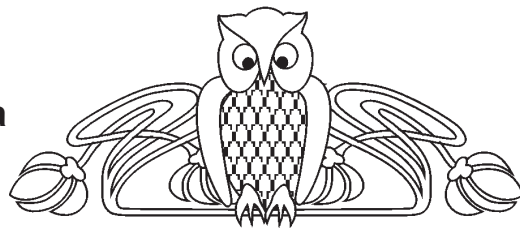




УДК 539.25:577.35

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ КРЕМНИЯ С КЛЕТКАМИ HeLa

Д. В. Терин, Д. Н. Браташов, Е. М. Ревзина, Г. Е. Роках



Терин Денис Владимирович, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры материаловедения, технологии и управления качеством, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, terinden@mail.ru

Браташов Даниил Николаевич, кандидат физико-математических наук, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, доцент кафедры инноватики на базе АО «НЕФТЕМАШ»-САПКОН, Саратов, dn2010@gmail.com

Ревзина Елена Мстиславовна, кандидат физико-математических наук, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, заведующий кафедрой инноватики на базе АО «НЕФТЕМАШ»-САПКОН, Саратов, lesya16@bk.ru

Роках Глеб Евгеньевич, студент факультета нано- и биомедицинских технологий, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, g.rokah@yandex.ru

Работа посвящена исследованию взаимодействия субмикронных частиц пористого кремния с линией клеток рака шейки матки HeLa. Подложки пористого кремния были получены двухэтапным химическим методом на основе травления пластин полупроводникового кремния плавиковой кислотой HF в смеси с нитратом серебра  $\text{AgNO}_3$ , в присутствии перекиси водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$ , что приводит к образованию наночастиц серебра, последующего травления образца и механического разделения слоя на отдельные наночастицы дроблением пористого слоя. Толщина полученного слоя пористого кремния, по данным сканирующей электронной микроскопии, составила порядка 2 мкм. Средний размер наночастиц, измеренный полуконтактным методом атомной силовой микроскопии, составлял около 200 нм. Для исследования токсичности и биосовместимости получаемых частиц проводили тест метаболической активности на основе красителя *Alamar Blue*. Метаболическую активность измеряли по флуоресценции образца на длине волны возбуждения 560 нм и длине волны детекции флуоресцентного сигнала 590 нм. Наночастицы не показали заметной токсичности на линии клеток HeLa, несмотря на использование серебра и плавиковой кислоты в качестве промежуточных реагентов при их получении. В образцах, содержащих наночастицы, наблюдается небольшое увеличение метаболической активности по сравнению с контрольным образцом.

**Ключевые слова:** пористый кремний, наночастицы Si, клетки HeLa, токсичность.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-473-475>

Пористый кремний является одним из перспективных материалов с точки зрения биофизики, поскольку может применяться для синтеза нано- и микрогабаритных люминесцентных частиц. Несмотря на то что наночастицы кремния являются по своей природе низкотоксичными и биоразлагаемыми, процесс их получения сопряжен с загрязнением различными реагентами, из которых наибольшую токсичность проявляет плавиковая кислота. Остатки реагентов приводят к тому, что вопрос токсичности и биосовместимости подобных частиц по-прежнему является спорным, и разные авторы показывают отличающиеся результаты, связанные с технологией синтеза, отмывкой частиц от реагентов, используемых при химическом травлении, побочных загрязнений при физических процессах получения, использовании веществ, обеспечивающих коллоидную стабильность [1–3].

Слои пористого кремния были получены двухэтапным химическим методом травления с помощью металла (*metal assisted etching*), подробно описанного в работах [4–7].

В качестве подложек нами использовались пластины монокристаллического кремния р-типа КДБ-4,5 с ориентацией  $\langle 100 \rangle$ . Травление пластин проходит в два этапа. Первый состоит в погружении подложки в раствор HF (4.8M) +  $\text{AgNO}_3$  (0.005M) для осаждения на ней Ag. Время погружения составляло 1 минуту. На втором этапе происходило непосредственное травление с получением пористого кремния в растворе HF (5M) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.5M) в течение 60 минут. Затем образцы погружали в  $\text{HNO}_3$  на 1 час.

Измерения морфологии поверхности подложки со сформированным слоем пористого кремния проводили методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) на установке NTEGRA Spectra (NTMDT-SI, Зеленоград) в полуконтактном режиме с использованием зондов NSG10 (TipsNano, Зеленоград). Резонансная частота кантилевера составляла 260 кГц, паспортный радиус закругления зонда – не более 10 нм. Обработка данных измерений АСМ проводилась в программе Gwyddion 2.51 [8], в ней осуществлялось выравнивание плоскости образца, устранение



артефактов сканирования. Измерение размеров наночастиц проводилось путём извлечения профилей вдоль диаметра частицы и поиска локаль-

ных минимумов вдоль профиля, соответствующих зазорам между частицами. Средний диаметр частицы составлял порядка 200 нм (рис. 1).

