

УДК 544.72.02

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ФОРМИРОВАНИЯ ПОРИСТЫХ СТРУКТУР КРЕМНИЯ С ПОНИЖЕННОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬЮ

© 2022 г. А. Р. Илясов^{a, b, c, *}, Е. А. Гостева^{a, b, d}, В. В. Старков^e

^aНациональный исследовательский технологический университет “МИСиС”, Москва, 119049 Россия

^bНациональный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва, 115409 Россия

^cИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

^dРоссийский университет дружбы народов (РУДН), Москва, 117198 Россия

^eИнститут проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН, Черноголовка, Московская обл., 142432 Россия

*E-mail: ilyasov.1997@inbox.ru

Поступила в редакцию 03.06.2023 г.

После доработки 03.06.2023 г.

Принята к публикации 13.06.2023 г.

В работе представлены результаты серии экспериментов по определению цитотоксичности пористых структур кремния, полученных разными способами. Исследовались кристаллические и аморфные, микро- и нанопористые кремниевые слои с отжигом и без. Цитотоксичность изучалась по флуоресцентным микрофотографиям и с помощью стандартного коллориметрического МТТ-тестирования.

Ключевые слова: цитотоксичность, пористые наночастицы, наноструктуры, стратегии синтеза, наноструктурированная поверхность

DOI: 10.56304/S2079562922030186

ВВЕДЕНИЕ

Кремниевые пластины имеют биомедицинский потенциал применения. Проведенные ранее исследования показали, что образцы чистого кремния, а также пористые слои на кремниевых пластинах, не являются цитотоксичными при инкубации на их поверхности биологических объектов [1, 2]. Наблюдалась также заметная тенденция к увеличению жизнеспособных клеток, инкубированных с пористым кремнием (PSi). При этом необходимо отметить, что PSi, сформированные на поверхности кремниевых пластин как правило методами анодного травления, могут существенно различаться по морфологии и электрофизическим свойствам [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Формирование пористых слоев на поверхности кремниевых пластин

Для сравнения цитотоксичности на поверхности кремниевых пластин были сформированы следующие разновидности пористых слоев:

– кристаллические нанопористые слои (NPSi) с размером пор около 20 нм (образцы с №№ 1 и 4);

– пористые слои с вариативно изменяемой структурой пор по глубине слоя (GPSi-var), диаметр пор в аморфном нанопористом слое порядка 20–50 Å (образцы с № 2);

– пористые слои со столбчатой структурой пор диаметром около 2 мкм (образцы с № 3).

Клеточные культуры

Клетки SKOVip-kat культивировали в среде DMEM (HyClone, Logan, UT, США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, Logan, UT, США) и 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Москва, Россия). Клетки инкубировали во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. Для испытаний на цитотоксичность использовали клетки SKOVip-kat, стабильно экспрессирующие красный флуоресцентный белок Katushka [4].

Микроскопия

Съемка клеток на кремниевой пластине проводилась на флуоресцентном микроскопе Leica. Флуоресцентный белок Katushka имеет длины волн возбуждения и испускания 588 и 635 нм. Съемка клеток проводилась в канале Cy5 (возбуждение 620/60

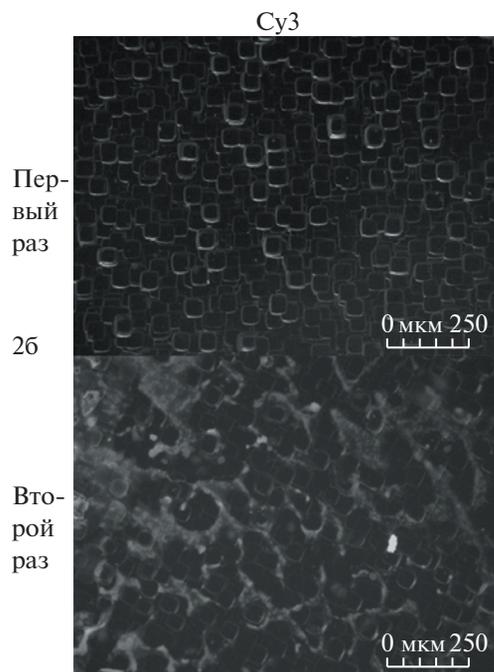


Рис. 1. Повреждение нанопористого GPSi-var слоя на образце 2б.

нм). Поверхность пластин лучше была видна при использовании флуоресцентного канала Су3 (545/30 нм).

