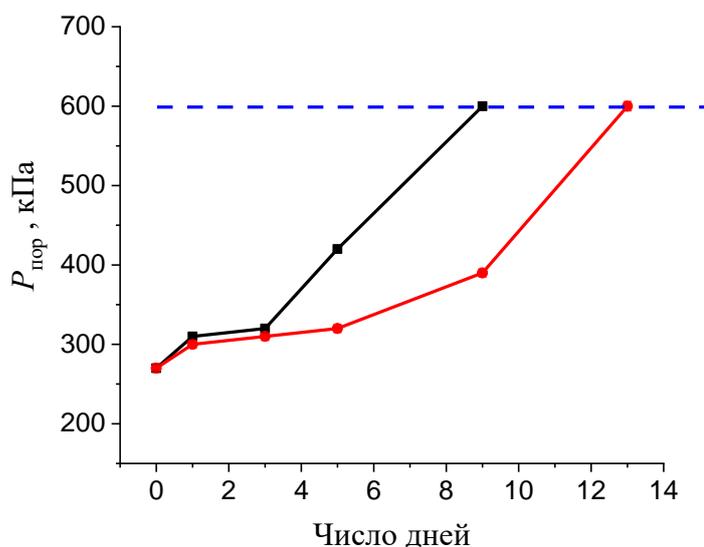


**Рисунок 6.4** Зависимости амплитуды субгармоники от амплитуды акустического давления, измеренные в суспензиях амфил-НЧ-ПК с концентрациями 0.1 мг/мл (■) и 0.8 мг/мл (●) через 5 дней после изготовления.

Итоговые результаты измерений порогов акустической кавитации, проводимых на протяжении 13 дней, приведены на рисунке 6.5. В первые три дня наблюдалось незначительное снижение кавитационной активности в обеих суспензиях, что

сопровождалось увеличением порога кавитации до 310 кПа. Однако спустя 5 дней, как было ранее отмечено (рисунок 6.4), между образцами начали проявляться существенные различия. Полная утрата кавитационных свойств в суспензии с концентрацией 0,1 мг/мл произошла на 9-й день, в то время как для суспензии с более высокой концентрацией (0,8 мг/мл) процесс завершился через 13 дней.

Важно отметить, что измеренные сроки деградации значительно превышают характерные значения для гфил-НЧ-ПК [124.] амфифильных наночастиц, описанных ранее [125.],[126.]. Это можно объяснить тем, что растворение амфифильных частиц, модифицированных ОДС, происходит по иному механизму: сначала растворяется внешняя часть наночастиц, а затем растворение продолжается к их центру, в отличие от равномерного растворения по всему объёму, которое наблюдалось у ранее изученных НЧ-ПК [127.].



**Рисунок 6.5** Изменение порога акустической кавитации в суспензиях амфил-НЧ-ПК с концентрациями 0.1 мг/мл (■) и 0.8 мг/мл (●) в течение 13 дней. Штриховой линией показан порог акустической кавитации в воде, использованной для приготовления суспензий.

На основании представленных данных можно сделать вывод, что порог кавитации значительно зависит от характеристик поверхности НЧ-ПК. В суспензии амфил-НЧ-ПК, содержащей НЧ-ПК с гидрофобными порами, был зафиксирован самый низкий порог кавитации, равный 270 кПа. Это значение более чем в два раза превышает порог кавитации в чистой воде, которая использовалась для приготовления суспензий. Подобное явление

объясняется присутствием газа, остающегося в гидрофобных порах наночастиц после их создания. В отличие от свободных газовых микропузырьков, которые либо растворяются под воздействием Лапласова давления, либо поднимаются к поверхности, пузырьки в порах НЧ-ПК остаются стабильными и могут существовать в течение длительного времени. Однако данный эффект характерен только для пор с гидрофобной поверхностью [128.]. В таких порах отрицательная кривизна границы раздела между жидкостью и газом приводит к отрицательному Лапласову давлению [129.].

В ряде экспериментов с кремниевыми пластинами, содержащими гидрофобные поры цилиндрической формы диаметром от 100 до 1000 нм, было показано, что под действием ультразвуковых импульсов из этих пор образуются газовые пузырьки, что и инициирует процесс акустической кавитации [130.]. Экспериментальные результаты также подтвердили, что теоретическая модель, предложенная для описания динамики пузырьков, выходящих из гидрофобных пор [128.], хорошо согласуется с наблюдаемыми данными.

В нашем исследовании также было продемонстрировано, что при амплитуде давления ультразвуковой волны, равной или немного превышающей пороговое значение, процесс кавитации начинается с заметной задержкой. Это означает, что для того, чтобы нанометровый газовый пузырёк, находящийся внутри поры, увеличился до размеров в сотни нанометров, требуется определённое время, которое составляет примерно несколько десятков секунд. При увеличении амплитуды давления это время существенно сокращается, и когда амплитуда превышает порог на 15-20%, кавитация начинается практически мгновенно.

Особого внимания заслуживают значительные флуктуации уровня субгармоник во времени, которые слабо зависят от амплитуды акустического давления, если она превышает пороговое значение (рисунок 6.3). Одной из возможных причин этого явления может быть периодическая деактивация кавитационных пузырьков, находящихся в порах. Такой эффект может возникать при асимметричном схлопывании пузырька вблизи твёрдой поверхности пор, что приводит к образованию струй жидкости, направленных в сторону этой поверхности. Несмотря на гидрофобность пор, эти струи могут быть достаточно сильными, чтобы проникнуть внутрь. Подобный механизм деактивации описан в работе [130.]. Для восстановления концентрации газа за счёт его диффузии из жидкости требуется определённое время.

Экспериментальные исследования порогов акустической кавитации в присутствии искусственно созданных кавитационных ядер чаще всего проводятся с использованием

либо стандартных ультразвуковых диагностических аппаратов, либо устройств, применяемых в терапевтических целях, таких как аппараты для экстракорпорального разрушения камней в почках [130.]. Эти устройства создают импульсные ультразвуковые поля с длительностью импульса порядка нескольких микросекунд и пиковыми амплитудами, достигающими десятков атмосфер. При таком подходе фиксируется сам факт появления кавитации и определяется минимальная амплитуда давления, при которой она возникает, т.е. порог кавитации. Однако изучение временной динамики процесса при этом затруднено.

Особенностью представленного в диссертации подхода является использование непрерывного режима излучения с возможностью тонкой регулировки амплитуды в широком диапазоне. Это даёт возможность подробно исследовать развитие кавитационного процесса во времени в сложных системах, таких как суспензии пористых наночастиц. В одной из работ [130.] также было отмечено наличие значительных задержек в появлении акустической кавитации, однако детальные комментарии по этому поводу не были приведены. Это может быть связано со сложностью структуры наночастиц: размер пор, степень их гидрофобности и начальное содержание газа в порах могут существенно варьироваться. Для более детального изучения динамики развития кавитации необходимо создавать модельные поры с заранее известными и контролируемыми параметрами, как это было сделано в исследовании [130.].

Таким образом, впервые в представленной работе предложена методика создания наночастиц пористого кремния с гидрофильной поверхностью и гидрофобными порами, которые сохраняют стабильную кавитационную активность в течение как минимум 5 дней хранения в воде. Показано, что пороги акустической кавитации для таких амфифильных наночастиц значительно ниже по сравнению с суспензиями гидрофильных НЧ-ПК и чистой водой. Этот эффект объясняется тем, что газ, находящийся в гидрофобных порах наночастиц после их приготовления, остаётся в стабильном состоянии. В отличие от свободных газовых пузырьков, которые под действием Лапласова давления либо растворяются, либо поднимаются к поверхности, микропузырьки в гидрофобных порах наночастиц остаются стабильными и могут существовать в течение длительного времени.

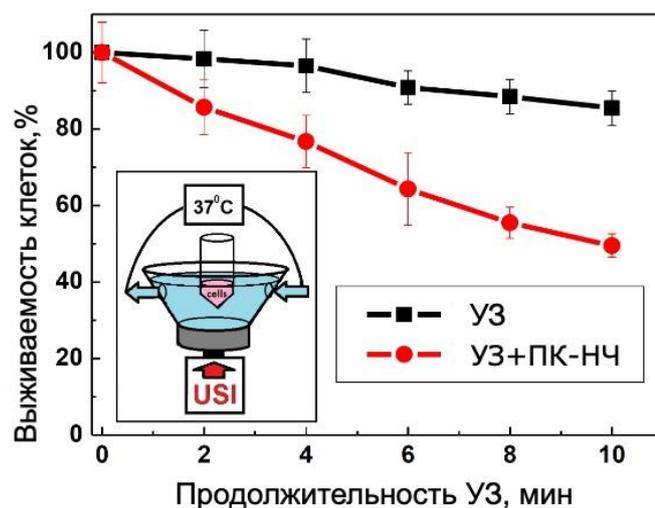
Представленные результаты демонстрируют перспективу использования амфифильных НЧ-ПК в качестве эффективных соносенсибилизаторов, что открывает новые возможности для их применения в ультразвуковой терапии.

## 6.2. Наночастицы, изготовленные из пористых кремниевых нанонитей как сенсibilизаторы медицинского ультразвука

Сочетание фотолюминесцентных и соносенсibilизирующих свойств наночастиц пористого кремния (НЧ-ПК) открывает перспективы их использования в тераностике — подходе, объединяющем диагностику и терапию заболеваний. Фотолюминесценция НЧ-ПК позволяет эффективно визуализировать патологические процессы, а способность сенсibilизировать терапевтический ультразвук делает возможным их применение для усиления ультразвуковой терапии, направленной на разрушение раковых клеток. Ранее было продемонстрировано, что НЧ-ПК, полученные методом механического измельчения пористых кремниевых нанонитей, обладают высокой фотолюминесценцией в видимой области спектра. В настоящем исследовании ставилась задача изучить способность таких НЧ-ПК усиливать эффект терапевтического ультразвука, что открывает возможности для их применения в сонодинамической терапии.

Для оценки влияния УЗ и наночастиц кремния на жизнеспособность клеток Нер-2, наночастицы в концентрации 0,1 мг/мл добавлялись к клеткам в питательной среде за 14 часов до эксперимента. После этого клетки промывались трижды раствором сбалансированных солей Хэнкса (Paneco-ltd, Россия) и удалялись с субстрата путем трипсинизации. Полученная суспензия клеток подвергалась воздействию медицинского ультразвука (0,88 МГц, 1 Вт/см<sup>2</sup>, импульсный режим, модуляция 2/20) с использованием оборудования UST-1.3.01F "MeDTeKo". В качестве контактной среды между плоскими излучателями с радиусом 2 см и кюветой с образцом использовалась дегазированная дистиллированная вода (при 37°C). В контрольной группе исследовались клетки без добавления наночастиц.

На рисунке 6.6 представлена зависимость жизнеспособности клеток от продолжительности воздействия медицинского терапевтического УЗ. Схема экспериментов *in vitro* представлена во вставке на рисунке 6.5. Было подобраны такие условия эксперимента, когда УЗ практически не оказывает влияния на жизнеспособность клеток в интервале от 0 до 10 минут облучения. Однако совместное воздействие ультразвука и ПК-НЧ привело к снижению числа живых клеток на 50% по сравнению с контрольной группой.



**Рисунок 6.6** Зависимость жизнеспособности клеток *in vitro* от продолжительности воздействия УЗ. Клетки подвергались воздействию УЗ (черная кривая) или совместному воздействию УЗ и ПК-НЧ (красная кривая). Вставка: схематическое изображение установки для экспериментов *in vitro* с УЗ.