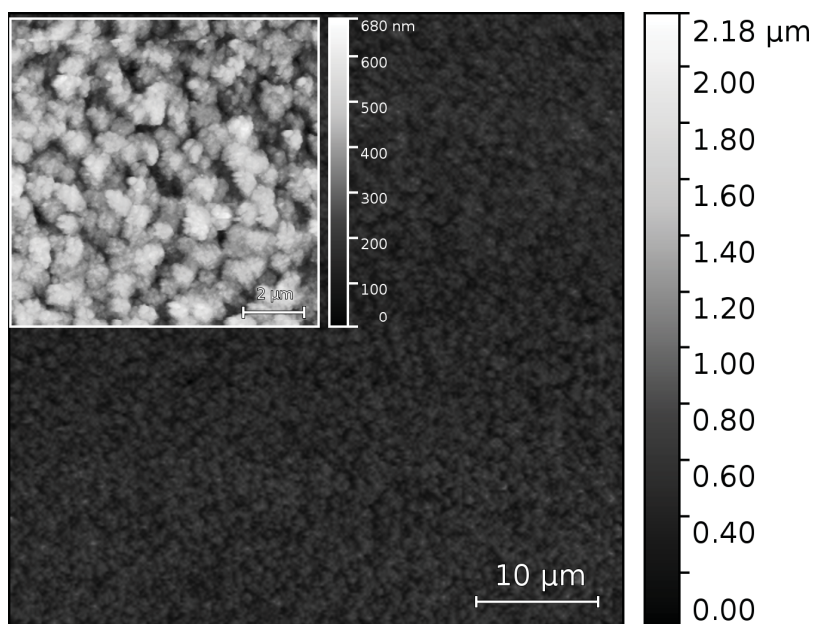


Рис. 1. Слой пористого кремния перед его механическим разрушением (атомно-силовая микроскопия)

Толщина пористого слоя, по данным СЭМ, составила 2,32 мкм. Наночастицы кремния были получены последующим механическим дроблением слоя пористого кремния на отдельные частицы субмикронного размера.

Научный интерес представляет то, как остаточные количества используемого при травлении серебра влияют на итоговую токсичность получаемых частиц. Для определения цитотоксичности в наших экспериментах использовалась клеточная линия рака шейки матки HeLa.

Клетки высевали на 96-луночный культуральный планшет в количестве  $10^4$  клеток на лунку. К клеткам добавляли тестируемое вещество в количестве 2,5; 5; 7,5; 10 мкл на лунку и инкубировали в течение 12 часов. После чего в каждую лунку вносили краситель *Alamar Blue* в количестве 10% от объема среды и инкубировали в течение 6 часов. Измерение флуоресценции проводили с помощью мультипланшетного ридера Synergy H1 (возбуждение на 560 нм/детекция на 590 нм) (рис. 2).

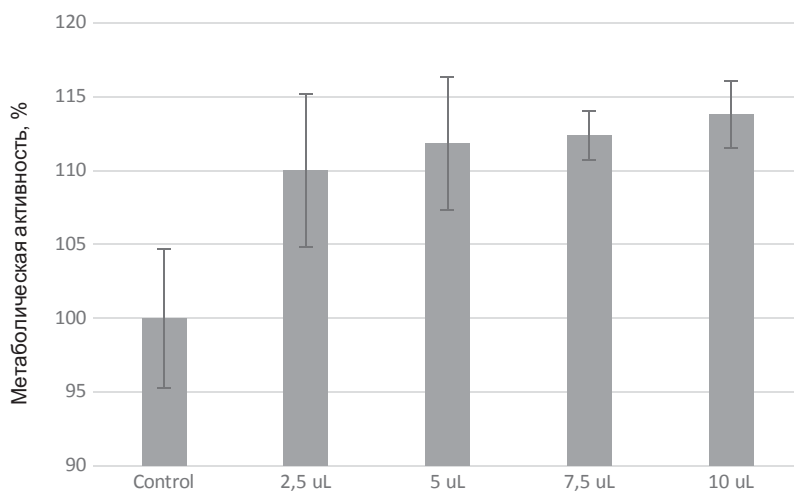


Рис. 2. Метаболическая активность контрольной культуры клеток и культуры клеток в присутствии частиц кремния в различных концентрациях



Результаты исследования показали, что частицы кремния в концентрации 2,5; 5; 7,5; 10 мкл приводят к увеличению метаболической активности клеток HeLa на 10–14% соответственно, по сравнению с контролем. Данный эффект для других разновидностей частиц субмикронных размеров обычно объясняют за счёт лучшей адгезии клеток при наличии подобных частиц. Также возможно, что добавление биоразлагаемых частиц кремния в среду для роста клеток немного меняет его свойства, повышая метаболическую активность клеток за счёт других эффектов [9].

#### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-07-00752а).