Съемка на флуоресцентном микроскопе проводилась два раза. В первый раз на пятый день посадки клеток на пластины (предварительно пластины были простерилизованы в сухожаре при 150°C в течение 2 ч), второй – после повторной стерилизации пластин при тех же условиях и еще пяти дней инкубации с клетками.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Формирование образцов с NPSi слоями

Для формирования NPSi слоев использовались сильно легированные кремниевые пластины n-типа проводимости (марка КЭС 0.008) с ориентацией поверхности (100), удельное сопротивление используемых образцов $\rho_v \sim (0.005–0.009)$ Ом см. Анодное травление проводилось по традиционной схеме в растворе HF : C₂H₅OH = 1 : 1, при постоянной плотности тока травления $j = 80$ мА/см². Глубина травления (толщина пористого слоя) задавалась временем травления. После формирования пористого слоя, образцы подвергались сушке на воздухе при $T = 60–80^\circ\text{C}$ и раскалывались на две части (например, №№ 1а, 1б). Образцы с индексом “б” подвергались дополни-

тельной ЛФО обработке (лазерный фотонный отжиг) на воздухе в течении 30 с.

В отличие от процессов изготовления образцов №№ 1а, 1б, пористые слои образцов №№ 4а, 4б формировались на структурах, предварительно окисленных (толщина окисла 0.3 мкм) по схеме, описанной в [5]. Схема предполагает формирование NPSi слоя в локальных областях поверхности кремниевой пластины с предварительно удаленным с поверхности окислом кремния. Образец № 4б также, как и образец № 1б подвергнут ЛФО обработке. Глубина пористых слоев для образцов №№ 1а, 1б составляла 90 мкм, а образцов №№ 4а, 4б – 95 мкм.

Формирование GPSi-var слоя

Формирование GPSi-var слоев проводилось по схеме, описанной в [6]. Использовались кремниевые пластины p-типа проводимости (КДБ-8) с ориентацией поверхности (100), $\rho_v = (7.5–10)$ Ом см. Анодное травление проводилось при постоянной плотности тока травления $j = 15$ мА/см² в растворе HF : C₃H₈O(ISO) = 6 : 1 с добавлением 10⁻³ М СТАС (CH₃(CH₂)₁₅N(CH₃)₃Cl). Глубина травления составила 38 мкм. Также, как и в предыдущем случае образцы разделялись на № 2а и обработанный ЛФО № 2б.

Формирование макропористого PSi слоя

Использовались кремниевые пластины p-типа проводимости (КДБ-8) с ориентацией поверхности (100), $\rho_v = (7.5–10)$ Ом см. Анодное травление проводилось при постоянной плотности тока травления $j = 15$ мА/см² в растворе HF : DMF = 1 : 10 с добавлением СТАС (10⁻³ М). Глубина травления составила 47 мкм. После травления образец разделялся на №№ 3а и 3б. Образец №3б также подвергался ЛФО обработке.

Цитотоксичность

Использование клеток SKOVip-kat обусловлено именно тем, что они флуоресцируют без добавления красителей, а интенсивность флуоресценции прямо связана с их состоянием. Погибающие клетки перестают производить и поддерживать в нормальном состоянии белки Katushka, из-за чего интенсивность их флуоресценции падает. Активно растущие клетки, наоборот, светятся ярче. Таким образом, была возможность сделать снимки клеток на поверхности непрозрачных кремниевых пластин (рис. 1 и 2).

Рисунок 1 демонстрирует деградацию пористости слоя на пластине 2б после двух инкубаций

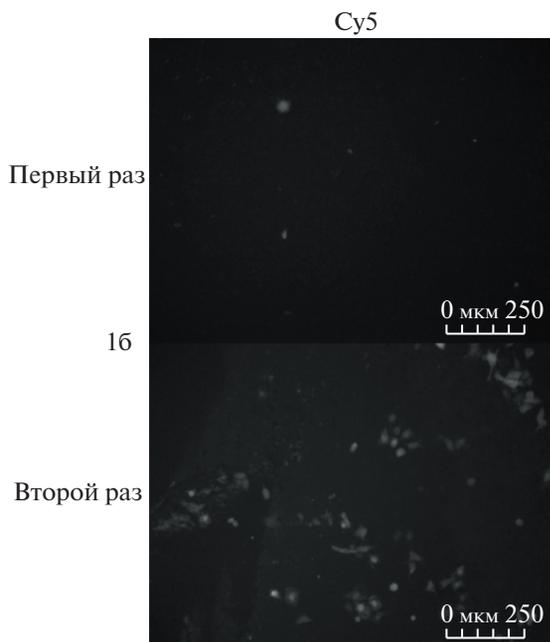


Рис. 2. Количество клеток, наблюдаемое на пластине 16 во время первой посадки клеток и во время второй.

