

Кандидат физико-математических наук

С.М. Комаров

Кремний с наноузором



Частицы и пленки кремния, пронизанные разветвленными порами, привлекают внимание десятков научных лабораторий в мире. С их помощью специалисты не только создают элементы для микроэлектроники, но и предлагают бороться с болезнями или получать дешевые электрические и оптические датчики для оперативной медицинской диагностики, проверки качества продуктов питания и определения загрязнителей окружающей среды. Одна из таких лабораторий находится в МГУ имени М.В. Ломоносова.

Нанозакуток

На физическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова есть Лаборатория физических методов биосенсорики и нанотераностики. Она находится в небольшой комнате в самом конце коридора на втором этаже факультета. Миниатюрный размер лаборатории связан не с тем, что в ней занимаются крошечными объектами — наноструктурами из пористого кремния. В комнате расположен мозговой центр и размещены ценные приборы. Однако уже в ближайшее время лаборатории обещают выделить дополнительные помещения для ее развития.

Лаборатория возникла в 2018 году благодаря инициативе ректора университета академика В.А. Садовниченко, который тогда объявил конкурс грантов для молодых уче-

▲ На поверхности нанопористого кремния легко рисовать красивые картинки. Например, сделать значок с эмблемой московского Университета

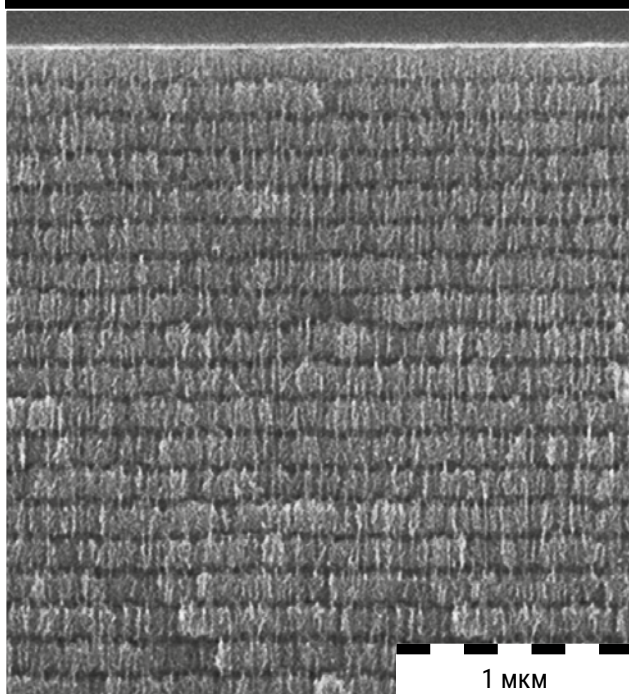
ных под названием «Зеленый свет»: победители получали возможность создать собственную лабораторию. В числе одиннадцати победителей конкурса оказалась кандидат физико-математических наук Любовь Андреевна Осминкина с идеей разрабатывать методы диагностики биомолекул, микроорганизмов и вирусов с помощью наноструктур из пористого кремния, а также использовать их в лечении. Собственно, термин «нанотераностика» и подразумевает одновременное применение одних и тех же наночастиц для диагностики заболевания и его лечения.

История нанопористого кремния началась в 50-х годах XX века. В 1956 году материаловед из Bell Labs Артур Улир-младший (Arthur Uhlir, Jr.) подбирал электролит и режимы электрополировки германиевых и кремниевых пластин для зарождающейся промышленности полупроводников. Используя электролит из плавиковой кислоты в этиленгликоле, он заметил, что на пластинках может возникать золотистая пленка.