Влияние ультразвука и ПК-НЧ на жизнеспособность клеток можно объяснить кавитационными эффектами (см выше в Главе 6, пп 6.1 результаты для гидрофильных наночастиц). Следует отметить, что увеличение эффекта можно ожидать, согласно представленным в пп 6.1 результатам, при гидрофобизации поверхности наночастиц.

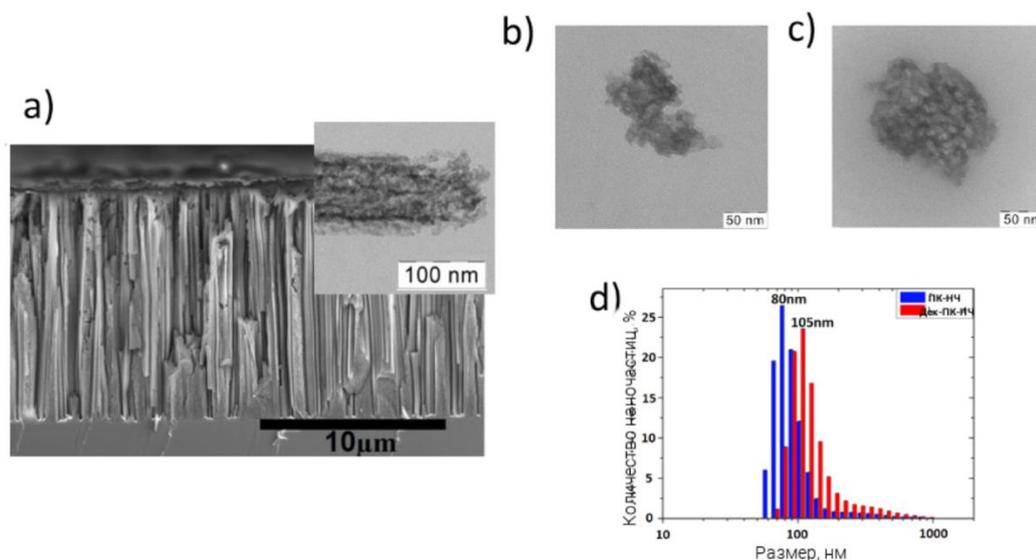
### 6.3. Пористые кремниевые наночастицы – соносенсибилизаторы для уничтожения бактерий

Исследования в области применения наночастиц кремния, активируемых терапевтическим ультразвуком, в качестве антимикробных агентов особенно актуальны на фоне растущей устойчивости бактерий к традиционным антибиотикам. В данном разделе рассматривается возможность применения биосовместимых НЧ-ПК - соносенсибилизаторов для уничтожения бактерий.

Для исследования водные растворы ПК-НЧ были изготовлены методом, подробно описанным в Главе 3. Для получения кремниевых наночастиц, покрытых декстраном (Дек-ПК-НЧ), смешивали 1 мл водной суспензии наночастиц, взятых с концентрацией 1 мг/мл и 1 мл водного раствора декстрана (молекулярная масса 30 000–40 000, 10% декстрана, 0,9% NaCl) (EAST-PHARM, Россия). Полученную смесь подвергали гомогенизации с помощью

ультразвуковой обработки в УЗ ванне при частоте 37 кГц в течение 1 часа, после чего смесь хранили в темном месте в течение 24 часов перед проведением экспериментов *in vitro*.

На рисунке 6.7а показано поперечное сечение массива ПК-НН, полученное с помощью, СЭМ. Длина ПК-НН составляла около 10 мкм после 20 минут травления. Как видно на микрофотографии ПЭМ (вставка на рисунке 6.6а), отдельная нанонить обладает пористой микроструктурой.



**Рисунок 6.7** (а) СЭМ изображение поперечного сечения массива ПК-НН, вставка показывает ПЭМ изображение пористой структуры отдельной нанонити; (б) ПЭМ изображение ПК-НЧ; (с) ПЭМ изображение Дек-ПК-НЧ; (d) распределение размеров ПК-НЧ (синие) и Дек-ПК-НЧ (красные), полученное методом динамического светорассеяния.

ПЭМ изображения ПК-НЧ, полученных методом ультразвукового измельчения ПК-НН в воде, показаны на рисунках 6.6b и с. Типичный размер наночастиц, измеренный с помощью ПЭМ, составлял около 80-100 нм для ПК-НЧ и 100-150 нм для Дек-ПК-НЧ. Средний размер наночастиц увеличился за счет покрытия декстраном. Пористая микроструктура наночастиц хорошо видна на ПЭМ изображениях, представленных на рисунках 6.6. b и с. Согласно данным ВЕТ и ВЛН, полученные наночастицы характеризуются средним диаметром пор 13.4 нм, удельной поверхностью 200 м<sup>2</sup>/г и объемом пор 0.53 см<sup>3</sup>/г. Распределение размеров наночастиц, измеренное методом ДРС, показано на рисунке 6.6d. Преобладающий диаметр ПК-НЧ и Дек-ПК-НЧ составил 80 нм и 105 нм, соответственно. Эти данные полностью совпадают с результатами, полученными методом ПЭМ (см. рисунки 6.7 b и с). Индекс полидисперсности (PDI) наночастиц, определенный методом DLS, составил 0,5 как для ПК-НЧ, так и для Дек-ПК-НЧ.

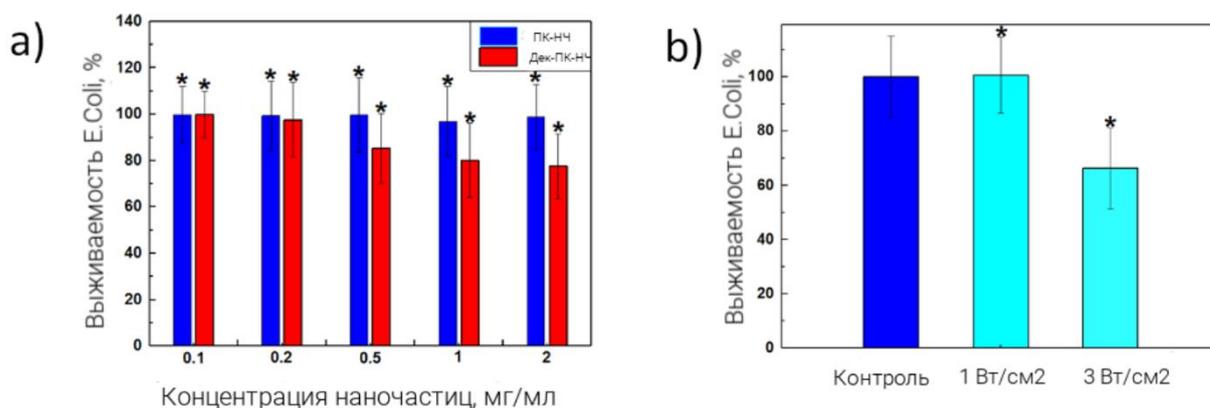
Значения ZP ПК-НЧ и составлял  $-25 \pm 2$  мВ. Для Дек-ПК-НЧ значение ZP составило  $-20 \pm 2$  мВ. Небольшая разница между значениями ZP указывает на слабое взаимодействие между декстраном и наночастицами. Это взаимодействие может объясняться силами Ван-дер-Ваальса между адсорбированным декстраном и окисленной поверхностью SiNP.

В работе были использованы два различных штамма бактерий *E.coli*: ATCC® 25922TM и JM109. Культуру бактерий штамма ATCC® 25922TM выращивали в триптиковом соевом бульоне при температуре 37°C, а штамм JM109 — в жидкой среде LB (Лурия-Бертани) при той же температуре. Затем разбавленную культуру, содержащую примерно  $10^8$  бактерий на миллилитр (оптическая плотность (OD) была измерена при длине волны 600 нм (OD600) с помощью спектрофотометра Agilent Cary 60 UV-Vis для оценки концентрации бактерий *E.coli*), смешивали с ПК-НЧ или Дек-ПК-НЧ и инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа перед обработкой ультразвуком. Для оценки влияния ультразвукового облучения и наночастиц на жизнеспособность бактерий *E.coli*, полученная суспензия подвергалась обработке ультразвуком в течение 10 минут с использованием оборудования Sonoplus 490 (Firma Enraf Nonius) (1 МГц, 1 Вт/см<sup>2</sup>) или Albedo 037 (0,88 МГц, 3 Вт/см<sup>2</sup>) (для обоих штаммов ATCC® 25922TM и JM109 *E.coli*).

Дегазированная дистиллированная вода (при 35°C) использовалась в качестве контактной среды между плоскими излучателями с радиусом 2 см и кюветой с образцом. Затем образцы последовательно разводили, и по 100 мкл каждой суспензии наносили на твердые среды триптикового соевого бульона/LB, после чего выдерживали их в течение 18 часов при температуре 37°C. Жизнеспособность бактерий оценивали по количеству колоний, образовавшихся на пластинах. Бактерии, не подвергавшиеся обработке ультразвуком и наночастицами, использовались в качестве отрицательных контролей в каждом эксперименте. Статистические данные собирались и представлялись как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Статистическая значимость рассчитывалась с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием программного обеспечения GraphPad® и OriginPro 2017®.

Токсичность наночастиц по отношению к бактериям *E.coli* (штаммы ATCC® 25922TM и JM109) представлена на рисунке 6.8а. В ходе эксперимента культуру бактерий *E.coli* ( $10^8$  клеток/мл) смешивали с различными концентрациями ПК-НЧ или Дек-ПК-НЧ и инкубировали в течение 18 часов. Чистую культуру бактерий без добавления кремниевых наноструктур использовали в качестве контрольной группы, а жизнеспособность бактерий *E.coli*, представленная на рисунке 6.7а, нормирована относительно контрольной группы. Как видно из результатов, ПК-НЧ не проявляли токсичности по отношению к бактериям *E.coli* при концентрациях до 2 мг/мл. Дек-ПК-НЧ показали несколько более выраженную

токсичность по сравнению с немодифицированными наночастицами, что можно объяснить лучшей адгезией наночастиц, покрытых декстраном, к клеточной стенке бактерий.