#### Список литературы

1. Durnev A. D., Solomina A. S., Daugel-Dauge N. O., Zhanataev A. K., Shreder E. D., Nemova E. P., Shreder O. V., Veligura V. A., Osminkina L. A., Timoshenko V. Y., Seredenin S. B. Evaluation of genotoxicity and reproductive toxicity of silicon nanocrystals // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2010. Vol. 149, iss. 4. P. 445–454.
2. Zhi Bo, Mishra S., Hudson-Smith N. V., Kortshagen U. R., Haynes Ch. L. Toxicity Evaluation of Boron- and Phosphorus-Doped Silicon Nanocrystals toward *Shewanella oneidensis* MR-1 // *ACS Appl. Nano Mater.* 2018. Vol. 1, iss. 9. P. 4884–4893.
3. Fucikova A., Valenta J., Pelant I., Hubalek Kalbacova M., Broz A., Rezek B., Kromka A., Bakaeva Z. Silicon nanocrystals and nanodiamonds in live cells : photoluminescence characteristics, cytotoxicity and interaction with cell cytoskeleton // *RSC Adv.* 2014. № 4. P. 10334–10342.
4. Najar A., Slimane A. B., Hedhili M. N., Anjum D., Sougrat R. Effect of hydrofluoric acid concentration on the evolution of photoluminescence characteristics in porous silicon nanowires prepared by Ag – assisted electroless etching method // *J. of Appl. Phys.* 2012. № 112. P. 1–6.
5. Lin L., Sun G. X. Synthesis and Photoluminescence Properties of Porous Silicon Nanowire Arrays // *Nanoscale Res. Lett.* 2010. № 5. P. 1822–1828.
6. Iatsunskiy I., Smyntyna V., Pavlenko N., Sviridova O. Peculiarities of Photoluminescence in Porous Silicon Prepared by Metal-Assisted Chemical Etching // *ISRN Optics.* 2012. Vol. 2012. P. 1–6.
7. Huang J., Jing Z., Yin W., Hui F. Metal-assisted chemical etching of silicon: a review // *Adv. Mater.* 2011. Vol. 44, iss. 23. P. 285–308.
8. Nečas D., Klapetek P. Gwyddion : an open-source software for SPM data analysis // *Cent. Eur. J. Phys.* 2012. Vol. 10, iss. 1. P. 181–188.
9. Haidary S. M., Corcoles E. P., Ali N. K. Nanoporous Silicon as Drug Delivery Systems for Cancer Therapies // *J. of Nanomaterials.* 2012. Vol. 2012. ID 830503. P. 1–15.

#### Investigation of Interaction Between Silicon-Based Nanoparticles and HeLa Cells

D. V. Terin, D. N. Bratashov, E. M. Revzina, G. E. Rokakh

Denis V. Terin, <https://orcid.org/0000-0003-2850-4406>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, terinden@mail.ru

Daniil N. Bratashov, <https://orcid.org/0000-0002-2096-4478>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, dn2010@gmail.com

Elena M. Revzina, <https://orcid.org/0000-0002-1287-5651>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, lesya16@bk.ru

Gleb E. Rokakh, <https://orcid.org/0000-0001-8845-2084>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, g.rokakh@yandex.ru

This work is about the investigation of the interaction of porous silicon submicron particles with the HeLa cervical cancer cell line. Substrates of the porous silicon were obtained with the two-staged chemical method based on synthesis of silver nanoparticles from silver nitrate AgNO<sub>3</sub> with the subsequent etching with fluoric acid HF in the presence of hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and mechanical separation of microparticles by shattering. The thickness of the obtained porous silicon layer measured by scanning electron microscopy (SEM), was about 2 mkm. The size of separate particles in the layer, measured by the semicontact atomic force microscopy method was about 200 nm. Testing of metabolic cell activity for cytotoxicity and biocompatibility of the obtained particles was done with Alasar Blue dye. Metabolic activity was measured by fluorescence of the sample with the excitation wavelength 560 nm and detection wavelength 590 nm. Nanoparticles do not show noticeable cytotoxicity with the HeLa cell line despite using silver nanoparticles and fluoric acid as intermediate reagents for their making. There is some increase in metabolic activity in the all samples containing submicron particles compared to the control sample.

**Key words:** porous silicon, Si nanoparticles, HeLa cells, toxicity.

**Acknowledgements:** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 18-07-00752а).

#### Образец для цитирования:

Терин Д. В., Браташов Д. Н., Ревзина Е. М., Роках Г. Е. Исследование взаимодействия наночастиц кремния с клетками HeLa // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* 2018. Т. 18, вып. 4. С. 473–475. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-473-475>

#### Cite this article as:

Terin D. V., Bratashov D. N., Revzina E. M., Rokakh G. E. Investigation of Interaction Between Silicon-Based Nanoparticles and HeLa Cells. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 473–475 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-473-475>