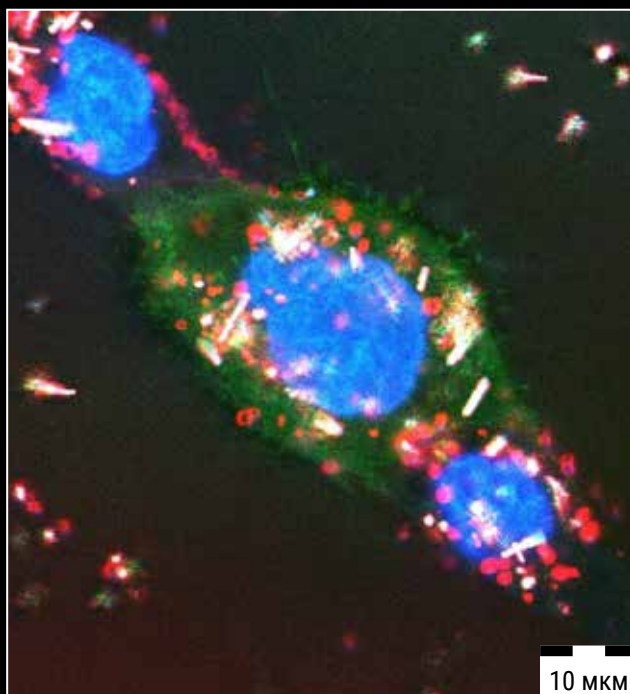
Его коллега Денис Тёрнер (Dennis R. Turner) обратил внимание на то, что пленка росла прямо на глазах, если концентрация кислоты в электролите превышала некоторое пороговое значение. Причем по мере утолщения она непрерывно меняла цвет (это связано с интерференцией света в тонких слоях), пока не приобретала окончательный оранжево-красный оттенок. А при увеличении плотности тока пленка легко отслаивалась от исходной кремниевой подложки. Рентгеновские методы того времени не выявили у полученной пленки кристаллической структуры, и Тёрнер



▲ Из наночастиц пористого кремния можно сделать однородную светящуюся суспензию, а из макрочешуек кремниевой пленки — препарат, интенсивность и спектр свечения которого изменится при успешной реакции с веществами, имеющимися в пробе



▲ Пористая пленка на поверхности кремния может состоять из многих слоев. Раскрошив ее, получают сырье для изготовления суспензий и других препаратов



▲ Наночастицы пористого кремния попали в переродившуюся клетку и подсветили ее

решил, что это слой аморфного диоксида кремния. Затем про пленку забыли до середины 80-х годов: кремниевым подложкам для транзисторов аморфная она противопоказана.

Техника эксперимента

Шло время, и материаловеды стали пытаться изготавливать из кремния микроскопические детальки, в частности нанонити. Один из способов — вытравить в кремниевой пластинке глубокие каналы, а потом частично растворить переемы между ними: получится нечто вроде щетины; если ее срезать — как раз и выйдут искомые кремниевые нити. А можно и не срезать — выйдет массив квантовых нитей, такие массивы хотели применять как катоды для плоских экранов. Тут-то и вспомнили о пористых пленках, возникавших при электрополировке в плавиковой кислоте.

В 1990-м году британец Ли Кэнэм (Leigh T. Canham), работавший тогда в Королевском центре связи и радиолокации, тщательно изучил такую возможность получения нитей и обнаружил, что предположение Тёрнера об оксидной природе пленки ошибочно: она состояла из чистейшего кремния, только в форме нанокристаллов. Затем Кэнэм обнаружил, что у такого, нанопористого, кремния есть необычное свойство — фотолюминесценция в видимой области спектра при комнатной температуре, хотя сам по себе монокристаллический кремний не излучает видимый свет. Например, когда Кэнэм осветил золотистую пленку пористого кремния фиолетовым лучом аргонового лазера, она засияла ярко-красным светом.

Потом оказалось, что такой пористый кремний можно заставить сиять всеми видимыми цветами — от красного до синего: чем мельче размер нанокристаллов, тем дальше в голубую область сдвигается максимум фотолюминесценции таких пленок и наночастиц. Для физиков неудивительно, что у материала в форме наночастиц или с нанорельефом поверхности оптические свойства могут изменяться кардинально.

Вторым интересным свойством нанопористой пленки оказалась возможность в процессе ее получения управлять пористостью и размерами пор.

Отчего же кремниевая пластинка не стравливается равномерно, почему на ее поверхности возникает пористая пленка? Несмотря на тридцатилетнюю историю, этот вопрос все еще вызывает интерес, за которым следуют новые открытия. В целом возникновение пор в кристалле кремния при электрохимическом травлении возможно из-за разрыва кремний-кремневых связей при их взаимодействии с имеющимися в пластинке положительными зарядами — электронными дырками — и ионами фтора, приходящими из электролита. Дырки в кремниевой подложке распределены неравномерно и травление начинается там, где их больше. При этом растущая пора как пылесос вытягивает заряды из окружающего кремния.