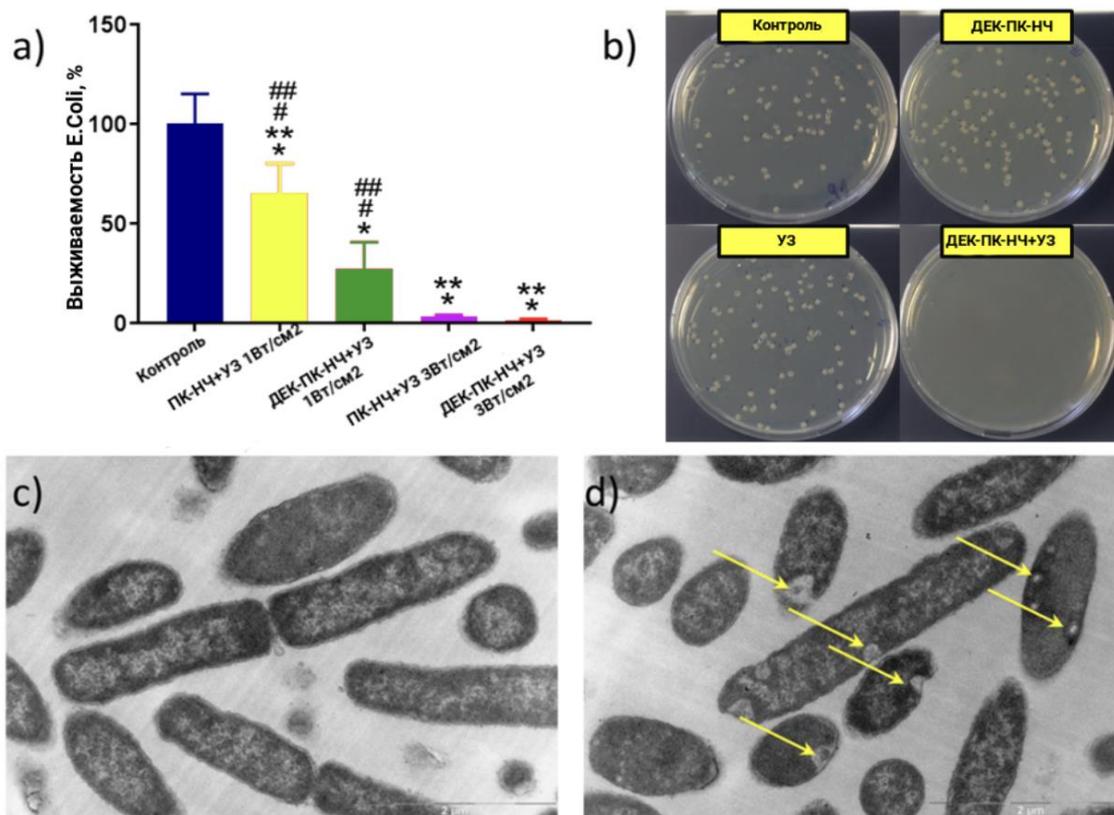
**Рисунок 6.8** (а) Токсичность ПК-НЧ (синие столбцы) и Дек-ПК-НЧ (красные столбцы) по отношению к бактериям *E. coli*; (б) Жизнеспособность бактерий *E. coli* в контрольной группе (синий столбец) после 10 минут обработки ультразвуком с интенсивностью 1 Вт/см<sup>2</sup> и после 10 минут обработки ультразвуком с интенсивностью 3 Вт/см<sup>2</sup> (голубые столбцы). Погрешности представлены как среднее  $\pm$  SD,  $n = 3$ ,  $*p < 0.05$  по сравнению с контрольной группой.

Экспериментальные результаты жизнеспособности *E. coli* (для штаммов ATCC® 25922TM и JM109, 108 клеток/мл) после 10 минут обработки УЗ с интенсивностями 1 Вт/см<sup>2</sup> и 3 Вт/см<sup>2</sup> представлены на рисунке 6.8б. Очевидно, что ультразвуковая обработка с интенсивностью 1 Вт/см<sup>2</sup> не оказала влияния на жизнеспособность колоний *E. coli* по сравнению с контрольной группой без обработки (синий столбец). С другой стороны, обработка колоний *E. coli* ультразвуком с более высокой интенсивностью (3 Вт/см<sup>2</sup>) привела к подавлению роста колоний бактерий, что привело к снижению жизнеспособности до 70%. Этот сонотоксический эффект при увеличенной интенсивности ультразвука можно объяснить процессом кавитации, вследствие которого может нарушаться структура клеточных мембран бактерий, вызывая механические повреждения, что приводит к их разрушению.

На рисунке 6.9 представлены результаты экспериментов по изучению жизнеспособности *E. coli* после обработки бактерий суспензиями ПК-НЧ или Дек-ПК-НЧ с концентрацией 1 мг/мл, и последующей обработкой УЗ с интенсивностью 1 Вт/см<sup>2</sup> и/или 3 Вт/см<sup>2</sup>. В этих экспериментах группа *E. coli* без обработки наночастицами и УЗ использовалась в качестве контрольной группы (синий столбец на рисунке 6.8а). Обработка УЗ с интенсивностью 1 Вт/см<sup>2</sup> в течение 10 минут в присутствии наночастиц привела к подавлению роста колоний бактерий, что привело к снижению жизнеспособности до 35%

и 72% для ПК-НЧ и Дек-ПК-НЧ соответственно (желтые и зеленые столбцы на рисунке 5.14а). Лучшие результаты для Дек-ПК-НЧ по сравнению с ПК-НЧ можно объяснить тем, что биополимерная оболочка Дек-ПК-НЧ обеспечивает их более сильную адгезию к поверхности бактерий, из-за чего поверхность бактерий подвергается большему воздействию сенсibilизированных наночастицами кавитационных процессов. Кроме того, было отмечено значительное снижение жизнеспособности бактерий после комбинированного воздействия наночастиц и более высокой интенсивности ультразвука (3 Вт/см<sup>2</sup>) (пурпурные и красные столбцы на рисунке 6.9а).

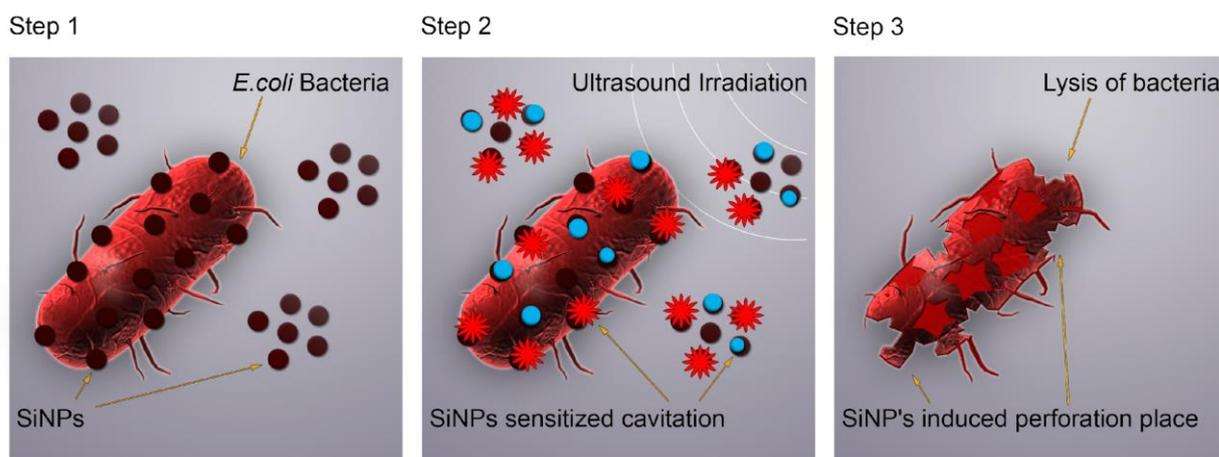
Полученные результаты подтверждаются также цифровыми фотографиями чашек Петри с бактериями *E.coli* (штамм ATCC® 25922ТМ) для контрольной группы, после 1 часа воздействия Дек-ПК-НЧ с концентрацией 1 мг/мл без ультразвуковой обработки, после 10 минут обработки ультразвуком с интенсивностью 3 Вт/см<sup>2</sup> без наночастиц и после 10 минут комбинированного воздействия Дек-ПК-НЧ с концентрацией 1 мг/мл и ультразвука с интенсивностью 3 Вт/см<sup>2</sup>, см. рисунок 6.8b. Никаких значительных изменений в количестве колоний бактерий не наблюдалось после обработки 1 мг/мл Дек-ПК-НЧ по сравнению с контрольной группой. Незначительное подавление роста бактерий было отмечено после 10 минут обработки УЗ с интенсивностью 3 Вт/см<sup>2</sup>. В то же время, 10 минут комбинированного воздействия 1 мг/мл Дек-ПК-НЧ и УЗ с интенсивностью 3 Вт/см<sup>2</sup> обеспечили полное (100%) подавление роста колоний бактерий. Полученные результаты хорошо согласуются с данными, представленными на рисунках 6.9а, б и 6.9а.



**Рисунок 6.9** (а) Жизнеспособность бактерий *E. coli* в контрольной группе (синий столбец), после 10 минут комбинированного воздействия 1 мг/мл ПК-НЧ и УЗ с интенсивностью 1 Вт/см<sup>2</sup> (желтый столбец), 1 мг/мл Дек-ПК-НЧ и УЗ с интенсивностью 1 Вт/см<sup>2</sup> (зеленый столбец), 1 мг/мл ПК-НЧ и УЗ с интенсивностью 3 Вт/см<sup>2</sup> (пурпурный столбец), 1 мг/мл Дек-ПК-НЧ и УЗ с интенсивностью 3 Вт/см<sup>2</sup> (красный столбец). Уровни значимости между контрольной и обработанной группами определялись с вероятностями: \* $p < 0.0001$  по сравнению с контрольной группой, \*\* $p < 0.001$  по сравнению с Дек-ПК-НЧ + УЗ 1 Вт/см<sup>2</sup>, # $p < 0.001$  по сравнению с ПК-НЧ + УЗ 3 Вт/см<sup>2</sup>, ## $p < 0.001$  по сравнению с Дек-ПК-НЧ + УЗ 3 Вт/см<sup>2</sup>. Погрешности представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD),  $n = 3$ ; (б) цифровое фото чашек Петри с бактериями *E. coli* (штамм ATCC® 25922TM) в контрольной группе, после 1 часа воздействия Дек-ПК-НЧ с концентрацией 1 мг/мл без ультразвуковой обработки, после 10 минут ультразвуковой обработки с интенсивностью 3 Вт/см<sup>2</sup> без наночастиц и после 10 минут комбинированного воздействия 1 мг/мл Дек-ПК-НЧ и ультразвука с интенсивностью 3 Вт/см<sup>2</sup>; (в) ПЭМ-изображение поперечного сечения *E. coli* (штамм JM109) после их смешивания с 1 мг/мл Дек-ПК-НЧ; (д) ПЭМ-изображение поперечного сечения *E. coli* после комбинированного 10-минутного воздействия 1 мг/мл Дек-ПК-НЧ и УЗ с интенсивностью 1 Вт/см<sup>2</sup>. Желтые стрелки указывают на участки разрушения (лизиса) мембран бактерий.

Типичные ПЭМ-изображения бактерий *E.coli* (штамм JM109) после их смешивания с 1 мг/мл Дек-ПК-НЧ и после комбинированной 10-минутной обработки 1 мг/мл Дек-ПК-НЧ и УЗ с интенсивностью 1 Вт/см<sup>2</sup> представлены на рисунках 6.9с и d. Не было отмечено изменений в структуре клеточной стенки бактерий после их взаимодействия с Дек-ПК-НЧ без ультразвукового воздействия (см. рисунок 6.9в). Однако очевидные изменения в структуре стенок бактерий были замечены после комбинированной 10-минутной обработки 1 мг/мл Дек-ПК-НЧ и УЗ с интенсивностью 1 Вт/см<sup>2</sup>, что отчетливо видно на рисунке 6.9г. Клеточные стенки частично перфорированы (обозначено желтыми стрелками на рисунке 6.9г), что может быть объяснено лизисом бактериальной мембраны, вызванным кавитацией, сенсibilизированной наночастицами.

Таким образом, впервые был изучен антимикробный эффект биосовместимых наночастиц кремния, активируемых терапевтическим УЗ. Предлагаемый механизм лизиса бактерий *E.coli* в присутствии ПК-НЧ и УЗ схематически представлен на рисунке 6.10.



**Рисунок 6.10** Схематическое изображение антимикробного эффекта ПК-НЧ, активируемых терапевтическим ультразвуком. Этап I: Локализация наночастиц на клеточной стенке бактерий. Этап II: Сенсibilизированный ПК-НЧ процесс кавитации, который включает зарождение, рост и схлопывание пузырьков (обозначены синими пузырьками и красными звездами, соответственно). Этап III: Перфорация (лизис) бактерий, которая возникает после комбинированной обработки ПК-НЧ и ультразвуком.