с клетками. Подобные результаты наблюдались и на остальных пластинах. На рис. 2 показано, что на одной и той же пластине в первом эксперименте наблюдалось значительно меньше живых клеток, чем во второй раз. Скорее всего, во время первой инкубации оставшиеся токсичные вещества были недоотмыты с поверхностей пластин, что вызывало клеточную гибель. Подобные эффекты уже наблюдались ранее.

Дополнительно, для количественной оценки цитотоксичности пластин был выполнен стандартный колориметрический МТТ-тест. Результаты его представлены на рис. 3.

Анализ данных этого графика демонстрирует тенденцию к уменьшению цитотоксического эффекта отожженных пластин, что особенно заметно для образца 1. Данный результат ранее не демонстрировался.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам анализа полученных изображений, а также анализа выживаемости клеток по данным МТТ-теста были сделаны следующие выводы:

– Условия хранения, содержания и подготовки образцов сильно влияют на выживаемость клеток.

– Отжиг влияет на цитотоксичность образцов (образцы б по сравнению с а менее токсичны).

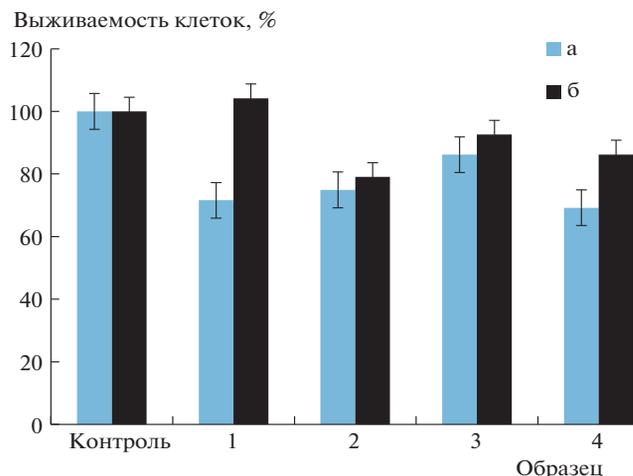


Рис. 3. Выживаемость клеток спустя пять дней инкубации с кремниевыми пластинами.

– Аморфные слои более токсичные, чем кристаллические (2 по сравнению с 1 и 4).

– Клетки влияют на качество поверхности, пористая поверхность может деградировать из-за инкубации с клетками.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, Государственное задание № 075-00706-22-00.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Гостева Е.А., Старков В.В., Илясов А.Р., Седловец Д.М. // Тез. докл. КЭЛТ. Т 2021. 13–17 сентября 2021, Черногловка. С. 66–67.
2. Gosteva, Iliasov A., Sedlovetz D., Starkov V. // Proc. 2021 IEEE Int. Conf. Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale 3M-NANO. 2021. P. 441–444. <https://doi.org/10.1109/3M-NANO49087.2021.9599796>.
3. Старков В.В. // Все материалы. Энциклоп. справ. 2009. № 4. С. 13–21.
4. Shipunova V.O., Kovalenko V.L., Kotelnikova P.A., Sogomonyan A.S., Shilova O.N., Komedchikova E.N., Zvyagin A.V., Nikitin M.P., Deyev S.M. // Pharmaceutics. 2022. V. 14 (1). P. 43. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010043>
5. Starkov V.V., Gosteva E.A., Zhrebtsov D.D., Chichkov M.V., Alexandrov N.V. // Processes. 2022. V. 10 (1). P. 163. <https://doi.org/10.3390/pr10010163>
6. Starkov V.V., Gosteva E.A., Sedlovetz D.M., Kah M.O. // J. Electrochem. Soc. 2018. V. 165 (11). P. E534–E539.

Formation Processes Optimization of Porous Silicon Structures with Reduced Cytotoxicity

A. R. Ilyasov^{1, 2, 3, *}, E. A. Gosteva^{1, 2, 4}, and V. V. Starkov⁵

¹*National University of Science and Technology MISiS, Moscow, 119049 Russia*

²*National Research Nuclear University (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, 115409 Russia*

³*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

⁴*Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, 117198 Russia*

⁵*Institute of Microelectronics Technology and High Purity Materials, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia*

**e-mail: ilyasov.1997@inbox.ru*

Received June 3, 2022; revised June 3, 2022; accepted June 13, 2022

Abstract—The paper presents results of several experiments to determine the cytotoxicity of porous silicon structures synthesized by different methods. Crystalline and amorphous, micro- and nanoporous silicon layers with and without annealing were studied. Cytotoxicity was studied by fluorescence micrographs and by standard colorimetric MTT testing.

Keywords: cytotoxicity, porous nanoparticles, nanostructures, synthesis strategies, nanostructured surface