Вокруг растущих пор возникают кремниевые стенки, где дырок мало или вообще нет, эти участки почти не растворяются. Они, подобно водораздельным хребтам, направляют потоки зарядов, несущиеся в растущие поры.

Так получается самоорганизация пор в упорядоченную структуру: расстояние между ними определяется числом носителей заряда и скоростью их движения. А эти параметры, в свою очередь, заданы легированием кремния и приложенной при электрохимическом травлении разностью потенциалов.

Так, изменяя в процессе травления плотность тока, можно изменять пористость получаемой пленки и управлять ее показателем преломления. В результате материаловед точно знает, какую пористость он получит при том или ином режиме; у него есть надежный инструмент управления структурой материала и, следовательно, оптическими свойствами, а такое счастье выпадает ученому нечасто.

Материалы с закономерным периодическим расположением полостей оптики называют фотонными кристаллами, и для них уже придумали немало приложений. Кстати, самый известный природный фотонный кристалл — драгоценный камень опал; он также переливается всеми цветами радуги.

Материаловеды научились делать на пластинках кремния фотонные кристаллы с чередующимися пористыми структурами. Такие слоистые пленки позволяют создавать очень интересный оптический прибор — Брэгговское зеркало. В нем чередуются тонкие слои с большим и малым показателями преломления. В результате падения света на такую структуру возникает интерференция, зеркало отражает и пропускает только часть света определенных длин волн.

В общем, есть возможность изготавливать большое разнообразие кремниевых структур, однако какая от них может быть польза?

Нано и био

Поначалу возникла идея применить нанопористый кремний в оптоэлектронике. Увы, люминесценция его оказалась нестабильной из-за достаточно быстрого окисления нанокристаллов, да и светодиоды быстро заполнили рынок. Многие материаловеды пытались использовать пористый кремний как матрицу для выращивания металлических нанонитей для нужд микроэлектромеханики. Но и эта идея не сработала: металл недостаточно однородно заполнял поры.

Максимум чего удалось добиться — покрыть стенки кремниевых пор частицами золота, серебра, никеля, железа, в лучшем случае — сплошным покрытием. Монолитные металлические нити если и получались, оказывались короткими, максимум в сто раз длиннее диаметра, скорее, нанобруски, чем нити. Впрочем, были и интересные находки. Так, оказалось, что металл лучше осаждается в порах, освещенных светом, а в темноте осаждения нет. Это дает возможность формировать в пористом кремнии металлические объемные узоры методом, подобным литографии. Однако гораздо более продуктивной оказалась идея применить нанопористый кремний в медицине.

С точки зрения биотехнологов, кремний уникален сам по себе. Ведь это, с одной стороны, широко используемый в технике материал, а с другой — жизненно важный эле-

мент. Нанопористый кремний еще лучше: он достаточно быстро растворяется в биологических жидкостях, и организм его усваивает не только без вреда для себя, но даже с пользой, восполняя дефицит этого элемента.

Важное достоинство пористого кремния: на его разветвленную поверхность, а, скажем, в нанопористом кремнии удельная площадь поверхности достигает $1000 \text{ м}^2/\text{см}^3$, можно осадить не только какое-то полезное вещество, но и «пришить» активные молекулы. Неудивительно, что пористый кремний привлек пристальное внимание специалистов, которые придумали использовать его как каркасы для изготовления искусственных тканей, системы доставки лекарств в больную ткань и средства диагностики.

Два последних из этих направлений и развивает лаборатория Осминкиной. Вот, например, идея лечить рак с помощью частиц нанопористого кремния. Такие наночастицы, если их ввести в кровь, будут накапливаться в клетках опухоли: жадные до пищи переродившиеся клетки поглощают наночастицы определенного размера гораздо лучше, чем нормальные. Если же частицу наполнить лекарством, например противораковым препаратом доксорубицином, то в больной клетке оно высвободится. В результате свободный и ядовитый доксорубин концентрируется в раковых клетках, а не путешествует с кровотоком по всему организму, отравляя его. Обычно, чтобы усилить прицельное действие наночастиц, к их поверхности пришивают молекулы, их называют векторными, которые способны присоединяться к рецепторам на поверхности переродившихся клеток. Интересно, что частицы служат не только для лечения: благодаря люминесценции они подсвечивают раковые клетки изнутри и помогают обнаруживать их.