На основе представленных результатов можно сделать вывод, что ПК-НЧ, и особенно наночастицы кремния, покрытые декстраном, обладают выраженным антимикробным эффектом при воздействии терапевтического УЗ. ПК-НЧ могут эффективно прикрепляться к поверхности клеточной стенки бактерий благодаря своей пористой структуре и наличию биосовместимого покрытия, такого как декстран, которое

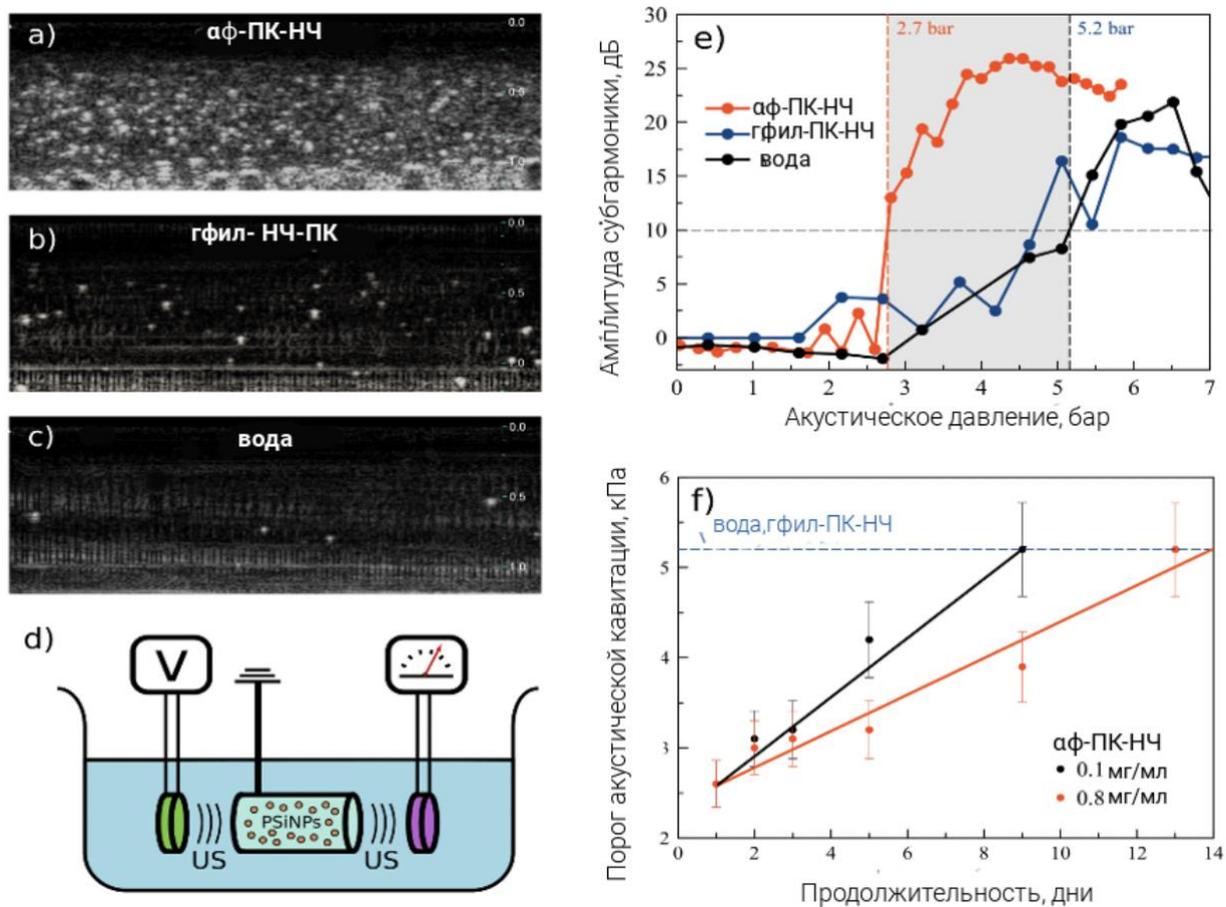
улучшает их адгезию к микробным клеткам. Это прикрепление создает благоприятные условия для усиления кавитационного процесса при воздействии УЗ.

Под действием УЗ наночастицы активируют образование кавитационных пузырьков, которые зарождаются, растут и схлопываются вблизи поверхности бактерий. Эти процессы вызывают локальные механические эффекты, такие как образование микроструй и ударных волн, что приводит к перфорации (лизису) клеточных стенок бактерий. Данный эффект приводит к разрушению клеток и, как следствие, к полной инактивации и подавлению бактериальных колоний.

#### **6.4. Амфифильные фотолуминесцентные пористые кремниевые наночастицы как эффективные соносенсибилизаторы для уничтожения клеток**

Представленная часть диссертационной работы направлена на углубленное исследование возможностей амфифильных фотолуминесцентных пористых кремниевых наночастиц (амфил-НЧ-ПК)-соносенсибилизаторов для уничтожения клеток. Ранее было продемонстрировано, что НЧ-ПК способны эффективно снижать порог кавитации, усиливая воздействия ультразвуковых волн на клеточные структуры. Это свойство открывает перспективы для применения таких наночастиц в качестве соносенсибилизаторов в УЗ-усиленной терапии.

На рисунке 6.11 представлены данные по исследованию соноактивных свойств полученных амфил-НЧ-ПК. На рисунке 6.11 а, б, в показаны изображения суспензий амфил-НЧ-ПК, гфил-НЧ-ПК и деионизированной (DI) воды, соответственно, полученные с помощью стандартного диагностического УЗ-аппарата (эхография в В-режиме). Суспензии наночастиц визуализировались с использованием портативного ультразвукового сканера Terason 2000 с линейным датчиком 10L5. Датчик располагался на поверхности суспензий, которые были налиты в контейнеры глубиной 3 см. Изображения в В-режиме получались с помощью ультразвуковых импульсов на частоте 7 МГц и пиковым давлением около 13 бар в фазе разрежения (механический индекс  $MI=0.5$ ). Для визуализации использовалась концентрация суспензии 1 мг/мл. Из представленного рисунка видно, что наибольший контраст достигается для амфил-НЧ-ПК, в то время как контраст гфил-НЧ-ПК слабо выражен, как и для воды. Полученные данные показывают соноактивные свойства амфил-НЧ-ПК и указывают на потенциальную возможность их использования в качестве контрастных агентов, в том числе для визуализации раковых опухолей.



**Рисунок 6.11** Соноактивные свойства  $\alpha\phi$ -ПК-НЧ. Ультразвуковая визуализация водных суспензий  $\alpha\phi$ -ПК-НЧ (а), гфил-НЧ-ПК (б) и деионизованной (DI) воды (в). (г) Схематическое изображение установки для УЗ активации: стеклянная кювета, заполненная суспензией наночастиц (коричневые точки в цилиндре), погружена в резервуар, заполненный DI водой (синий). УЗ-облучение генерируется источником (зеленый) и регистрируется приемником (фиолетовый). (д) Величина ультразвуковой субгармоники в зависимости от приложенного акустического давления в водных суспензиях амфил-НЧ-ПК (красный), гфил-НЧ-ПК (синий) и воды (черный). Пороги кавитации показаны пунктирными вертикальными линиями (2,7 бар - для амфил-НЧ-ПК, 5,2 бар для гфил-НЧ-ПК и воды). Серая область показывает возможное терапевтическое окно, где кавитация происходит только вблизи амфил-НЧ-ПК. (е) Стабильность порога кавитации в суспензиях амфил-НЧ-ПК в зависимости от времени хранения при комнатной температуре для высокой концентрации (0,8 мг/мл - красная кривая) и низкой концентрации (0,1 мг/мл - черная кривая). Порог, соответствующий чистой DI воде или  $\alpha\phi$ -ПК-НЧ, показан горизонтальной синей пунктирной линией (5,2 бар).

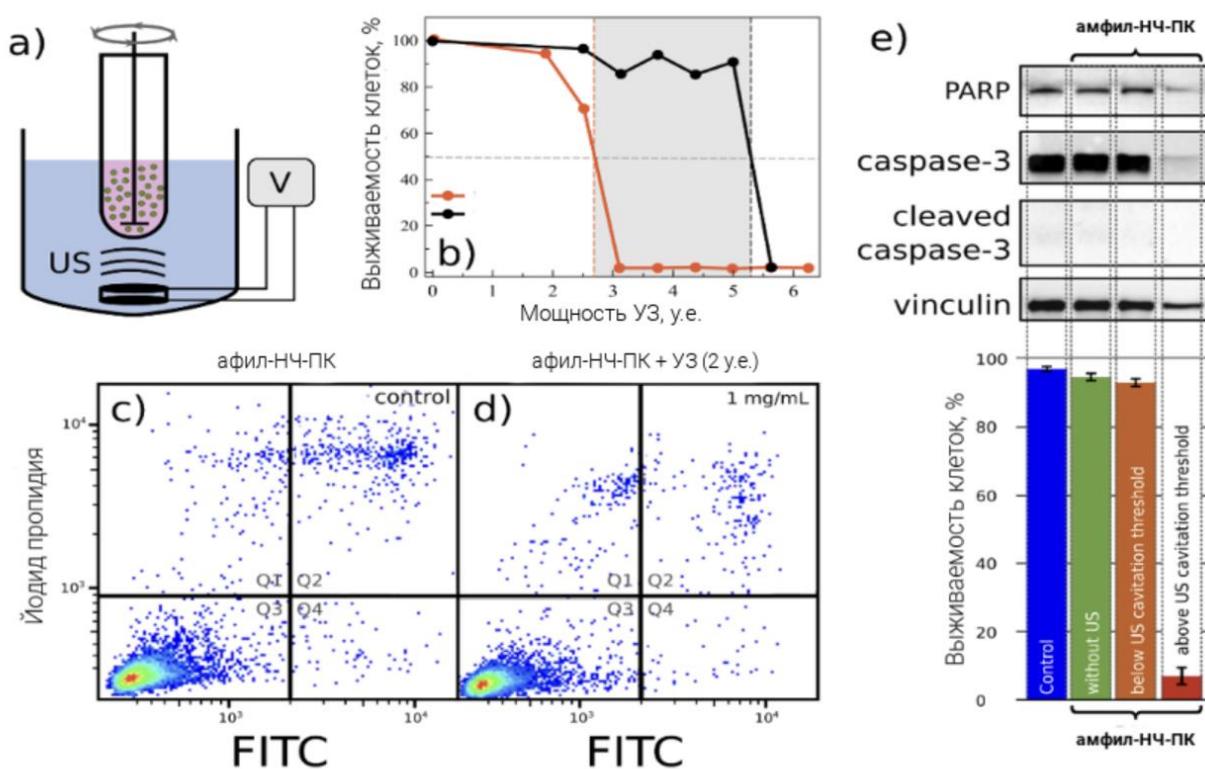
На рис. 6.11г представлена схема установки по изучению порогов кавитации в суспензиях. Установка включает в себя источник УЗ, приёмник (гидрофон), необходимый для регистрации спектра, включая субгармонику, и кювету, наполняемую исследуемой суспензией. Субгармоника, т. е. УЗ излучение на частоте, составляющей  $\frac{1}{2}$  от исходной, является признаком развития кавитации в среде. Для оптимального обнаружения субгармонического сигнала центральная частота гидрофона составляла половину (1,04 МГц) от центральной частоты преобразователя (2,08 МГц). Преобразователь был подключен к ультразвуковому усилителю, который усиливал синусоидальный сигнал от генератора (Tektronix AFG 3021B). Осциллограф (Tektronix TDS 3032B) усреднял каждые 32 выборки сигнала, полученные от гидрофона, и выполнял быстрое преобразование Фурье (БПФ) для получения спектра сигнала. Генератор и осциллограф были подключены к компьютеру с помощью программы NI LabVIEW 2013 (National Instruments Corp., Остин, Техас), которая использовалась для управления экспериментом. На каждом шаге акустического давления гармоники измерялись в течение 60 секунд, и средние значения за этот период рассчитывались для получения средней амплитуды. Пауза между каждым шагом давления составляла 30 секунд.

На рис. 6.11д показаны зависимости магнитуды субгармоники от акустического давления (интенсивности УЗ) для суспензий, содержащих амфил-НЧ-ПК, гфил- НЧ-ПК и деионизованную (DI) воду. Из рисунка видно, что для воды и суспензии гфил- НЧ-ПК вблизи 5.2 бар наблюдается резкий рост интенсивности субгармоники, который является порогом кавитации. Совпадение порогов для воды и для гфил- НЧ-ПК означает, что сами по себе гидрофильные наночастицы не являются значимыми центрами для образования зародышей кавитации, таким образом, не могут усиливать действие УЗ. В суспензиях амфил-НЧ-ПК, напротив, наблюдается существенное снижение порогов кавитации вплоть до 2.7 бар. Это означает, что амфифильные наночастицы облегчают возникновение зародышей кавитации, что приводит к её развитию при значительно меньших акустических давлениях. Это происходит за счёт гидрофобной внутренней поверхности таких наночастиц, которая является своеобразным каркасом для возникновения под действием нанопузырьков, т. к. внутри амфил-НЧ-ПК нахождение воды в жидком состоянии невозможно. Таким образом, амфил-НЧ-ПК можно использовать для селективного уничтожения нежелательных клеток, для этого необходимо использовать УЗ излучение с интенсивностью, соответствующей «терапевтическому окну», показанному серым цветом на рис. 6.11. В этом случае кавитация будет возникать исключительно на поверхности амфил-НЧ-ПК.

Важным вопросом является стабильность соносенсибилизационных свойств наночастиц, а также влияние их концентрации в суспензии. На рисунке 6.11е показана

динамика увеличения порогов кавитации для суспензий амфил-НЧ-ПК разной концентрации: 0.8 и 0.1 мг/мл. В начальной точке, после 1 дня хранения суспензий, пороги кавитации совпадают. Это важное свойство суспензий амфил-НЧ-ПК, пороги кавитации в них зависят только от свойств самих наночастиц, но не от концентрации. Таким образом, даже невысокой концентрации может оказаться достаточно для сонодинамического воздействия. В течение 3 дней аф-ПК-НЧ практически полностью сохраняют свойства, чего достаточно для их эффективного накопления в опухолях и активации УЗ.

Далее в работе изучено воздействие УЗ и амфил-НЧ-ПК на жизнеспособность клеток *in vitro*. Для данного исследования была собрана установка, изображенная на рисунке 6.12а, которая представляет из себя стеклянную кювету с ротатором, погруженную в термостат. При этом излучатель УЗ находится снизу, как это показано на рисунке.



**Рисунок 6.12** Применение амфил-НЧ-ПК для сонодинамической терапии. (а) Экспериментальная УЗ установка. Стеклянная кювета погружена в водяную баню при 37°C (синий). Клетки показаны зеленым цветом с красными пятнами внутри, представляющими амфил-НЧ-ПК. Источник УЗ показан снизу. Суспензия с клетками во время облучения перемешивается вертикальным ротатором. (б) Жизнеспособность клеток K562 после совместного воздействия УЗ и амфил-НЧ-ПК (красная кривая) и только УЗ (синяя кривая), в зависимости от приложенного акустического давления. Вертикальные пунктирные линии показывают пороги кавитации. Серая область представляет терапевтическое окно для

селективного уничтожения клеток введенными амфил-НЧ-ПК. (с-d) Репрезентативные изображения проточного цитометрического анализа с окрашиванием Annexin V-FITC/PI в клетках K562, инкубированных с амфил-НЧ-ПК (0,1 мг/мл) без УЗ-активации (с) и с УЗ-активацией ниже порога кавитации (d). Обозначения: Аннексин V/PI: -/-, жизнеспособные клетки (Q3); +/- апоптотические клетки (Q4); ++ поздние апоптотические клетки (Q2); +/- некротические клетки (Q1). (е) Вестерн-блот анализ (вверху) клеток 3Т3 NIH после обработки амфил-НЧ-ПК и УЗ активации. Гистограмма данных анализа проточной цитометрии (FC) для 3Т3 NIH - слева направо: контроль (синий), клетки с амфил-НЧ-ПК без УЗ (зеленый), с УЗ с интенсивностью ниже (коричневый) и выше (красный) порога кавитации. В качестве контроля загрузки использовался винсулин. Время инкубации с клетками - 24 ч. Результаты проточной цитометрии представлены как среднее +/- стандартное отклонение (SD), n = 4. n.s. - не значимые: значимые различия по сравнению с контрольными клетками (тест Mann-Whitney U).

Согласно полученным результатам, наблюдается пороговая гибель клеток (см рисунок 6.12б). При этом гибель клеток при совместном действии УЗ и амфил-НЧ-ПК наступает при меньших интенсивностях УЗ. Это связано с показанным ранее в пп 6.1. в модельных экспериментах возникновением кавитации, которая приводит к уничтожению клеток. Сходство кривых однозначно говорит о том, что кавитация является главной и единственной причиной клеточной смерти.

Для определения механизмов клеточной гибели при совместном воздействии УЗ и амфил-НЧ-ПК методом проточной цитофлуориметрии и вестерн-блот анализа было показано (рисунок 6.12д), что при превышении порога кавитации происходит полное разрушение клеток. Чтобы оценить потенциальные побочные эффекты терапии, были изучены культуры клеток с интернализированными амфил-НЧ-ПК, облученные УЗ допороговых интенсивностей. Данные показывают (рисунок 6.12в, г), что статистически значимой избыточной гибели клеток по сравнению к контрольной группой не происходит: ни по механизму некроза, ни по механизму апоптоза. Это также свидетельствует, что клетки разрушаются вследствие кавитации.

На основе проведенных исследований можно сделать вывод, что ФЛ амфил-НЧ-ПК обладают значительным потенциалом в качестве соносенсибилизаторов для сонодинамической терапии рака. Впервые показано, что эти наночастицы способны значительно снижать порог кавитации УЗ, что открывает возможность селективного разрушения раковых клеток в условиях низкоинтенсивного терапевтического ультразвука. Исследования *in vitro* продемонстрировали, что превышение порога кавитации,

инициируемое наночастицами, приводит к резкому снижению жизнеспособности клеток за счет механического воздействия микропузырьков, образующихся в процессе кавитации. При этом, без УЗ активации наночастицы демонстрируют высокую биосовместимость. Дополнительно, ФЛ свойства амфил-НЧ-ПК позволяют использовать их в качестве контрастных агентов для флуоресцентной визуализации и ультразвукового мониторинга. Устойчивость их соносенсибилизирующих свойств на протяжении нескольких дней и способность к биодegradации делают НЧ-ПК перспективными агентами для локализованной терапии глубокорасположенных опухолей с использованием минимально инвазивных методов контроля.

## Результаты и выводы

1. Исследованы квантово-размерные эффекты, проявляющиеся в изменении структурных свойств наночастиц в процессе их инкубации в модельных биологических жидкостях и клеточных культурах с использованием люминесцентной микроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния света. Показано, что инкубация НЧ-ПК в воде способствует пассивации дефектов типа оборванных кремниевых связей на поверхности нанокристаллов, что приводит к увеличению интенсивности их фотолюминесценции в 3.5 раза по сравнению со свежеприготовленными образцами. В условиях фосфатно-солевого буфера растворение нк-Si ускоряется с образованием аморфного оксида кремния, который можно детектировать по полосе в КР спектрах на  $480\text{ см}^{-1}$ , снижением размеров нанокристаллов, которое можно детектировать по низкочастотному сдвигу линии колебаний фононов кристаллической решетки относительно  $520.5\text{ см}^{-1}$ , а также синему сдвигу спектра ФЛ и падению его интенсивности. При этом скорость растворения наночастиц существенно зависит от размеров, составляющих их нк-Si и оксидного слоя и может составлять от 24 часов до 2-х недель.

2. Установлено, что порог акустической кавитации для частоты 2.08 МГц значительно зависит от свойств поверхности наночастиц пористого кремния. В суспензиях гидрофобных наночастиц порог кавитации снижается до 270 кПа, что более чем в два раза ниже порога в чистой воде (590 кПа). Это объясняется тем, что газ в гидрофобных порах стабилен и функционирует как устойчивый зародыш кавитации, в то время как в гидрофильных порах газ вытесняется капиллярным давлением Лапласа. Для амфифильных наночастиц с частично гидрофобной поверхностью порог кавитации составляет 340 кПа, что также ниже по сравнению с гидрофильными наночастицами (430 кПа), но выше, чем для полностью гидрофобных наночастиц.

3. Исследованы свойства наночастиц пористого кремния при комбинированном применении с ультразвуком с частотой 1 МГц для уничтожения бактерий *in vitro*. При мощности УЗ  $1\text{ Вт/см}^2$  жизнеспособность *E. coli* снижалась до 35% для НЧ-ПК и до 72% для модифицированных декстраном наночастиц (Дек-НЧ-ПК). При увеличении мощности УЗ до  $3\text{ Вт/см}^2$  достигалась 100% инактивация колоний для Дек-ПК-НЧ. Наночастицы адгезировались на поверхности бактерий, локализуя кавитационные пузырьки, которые при схлопывании создавали микроструи и ударные волны, вызывая перфорацию клеточных стенок и лизис бактерий.

4. Исследованы свойства наночастиц пористого кремния при комбинированном применении с низкоинтенсивным медицинским ультразвуком для уничтожения клеток *in vitro*. Показано, что в течении 24 часов инкубации с клетками наночастицы локализуются в клеточной цитоплазме. Сами по себе наночастицы не оказывают цитотоксического воздействия на клетки вплоть до концентраций 1000 мкг/мл и времени инкубации до 72 часов *in vitro*. Также, сам по себе УЗ с частотами 0.88 и 2.08 МГц и интенсивностью до 1 Вт не оказывает токсического воздействия на клетки. Однако комбинированное воздействие низкоинтенсивного УЗ и НЧ-ПК (взятых в концентрациях до 500 мкг/мл) приводит к вплоть до 100% уничтожению клеток за счёт инициируемых наночастицами кавитационных процессов. При этом амфифильные НЧ-ПК продемонстрировали устойчивые соносенсибилизирующие и фотолюминесцентные свойства в течение 3 дней хранения в физиологических растворах, что подтверждает их физико-химическую стабильность и перспективность для биомедицинских применений.