Используя физику, удается еще и усилить терапевтическое действие наноконтейнеров, причем именно в опухоли. Для этого на нее после введения целебных наночастиц направляют ультразвук. Под его действием вокруг каждой наночастицы формируется кавитационный пузырек. В таком пузырьке развиваются чудовищные давления и температура, сравнимая с температурой на поверхности Солнца. В результате в клетках происходят разрушительные «микровзрывы», а также появляются вещества с высокой реакционной способностью. Освобождаясь из пузырька, они начинают крушить переродившуюся клетку изнутри. А раз появляются такие помощники, можно уменьшить дозу лекарства, заключенного в частицы, и, соответственно, еще больше снизить его токсическое действие на весь организм.

В принципе, обработав поры кремния каким-нибудь биосовместимым металлом, удалось бы нагреть наночастицу до высокой температуры внутри организма с помощью инфракрасного излучения, которое глубоко проникает внутрь человеческого тела. Разогретая частица станет выжигать пораженную клетку. А если оснастить частицы пористого кремния магнитным веществом, то можно контролировать их локализацию с помощью магнитной томографии и использовать также для диагностики опухоли. В общем, в деле доставки лекарств и уничтожении больной ткани пористый нанокремний дает широкие возможности, хорошо продемонстрированные в университетских экспериментах.

Нанодиагностика

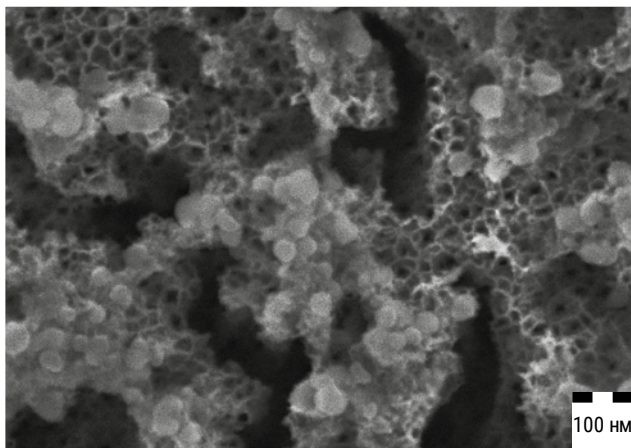
К сожалению, любому лекарству, даже самому перспективному, очень трудно выйти за пределы лаборатории: слишком сильна конкуренция между исследовательскими группами за благосклонность крупных фармацевтических компаний. А без их интереса и, стало быть, финансирования ни одна исследовательская лаборатория не может перейти даже к мало-мальски масштабным доклиническим испытаниям на животных. В конце концов, месячное содержание нескольких лабораторных мышей сравнимо с базовым окладом научного сотрудника. Значительно быстрее можно добиться успеха при создании способов диагностики, а не лечения.

У нанокремниевой пластинки такие параметры, как эффективный показатель преломления света и характеристики фотолюминесценции, заметно меняются, если на пластинке что-то адсорбируется («налипнет»). А налипнуть может многое. Это зависит как от деталей строения пластинки, так и от того, какие реакционно-способные вещества на нее пришиты.

Впервые возможность использовать нанопористый кремний для диагностики различных биологических молекул продемонстрировали в 1997 году исследователи из Скриппсовского исследовательского института в Ла-Хойя и Калифорнийского университета в Сан-Диего во главе с Майклом Сейлором (Michael J. Sailor). По изменению эффективного показателя преломления пластинки в результате реакции с веществом в пробе они смогли определить очень маленькие, пико- и фемтомолярные, концентрации нескольких белков и молекул небольшой нуклеотидной последовательности. Сейчас созданием таких датчиков заняты многие научные группы и компании.