## Публикации автора по теме диссертации

### Статьи, опубликованные в журналах, входящих в Web of Science (Core Collection), Scopus, РИНЦ

- 1) Егошина В.Д., Гонгальский М.Б., **Цурикова У.А.**, Свиридов А.П., Осминкина Л.А., Андреев В.Г. Кавитационная активность водных суспензий пористых кремниевых наночастиц с различной степенью гидрофобности поверхности // Акустический журнал. - Москва: ФГБУ "Издательство "Наука", 2023. - Т. 69, № 1. - С. 92-100. DOI: [https://doi.org/10.31857/S032079192260038X] (Импакт-фактор WoS: 0.9)
- 2) Gongalsky M.B., Pervushin N.V., Maksutova D.E., **Tsurikova U.A.**, Putintsev P.P., Gyuppenen O.D., Evstratova Y.V., Shalygina O.A., Kopeina G.S., Kudryavtsev A.A., Zhivotovsky B., Osminkina L.A. Optical Monitoring of the Biodegradation of Porous and Solid Silicon Nanoparticles // Nanomaterials. - Basel: MDPI, 2021. - Vol. 11, № 9. DOI: [https://doi.org/10.3390/nano11092167] (Импакт-фактор WoS: 4.7)
- 3) Гонгальский М.Б., **Цурикова У.А.**, Гончар К.А., Гвинджилия Г.З., Осминкина Л.А. Квантово-размерный эффект в кремниевых нанокристаллах при их растворении в модельных биологических жидкостях // Физика и техника полупроводников. - СПб.: Наука, 2021. - Т. 1. - С. 43. [https://doi.org/10.21883/ФТР.2021.01.50386.9517] (Импакт-фактор WoS: 0.173)
- 4) Gongalsky M., **Tsurikova U.A.**, Storey C.J., Evstratova Y.V., Kudryavtsev A., Canham L.T., Osminkina L.A. The effects of drying technique and surface pre-treatment on the cytotoxicity and dissolution rate of luminescent porous silicon quantum dots in model fluids and living cells // Faraday Discussions. - United Kingdom: Royal Society of Chemistry, 2020. - Vol. 222. - P. 318-331. DOI: [https://doi.org/10.1039/c9fd00107g] (Импакт-фактор WoS: 3.3)
- 5) Shevchenko S.N., Burkhardt M., Sheval E.V., **Natashina U.A.**, Grosse C., Nikolaev A.L., Gopin A.V., Neugebauer U., Kudryavtsev A.A., Sivakov V., Osminkina L.A. Antimicrobial Effect of Biocompatible Silicon Nanoparticles Activated Using Therapeutic Ultrasound // Langmuir. - United States: American Chemical Society, 2017. - Vol. 33, № 10. - P. 2603-2609. DOI: [https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04303] (Импакт-фактор WoS: 3.8)
- 6) Tolstik E., Osminkina L.A., Matthäus C., Burkhardt M., Tsurikov K.E., **Natashina U.A.**, Timoshenko V.Yu., Heintzmann R., Popp J., Sivakov V. Studies of Silicon Nanoparticles Uptake and Biodegradation in Cancer Cells by Raman Spectroscopy // Nanomedicine: Nanotechnology,

Biology, and Medicine. - Netherlands: Elsevier BV, 2016. - Vol. 12, № 7. - P. 1931-1940. DOI: [https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.04.004] (Импакт-фактор WoS: 4.2)

7) Osminkina L.A., Sivakov V.A., Mysov G.A., Georgobiany V.A., **Natashina U.A.**, Talkenberg F., Solovyev V.V., Kudryavtsev A.A., Timoshenko V.Yu. Nanoparticles prepared from porous silicon nanowires for bio-imaging and sonodynamic therapy // Nanoscale Research Letters. - Germany: Springer Verlag, 2014. - Vol. 9, № 463. DOI: [https://doi.org/10.1186/1556-276x-9-463] (Импакт-фактор WoS: 5.5)

8) МаксUTOва Д.Е., **Цурикова У.А.**, Гонгальский М.Б., Евстратова Я.В., Кудрявцев А.А., Осминкина Л.А. Метод спектроскопии комбинационного рассеяния света для мониторинга процесса растворения нанокристаллов кремния в модельных жидкостях и живых клетках // Ученые записки физического факультета Московского Университета, 2021. - Т. 2. - С. 2120501-1-2120501-7. (Импакт фактор РИНЦ: 0.069)

#### **Публикации в материалах конференций, индексируемых в РИНЦ**

1) **Natashina U.A.**, Shevchenko S.N., Burkhardt M., Sheval E.V., Tsurikov K.E., Christina Grosse, Nikolaev A.L., Gopin A.V., Neugebauer U., Kudryavtsev A.A., Sivakov V., Osminkina L.A. Interaction of Silicon Nanostructures with Microbiological Objects в сборнике □ 3 rd International Conference “Current Trends of Cancer Theranostics” , Pakruojis, Литва, 25 июня - 29 июля 2017, место издания Литва, тезисы, 2017

2) **Наташина У.А.**, Шевченко С.Н., Шеваль Е.В., Осминкина Л.А., Гопин А.В., Кудрявцев А.А., Николаев А.Л. Антибактериальный эффект биосовместимых кремниевых наночастиц, активируемых терапевтическим ультразвуком, Ломоносовские чтения - 2018. Секция "Физика", Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 16-25 апреля 2018

3) **Наташина У.А.**, Осминкина Л.А., Кудрявцев А.А., Гонгальский М.Б. Оптическая диагностика биodeградации наночастиц пористого кремния в живых клетках и модельных жидкостях Ломоносовские чтения - 2019. Секция «Физика», Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 15-25 апреля 2019

4) **Natashina U.A.**, Gongalsky M.B., Kudryavtsev A.A., Osminkina L.A. Optical monitoring of porous silicon nanoparticles biodegradation in living cells and simulated liquids European Materials Research Society Spring Meeting 2019, Ницца, Франция, 27-31 мая 2019

5) **Цурикова У.А.**, Гонгальский М.Б., Осминкина Л.А. Мониторинг растворения кремниевых нанокристаллов оптическими методами Вторая всероссийская молодежная конференция «Высокоточная диагностика функциональных материалов:

лабораторные и синхротронные исследования» ВДФМ-2022, г. Воронеж, ВГУ, Россия, 12-17 сентября 2022

6) **Tsurikova U.A.**, Gongalsky M.B., Storey C.J., Evstratova Y.V., Kudryavtsev A.A., Canham L.T., Osminkina L.A. The effect of drying technique and surface pre-treatment on the cytotoxicity and dissolution rate of luminescent porous silicon quantum dots in model fluids and living cells, Porous Semiconductors Science and Technology 2022 Conference (PSST 2022, March 27th – April 1st 2022 Lido di Camaiore, Italy), Lido di Camaiore, Италия, 27 марта - 1 апреля 2022

7) Sviridov A., **Tsurikova U.**, Maksutova D., Gongalsky M., Egoshina V., Andreev V.G., Kudryavtsev A.A., Osminkina Ultrasound-assisted drug release from biodegradable porous silicon nanoparticles Porous Semiconductors Science and Technology 2022 Conference (PSST 2022, March 27th – April 1st 2022 Lido di Camaiore, Italy), Lido di Camaiore, Италия, 27 марта - 1 апреля 2022

8) Сумарокова М.В., Назаровская Д.А., Гончар К.Г., **Цурикова У.А.** Исследование растворения пористых нанонитей и наночастиц кремния в буферных растворах с различными значениями рН в сборнике XXXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2024». Секция «Физика», издательство Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва), тезисы, с. 352-353, 2024

9) Бреева А.В., Первушин Н.В., **Цурикова У.А.**, Елисеев А.А., Гонгальский М.Б., Осминкина Л.А. Комбинационное рассеяние света для мониторинга композитных наночастиц, загруженных лекарством в сборнике Биохимическая физика : труды XXII Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗЫ, издательство Российский университет дружбы народов (РУДН) (Москва), тезисы, с. 23-24, 2023

10) Егошина В.Д., Гонгальский М.Б., **Цурикова У.А.**, Андреев В.Г., Осминкина Л.А. Порог акустической кавитации в водных суспензиях пористых кремниевых наночастиц с различной степенью гидрофобности поверхности в сборнике Сборник трудов XXXV сессии российского акустического общества Москва, 2023, тезисы, с. 776, 2023

## **Список конференций, на которых были доложены результаты исследования**

International Conference “Current Trends of Cancer Theranostics”, Pakruojis; Ломоносовские чтения – 2018, 2019; Ежегодная молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗЫ; ВДФМ-2022; European Materials Research Society Spring Meeting 2019; Porous Semiconductors Science and Technology 2022 Conference; Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2024». Секция «Физика».

## Благодарности

Я выражаю глубокую признательность своему научному руководителю к.ф.-м.н. Осминкиной Л.А. за помощь в научно-исследовательской деятельности и аспирантской жизни, а также за предоставленную возможность выполнения данной работы, внимание, обсуждение результатов и всестороннюю поддержку. Искреннюю благодарность выражаю коллективу лаборатории физических методов биосенсорики и нанотераностики кафедры медицинской физики за неоценимую поддержку и дружескую атмосферу в течение всего времени выполнения диссертационной работы, а также сотрудникам и преподавателям физического факультета за ценные знания, полученные в ходе обучения на физическом факультете в МГУ имени М.В. Ломоносова.

Выражаю благодарность коллегам: А.А. Кудрявцеву (Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН), Б.Д. Животовскому, Ж.В. Самсоновой и Н.В. Первухину (Лаборатория исследования механизмов апоптоза, факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова), С.Ю. Турицеву (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», физический факультет, кафедра общей физики, заведующий кафедрой), О.Ю. Шалыгину (доцент кафедры общей физики и молекулярной электроники, физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, В.Г. Андреева (доцент кафедры акустики, физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова).

Отдельно хочу поблагодарить всех своих родных и близких, в особенности родителей Наташина А.И., Наташину Т.В. и своего супруга Цурикова К.Э., которые всегда верили в меня и поддерживали на этом нелегком пути.

## Список литературы

- [1.]Ищенко А. А., Фетисов Г. В., Асланов Л. А. Нанокремний: свойства, получение, применение, методы исследования и контроля. – Физматлит, 2011.
- [2.]Canham L., ed. Handbook of porous silicon: Second Edition. Springer International Publishing. Berlin, 2018.
- [3.]Osminkina L. A., Timoshenko V. Y. Porous silicon as a sensitizer for biomedical applications //Open Material Sciences. – 2016. – Т. 3. – №. 1.
- [4.]Osminkina L. A. et al. Porous silicon nanoparticles as efficient sensitizers for sonodynamic therapy of cancer //Microporous and Mesoporous Materials. – 2015. – Т. 210. – С. 169-175.
- [5.]Осминкина Л. А. и др. Влияние наноструктурированного кремния на процессы пролиферации стволовых и раковых клеток //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 151. – №. 1. – С. 91-95.
- [6.]Canham L.T. «Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers» // Appl. Phys. Lett. 1990. V. 57. № 10. p. 1046-1048.
- [7.]Sailor\_PorSi in practice\_2011
- [8.]Smith R. L., Collins S. D. Porous silicon formation mechanisms //Journal of Applied Physics. – 1992. – Т. 71. – №. 8. – С. R1-R22.
- [9.]Calcott P. D. J., Canham L. T. Properties of Porous Silicon //Ed. by L. Canham. INSPEC, London. – 1997. – С. 203-207.
- [10.] Sailor M. J. Porous silicon in practice: preparation, characterization and applications. – John Wiley & Sons, 2012.
- [11.] Нечитайлов А.А., Астрова Е.В., Кукушкина Ю.А., Каменева С.Ю. Окислительно-гравиметрическая порометрия макропористого кремния //Физика и техника полупроводников. – 2006. – Т. 40. – №. 10. – С. 1254-1258.
- [12.] Завацкий С. А., Бондаренко А. В. Гравиметрические методы определения пористости анодно обработанного кремния: особенности реализации и оценка точности //Доклады Белорусского государственного университета информатики и радиоэлектроники. – 2017. – №. 8 (110). – С. 21-25.
- [13.] Cullis A. G., Canham L. T., Calcott P. D. J. «The structural and luminescence properties of porous silicon» // Appl. Phys. Rev. 1997. Vol. 82, no. 3. p. 909-965.
- [14.] Smith R. L., Collins S. D. «Porous silicon formation mechanisms» // J. Appl. Phys. 1992. Vol. 71, no. 8. Pp. R1-R12

- [15.] Uhlir A. «Electrolytic shaping of germanium and silicon» // *Bell. Syst. Tech. J.* 1956. Vol. 35, no. 2. p. 333-337.,28.Smith R. L., Collins S. D. «Porous silicon formation mechanisms» // *J. Appl. Phys.* 1992. Vol. 71, no. 8. Pp. R1-R12.
- [16.] Lehmann V., Stengl R., Luigart A. «On the morphology and the electrochemical formation mechanism of mesoporous silicon» // *Materials Science and Engineering B.* 2000. Vol. 69–70. p. 11–22.
- [17.] Cullis A. G., Canham L. T., "Visible light emission due to quantum size effects in highly porous crystalline silicon"// *Nature*, 1991, v.353, p.335.
- [18.] Qin Z. et al. Size control of porous silicon nanoparticles by electrochemical perforation etching // *Particle & Particle Systems Characterization.* – 2014. – T. 31. – №. 2. – C. 252-256.
- [19.] Peng K. Q. et al. Synthesis of large-area silicon nanowire arrays via self-assembling nanoelectrochemistry // *Advanced Materials.* – 2002. – T. 14. – №. 16. – C. 1164
- [20.] Sivakov V., Christiansen S. Novel discovery of silicon // *Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics.* – 2012. – T. 7. – №. 6. – C. 583-590.,36=36. Huang Z. et al. Metal-assisted chemical etching of silicon: a review // *Advanced material.* – 2011. – T. 23. – №. 2. – C. 285-308.].
- [21.] Sivakov V., Christiansen S. Novel discovery of silicon // *Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics.* – 2012. – T. 7. – №. 6. – C. 583-590.,37=37. 12. Qu Y., Zhou H., Duan X. Porous silicon nanowires // *Nanoscale.* – 2011. – T. 3. – №. 10. – C. 4060-4068
- [22.] Zhang M. L. et al. Preparation of large-area uniform silicon nanowires arrays through metal-assisted chemical etching // *The Journal of Physical Chemistry C.* – 2008. – T. 112. – №. 12. – C. 4444-4450.
- [23.] Harraz F. A. et al. Metal deposition onto a porous silicon layer by immersion plating from aqueous and nonaqueous solutions // *Journal of the Electrochemical Society.* – 2002. – T. 149. – №. 9. – C. C456.
- [24.] Sivakov V. et al. Silicon nanowire-based solar cells on glass: synthesis, optical properties, and cell parameters // *Nano letters.* – 2009. – T. 9. – №. 4. – C. 1549-1554.
- [25.] Sivakov V., Christiansen S. Novel discovery of silicon // *Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics.* – 2012. – T. 7. – №. 6. – C. 583-590].
- [26.] Qu Y., Zhou H., Duan X. Porous silicon nanowires // *Nanoscale.* – 2011. – T. 3. – №. 10. – C. 4060-4068

- [27.] Sivakov V. A. et al. Roughness of silicon nanowire sidewalls and room temperature photoluminescence //Physical Review B—Condensed Matter and Materials Physics. – 2010. – Т. 82. – №. 12. – С. 125446.
- [28.] Canham L. (ed.). Handbook of porous silicon. – Berlin, Germany: : Springer International Publishing, 2014. – С. 163-170.
- [29.] Heinrich J. L. et al. Luminescent colloidal silicon suspensions from porous silicon //Science. – 1992. – Т. 255. – №. 5040. – С. 66-68.
- [30.] Компан М. Е., Шабанов И. Ю. Исследование процессов релаксации люминесценции пористого кремния методом время-разрешенной спектроскопии //Физика твердого тела. – 1997. – Т. 39. – №. 7. – С. 1165-1169.
- [31.] Новикова В. А., Варжель С. В. Рассеяние света и его применение в волоконной оптике //СПб.: С.-петерб. нац. исследоват. ун-т информ. технологий, механики и оптики. – 2019.
- [32.] Instruments M. Zetasizer nano user manual Malvern Instruments Ltd //Worcestershire WR14 1XZ, UK. – 2007.
- [33.] Накамото К. Инфракрасные спектры неорганических и координационных соединений: Пер. с англ. – Мир, 1966.
- [34.] Theis W. «Optical properties of porous silicon» // Surf. Science Rep., 1997, V. 29, pp. 91 192
- [35.] Salonen J., Lehto V. P. Fabrication and chemical surface modification of mesoporous silicon for biomedical applications //Chemical Engineering Journal. – 2008. – Т. 137. – №. 1. – С. 162-172.
- [36.] Аммон Ярив П. Ю. Оптические волны в кристаллах. – 1987.
- [37.] Бонч-Бруевич В. Л., Калашников С. Г. Физика полупроводников. – Москва: М.: наука, 1977. – Т. 672.
- [38.] Голубев В. Г. и др. Спектры рамановского рассеяния и электропроводность тонких пленок кремния со смешанным аморфно-нанокристаллическим фазовым составом: определение объемной доли нанокристаллической фазы //Физика твердого тела. – 1997. – Т. 39. – №. 8. – С. 1348-1353.]:
- [39.] Richter H., Wang Z. P., Ley L. The one phonon Raman spectrum in microcrystalline silicon //Solid State Communications. – 1981. – Т. 39. – №. 5. – С. 625-629.
- [40.] Campbell I. H., Fauchet P. M. The effects of microcrystal size and shape on the one phonon Raman spectra of crystalline semiconductors //Solid State Communications. – 1986. – Т. 58. – №. 10. – С. 739-741

- [41.] Bustarret E., Hachicha M. A., Brunel M. Experimental determination of the nanocrystalline volume fraction in silicon thin films from Raman spectroscopy //Applied Physics Letters. – 1988. – Т. 52. – №. 20. – С. 1675-1677.
- [42.] Compaan A., Lee M. C., Trott G. J. Phonon populations by nanosecond-pulsed Raman scattering in Si //Physical Review B. – 1985. – Т. 32. – №. 10. – С. 6731.
- [43.] Meier C. et al. Raman properties of silicon nanoparticles //Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures. – 2006. – Т. 32. – №. 1-2. – С. 155-158
- [44.] Paillard V. et al. Improved one-phonon confinement model for an accurate size determination of silicon nanocrystals //Journal of Applied Physics. – 1999. – Т. 86. – №. 4. – С. 1921-1924.
- [45.] Bustarret E., Hachicha M. A., Brunel M. Experimental determination of the nanocrystalline volume fraction in silicon thin films from Raman spectroscopy //Applied Physics Letters. – 1988. – Т. 52. – №. 20. – С. 1675-1677.
- [46.] Voigt F., Sivakov V., Gerliz V., Bauer G. H., Hoffmann B., Radnoci G. Z., Pecz B., Christiansen S. Photoluminescence of samples produced by electroless wet chemical etching: Between silicon nanowires and porous structures // Phys. Stat. Sol. A. 2011. Vol. 208, no. 4. Pp. 893-899.
- [47.] Zimmermann H., Zimmermann H. Integrated silicon optoelectronics. – Berlin: Springer, 2010. – Т. 148. – С. 386.
- [48.] Кашкаров П. К., Тимошенко В. Ю. Оптика твердого тела и систем пониженной размерности //М.: Пульс. – 2008.
- [49.] В. Луцкий, Т. Пинскеп, «Размерное квантование», Наука, с. 56, 1983.
- [50.] П. К. Кашкаров, В. Ю. Тимошенко, «Оптика твердого тела и систем пониженной размерности», Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, 2009.
- [51.] Sripanyakorn S. et al. Dietary silicon and bone health //Nutrition Bulletin. – 2005. – Т. 30. – №. 3. – С. 222-230.
- [52.] Canham L. T. Nanoscale semiconducting silicon as a nutritional food additive //Nanotechnology. – 2007. – Т. 18. – №. 18. – С. 185704.
- [53.] Williams D. F. On the mechanisms of biocompatibility //Biomaterials. – 2008. – Т. 29. – №. 20. – С. 2941-2953.
- [54.] Bergsma J. E. et al. Late degradation tissue response to poly (L-lactide) bone plates and screws //Biomaterials. – 1995. – Т. 16. – №. 1. – С. 25-31.

- [55.] Reffitt D. M. et al. Silicic acid: its gastrointestinal uptake and urinary excretion in man and effects on aluminium excretion //Journal of Inorganic Biochemistry. – 1999. – T. 76. – №. 2. – C. 141-147.
- [56.] Allongue P., Costa-Kieling V., Gerischer H. Etching of silicon in NaOH solutions: II. Electrochemical studies of n-Si (111) and (100) and mechanism of the dissolution //Journal of the Electrochemical Society. – 1993. – T. 140. – №. 4. – C. 1018.
- [57.] Anderson S. H. C. et al. Dissolution of different forms of partially porous silicon wafers under simulated physiological conditions //physica status solidi (a). – 2003. – T. 197. – №. 2. – C. 331-335.
- [58.] Jugdaohsingh R. et al. Dietary silicon intake is positively associated with bone mineral density in men and premenopausal women of the Framingham Offspring cohort //Journal of Bone and Mineral Research. – 2004. – T. 19. – №. 2. – C. 297-307.
- [59.] Carlisle E. M. The nutritional essentiality of silicon. – 1982.
- [60.] Ravin Jugdaohsingh R. J. et al. Dietary silicon intake and absorption. – 2002.
- [61.] Bellia J. P., Birchall J. D., Roberts N. B. Beer: a dietary source of silicon //The Lancet. – 1994. – T. 343. – №. 8891. – C. 235.
- [62.] Bissé E. et al. Reference values for serum silicon in adults //Analytical biochemistry. – 2005. – T. 337. – №. 1. – C. 130-135.
- [63.] Carlisle E. M. Silicon: a possible factor in bone calcification //Science. – 1970. – T. 167. – №. 3916. – C. 279-280.
- [64.] Schwarz K., Milne D. B. Growth-promoting effects of silicon in rats //Nature. – 1972. – T. 239. – №. 5371. – C. 333-334.
- [65.] Carlisle E. M. Biochemical and morphological changes associated with long bone abnormalities in silicon deficiency //The Journal of nutrition. – 1980. – T. 110. – №. 5. – C. 1046-1056.
- [66.] Canham L. T. Bioactive silicon structure fabrication through nanoetching techniques //Advanced Materials. – 1995. – T. 7. – №. 12. – C. 1033-1037.
- [67.] McInnes S. J. P., Voelcker N. H. Porous silicon–polymer composites for cell culture and tissue engineering applications //Porous Silicon for Biomedical Applications. – Woodhead Publishing, 2014. – C. 420-469.
- [68.] Godin B. et al. Tailoring the degradation kinetics of mesoporous silicon structures through PEGylation //Journal of biomedical materials research Part A. – 2010. – T. 94. – №. 4. – C. 1236-1243.
- [69.] Johnsen H. M. et al. Stable “snow lantern-like” aggregates of silicon nanoparticles suitable as a drug delivery platform //Nanoscale. – 2024. – T. 16. – №. 20. – C. 9899-9910.