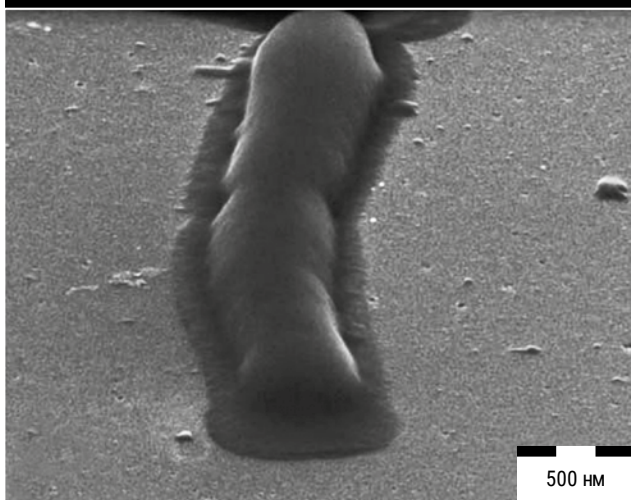
В лаборатории Л.А. Осминкиной показали, что из пористого нанокремния можно сделать сенсоры для диагностики бактерий и вирусов. Оказывается, и те и другие неплохо прилипают к диагностическим пластинкам. Причина в том, что у пористой кремниевой пленки, как и у клетки микроорганизма либо частицы вируса, имеется достаточно большая удельная площадь поверхности и электрический заряд. Благодаря пористой поверхности, электрическому заряду и силам Ван-дер-Ваальса, удается «вытянуть» из изучаемого раствора соответствующий биообъект. И действительно — вирусы плотными хлопьями налипают на пористую поверхность. Неплохо оседают и бактерии. Потом их наличие можно проверить по сдвигам интерференционных полос в спектрах отражения пленок.

Сегодня в лаборатории активно разрабатывают сенсоры в виде композитных наноструктур золото/серебро/кремний. Дело в том, что, направленно синтезируя пористые кремниевые пленки различного строения, можно упорядоченно декорировать их поверхность наночастицами этих металлов. А они интересны тем, что могут усиливать полезный оптический сигнал, обеспечить так называемый эффект гигантского усиления комбинационного (Рамановского) рассеяния света. Благодаря этому удастся регистрировать очень малое количество объектов в пробе и выявлять даже начальные стадии заболеваний. Группе

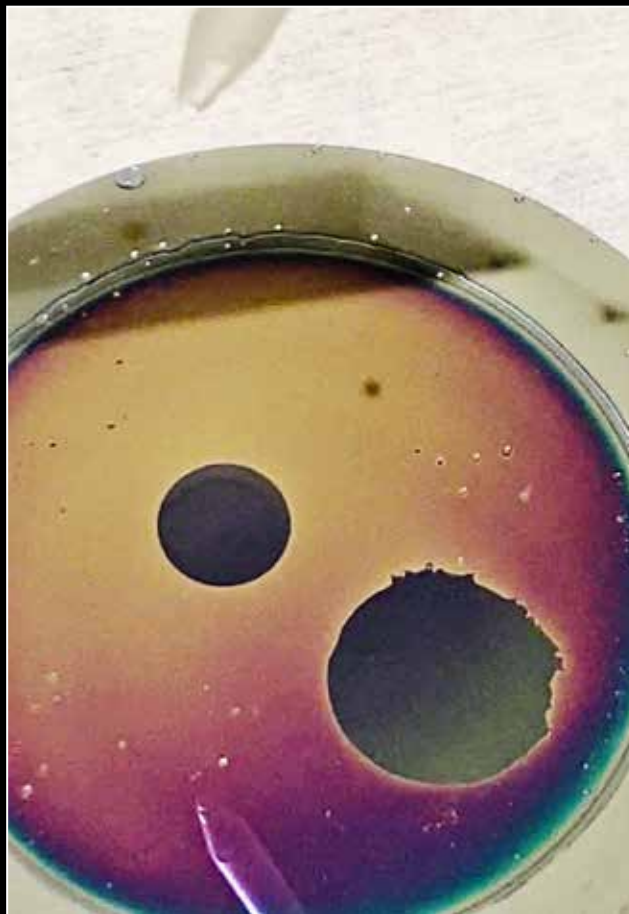


▲ Вирусные частицы, подобно хлопьям, облепили нанопористую поверхность

▼ Кишечная палочка прочно прилипла к пористой пластинке



▼ На пластинку капнули две капли спирта. Они резко изменили оптические свойства нанопористой поверхности: на ней возникли два темных пятна. Это изменение можно измерить. На таких измерениях и основана методика диагностики с использованием нанокремния



Осминкиной совместно с коллегами из ФРГ уже удалось показать возможность диагностики с помощью таких наноструктур молекул билирубина, которые сигнализируют о недостатках в работе печени, а также пигмента пиоцианина, маркера бактерии синегнойной палочки.