- [70.] Kang R. H. et al. Systematic degradation rate analysis of surface-functionalized porous silicon nanoparticles //Materials. – 2019. – T. 12. – №. 4. – C. 580.
- [71.] Tzur-Balter A. et al. Mechanism of erosion of nanostructured porous silicon drug carriers in neoplastic tissues //Nature communications. – 2015. – T. 6. – №. 1. – C. 6208.
- [72.] Popplewell J. F. et al. Kinetics of uptake and elimination of silicic acid by a human subject: a novel application of  $^{32}\text{Si}$  and accelerator mass spectrometry //Journal of Inorganic Biochemistry. – 1998. – T. 69. – №. 3. – C. 177-180.
- [73.] Reffitt D. M. et al. Silicic acid: its gastrointestinal uptake and urinary excretion in man and effects on aluminium excretion //Journal of Inorganic Biochemistry. – 1999. – T. 76. – №. 2. – C. 141-147.
- [74.] Korotcenkov G., Cho B. K. Silicon porosification: state of the art //Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences. – 2010. – T. 35. – №. 3. – C. 153-260.
- [75.] Lehto V. P. et al. Nanostructured silicon-based materials as a drug delivery system for water-insoluble drugs //Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs. – 2013. – C. 477-508.
- [76.] Shahbazi M. A., Herranz B., Santos H. A. Nanostructured porous Si-based nanoparticles for targeted drug delivery //Biomatter. – 2012. – T. 2. – №. 4. – C. 296-312.
- [77.] Liu D. et al. Biocompatibility of porous silicon for biomedical applications //Porous silicon for biomedical applications. – Woodhead Publishing, 2014. – C. 129-181.
- [78.] Kunzmann A. et al. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-general subjects. – 2011. – T. 1810. – №. 3. – C. 361-373.
- [79.] Bimbo L. M. et al. Biocompatibility of thermally hydrocarbonized porous silicon nanoparticles and their biodistribution in rats //ACS nano. – 2010. – T. 4. – №. 6. – C. 3023-3032.
- [80.] Johnsen H. M. et al. Nano-strategies for advancing oral drug delivery: Porous silicon particles and cyclodextrin encapsulation for enhanced dissolution of poorly soluble drugs //International Journal of Pharmaceutics. – 2024. – C. 124809.
- [81.] Hubatsch I., Ragnarsson E. G. E., Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers //Nature protocols. – 2007. – T. 2. – №. 9. – C. 2111-2119.
- [82.] Merly L., Smith S. L. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something //Immunopharmacology and immunotoxicology. – 2017. – T. 39. – №. 2. – C. 55-58.

- [83.] Serda R. E. et al. Mitotic trafficking of silicon microparticles //Nanoscale. – 2009. – T. 1. – №. 2. – C. 250-259.
- [84.] Bimbo L. M. et al. Drug permeation across intestinal epithelial cells using porous silicon nanoparticles //Biomaterials. – 2011. – T. 32. – №. 10. – C. 2625-2633.
- [85.] Chin V. et al. Compatibility of primary hepatocytes with oxidized nanoporous silicon //Advanced Materials. – 2001. – T. 13. – №. 24. – C. 1877-1880.
- [86.] Salonen J. et al. Mesoporous silicon in drug delivery applications //Journal of pharmaceutical sciences. – 2008. – T. 97. – №. 2. – C. 632-653.
- [87.] Park J. H. et al. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications //Nature materials. – 2009. – T. 8. – №. 4. – C. 331-336.
- [88.] Gai S. et al. Recent advances in functional nanomaterials for light-triggered cancer therapy //Nano today. – 2018. – T. 19. – C. 146-187.
- [89.] Zou Z. et al. Natural gelatin capped mesoporous silica nanoparticles for intracellular acid-triggered drug delivery //Langmuir. – 2013. – T. 29. – №. 41. – C. 12804-12810.
- [90.] Wen H. et al. Inorganic Nanomaterials for Photothermal-Based Cancer Theranostics //Advanced Therapeutics. – 2021. – T. 4. – №. 2. – C. 2000207.
- [91.] Liu Y. et al. Photothermal therapy and photoacoustic imaging via nanotheranostics in fighting cancer //Chemical Society Reviews. – 2019. – T. 48. – №. 7. – C. 2053-2108.
- [92.] Dolmans D. E., Fukumura D., Jain R. K. Photodynamic therapy for cancer //Nature reviews cancer. – 2003. – T. 3. – №. 5. – C. 380-387.
- [93.] Zhang W. et al. Photogeneration of reactive oxygen species on uncoated silver, gold, nickel, and silicon nanoparticles and their antibacterial effects //Langmuir. – 2013. – T. 29. – №. 15. – C. 4647-4651.
- [94.] Osminkina L. A., Gongalsky M. B. Porous silicon suspensions and colloids //Handbook of Porous Silicon: Second Edition. – 2018. – C. 227-245.
- [95.] Canham, L. Tunable properties of porous silicon. In L. Canham (Ed.)// Handbook of porous silicon. Cham: Springer International Publishing. – 2018. – C. 283–290,
- [96.] Canham L. T. Nanoscale semiconducting silicon as a nutritional food additive //Nanotechnology. – 2007. – T. 18. – №. 18. – C. 185704.
- [97.] Park Y. et al. Photoluminescent and biodegradable porous silicon nanoparticles for biomedical imaging //Journal of Materials Chemistry B. – 2019. – T. 7. – №. 41. – C. 6271-6292.

- [98.] Tolstik E. et al. Linear and non-linear optical imaging of cancer cells with silicon nanoparticles //International journal of molecular sciences. – 2016. – T. 17. – №. 9. – C. 1536.
- [99.] Tolstik E. et al. Studies of silicon nanoparticles uptake and biodegradation in cancer cells by Raman spectroscopy //Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2016. – T. 12. – №. 7. – C. 1931-1940.
- [100.] Gongalsky M. B. et al. Porous silicon nanoparticles as biocompatible contrast agents for magnetic resonance imaging //Applied physics letters. – 2015. – T. 107. – №. 23.
- [101.] Jung Y., Huh Y., Kim D. Recent advances in surface engineering of porous silicon nanomaterials for biomedical applications //Microporous and Mesoporous Materials. – 2021. – T. 310. – C. 110673.
- [102.] Maximchik P. V. et al. Biodegradable porous silicon nanocontainers as an effective drug carrier for regulation of the tumor cell death pathways //ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2019. – T. 5. – №. 11. – C. 6063-6071.
- [103.] Shabir Q. Biodegradability of porous silicon //Handbook of Porous Silicon. – 2014. – C. 395-401.
- [104.] Cunin F. et al. Biomolecular screening with encoded porous-silicon photonic crystals //Nature materials. – 2002. – T. 1. – №. 1. – C. 39-41.
- [105.] Moxon K. A. et al. Bioactive properties of nanostructured porous silicon for enhancing electrode to neuron interfaces //Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2007. – T. 18. – №. 10. – C. 1263-1281.
- [106.] Low S. P. et al. Generation of reactive oxygen species from porous silicon microparticles in cell culture medium //Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2010. – T. 93. – №. 3. – C. 1124-1131.
- [107.] Godin B. et al. Discoidal porous silicon particles: fabrication and biodistribution in breast cancer bearing mice //Advanced functional materials. – 2012. – T. 22. – №. 20. – C. 4225-4235.
- [108.] Anglin E. J. et al. Porous silicon in drug delivery devices and materials //Advanced drug delivery reviews. – 2008. – T. 60. – №. 11. – C. 1266-1277.

- [109.] Salonen J., Lehto V. P. Fabrication and chemical surface modification of mesoporous silicon for biomedical applications // *Chemical Engineering Journal*. – 2008. – Т. 137. – №. 1. – С. 162-172.
- [110.] Anselmo A. C., Mitragotri S. An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems // *Journal of Controlled Release*. – 2014. – Т. 190. – С. 15-28.
- [111.] Liu M. et al. Heart-targeted nanoscale drug delivery systems // *Journal of biomedical nanotechnology*. – 2014. – Т. 10. – №. 9. – С. 2038-2062.
- [112.] Canham L. Pore volume (porosity) in porous silicon // *Handbook of Porous Silicon*. Springer, New York City. – 2014. – С. 135-142.
- [113.] Santos H. A. et al. Porous silicon nanoparticles for nanomedicine: preparation and biomedical applications // *Nanomedicine*. – 2014. – Т. 9. – №. 4. – С. 535-554.
- [114.] А.Л. Николаев, Д.С. Чичерин, И.В. Мелихов «Соносенсбилизация материалов для направленного транспорта лекарственных веществ» // *Рос. хим. ж.* 2002. Т. 46. № 3., с.1-5.
- [115.] Николаев А.Л., Гопин А.В., Божевольнов В.Е., Андропова Н.В., Трещалина Е.М., «Ультразвуковая наномедицина в аспекте терапии онкологических заболеваний»// Тезисы докладов «От наноструктур, наноматериалов и нанотехнологий к наноиндустрии» Четвертая международная конференция. - С. 64-65
- [116.] Xu H. et al. Nanoparticles in sonodynamic therapy: state of the art review // *RSC advances*. – 2016. – Т. 6. – №. 56. – С. 50697-50705.
- [117.] Л.А. Осминкина, Е.Н. Лукьянова, М.Б. Гонгальский, А.А. Кудрявцев, А.Х. Гайдарова, Р.А.Полтавцева, П.К. Кашкаров, В.Ю. Тимошенко, Г.Т. Сухих, «Влияние наноструктурированного кремния на процессы пролиферации стволовых и раковых клеток» // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011. Т. 151. №1. С. 91-95.
- [118.] L.A. Osminkina, A.L. Nikolaev, A.P. Sviridov, N.V. Andronova, K.P. Tamarov, M.B. Gongalsky, A.A. Kudryavtsev, H.M. Treshalina, V.Yu. Timoshenko, «Porous silicon nanoparticles as efficient sensitizers for sonodynamic therapy of cancer» // *Microporous and Mesoporous Materials* – V. 210, 1 July 2015, p. 169–175.
- [119.] Gongalsky M. B. et al. Formation of Si/SiO<sub>2</sub> luminescent quantum dots from mesoporous silicon by sodium tetraborate/citric acid oxidation treatment // *Frontiers in Chemistry*. – 2019. – Т. 7. – С. 165.

- [120.] Lazebnik Y. A. et al. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE //Nature. – 1994. – T. 371. – №. 6495. – C. 346-347.
- [121.] Crowley L. C. et al. Dead cert: measuring cell death //Cold Spring Harbor Protocols. – 2016. – T. 2016. – №. 12. – C. 1064-1072.
- [122.] Plesca D., Mazumder S., Almasan A. DNA damage response and apoptosis //Methods in enzymology. – 2008. – T. 446. – C. 107-122.
- [123.] Bi X. et al. Evaluating HER2 amplification status and acquired drug resistance in breast cancer cells using Raman spectroscopy //Journal of biomedical optics. – 2014. – T. 19. – №. 2. – C. 025001.
- [124.] Slowing I., Trewyn B. G., Lin V. S. Y. Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells //Journal of the American Chemical Society. – 2006. – T. 128. – №. 46. – C. 14792-14793.
- [125.] Tamarov K. et al. Nano air seeds trapped in mesoporous janus nanoparticles facilitate cavitation and enhance ultrasound imaging //ACS applied materials & interfaces. – 2017. – T. 9. – №. 40. – C. 35234-35243.
- [126.] Sviridov A. et al. Cavitation induced by Janus-like mesoporous silicon nanoparticles enhances ultrasound hyperthermia //Frontiers in chemistry. – 2019. – T. 7. – C. 393.
- [127.] Gongalsky M. B. et al. Optical monitoring of the biodegradation of porous and solid silicon nanoparticles //Nanomaterials. – 2021. – T. 11. – №. 9. – C. 2167.
- [128.] Atchley A.A., Prosperetti A. The crevice model of bubble nucleation // J. Acoust. Soc. Am. 1989. V. 86. № 3. P. 1065–1084.
- [129.] Giacomello A., Roth R. Bubble formation in nanopores: a matter of hydrophobicity, geometry, and size // Advances in Physics: X. 2020. V. 5. № 1. 1817780.
- [130.] Borkent B.M., Gekle S., Prosperetti A., Lohse D. Nucleation threshold and deactivation mechanisms of nanoscopic cavitation nuclei // Physics of fluids. 2009. V. 21. № 10. 102003.