Нанопористый кремний может помочь и прямой борьбе с вирусами. Речь не идет о впрыскивании в кровь наночастиц с тем, чтобы они извлекали вирусы, хотя такая идея и заманчива. К сожалению, подобный препарат может быть опасен, ведь частицы, облепленные вирусами, способны слипаться и закупоривать кровеносные сосуды. Эти возможности надо тщательно исследовать, причем делать это отнюдь не на физическом факультете, где нельзя работать с живыми вирусами, способными заражать человека, с вирусами растений или насекомых работать было бы проще.

И тем не менее безопасные подходы есть. Например — очистка крови на сорбентах в аппаратах гемодиализа. Л.А. Осминкина и ее коллеги из МГУ имени М.В. Ломоносова и Института полиомиелита и вирусных энцефалитов

имени М.П. Чумакова умеют делать пористые наночастицы, которые в аппарате гемодиализа извлекают из жидкостей вирусы гриппа, гепатита, лихорадки Западного Нила, ВИЧ. Не исключено, что и при заражении крови, которое смертельно опасно и сейчас почти не поддается лечению, нанопористый сорбент пригодится для избавления от болезнетворных грибков и бактерий. Конечно, очистка крови от вируса с помощью гемодиализа — не самая простая процедура, но, с учетом того, что противовирусные препараты ориентированы не на сам вирус, а на усиление иммунитета организма, иметь в арсенале медиков такое радикальное средство для изъятия вирусов и бактерий может быть полезно.

Часто для анализа биомолекул или для специфической сорбции биообъектов на поверхность нанопористых пластинок нужно пришивать специальные молекулы, способные соединяться с искомыми веществами. Тогда молекулы этого вещества, если оно есть в пробе, прилипнут к кремниевой пластинке и изменят как ее эффективный

показатель преломления, так и способность к фотолюминесценции, либо оставляют свой уникальный «отпечаток пальца» в Рамановском спектре. И тут имеется большой выбор возможностей. Самый проверенный способ — пришить какое-то антитело, которое соединится с нужной молекулой или вирусом.

Какие только антитела не пришивают к поверхности нанопористого кремния! Например, если это антитело к белку теплового шока HSP70, то получится датчик на некоторые виды рака: слишком большое содержание этого белка в крови должно вызвать опасения за здоровье пациента. Датчик, настроенный на С-реактивный белок, CRP, выявит неполадки в сердечно-сосудистой системе. Датчики, настроенные на различные микотоксины, позволяют определять наличие этих опасных веществ, вырабатываемых грибами: они-то и служат главной причиной порчи продуктов питания или напитков.

Производство таких датчиков стоит недорого, для фиксации результатов анализа не нужно проводить сложных манипуляций — достаточно измерить изменение либо эффективного показателя преломления, либо флуоресценции, либо зарегистрировать Рамановский спектр и сравнить с табличными данными. Это гораздо проще, чем использовать биохимические методы.

Вот, например, как выглядит работа с датчиком на присутствие глистов вида *Echinococcus granulosus*, которые паразитируют в печени людей, собак и кошек. Сейчас анализ на наличие этих и многих других паразитов требует серьезного исследования крови сложными биохимическими методами, но и они не всегда гарантируют точный результат. А китайские исследователи из Синьаньского университета в Урумчи во главе с Цзя Чжэньхуном (Zhenhong Jia) в 2017 году разработали простой датчик.

Эхинококк выделяет специфический белок, его-то и надо обнаружить в пробе. Как это сделать с наибольшей чувствительностью? Простой подход: пришить к нанопористому кремнию антитело к белку. Однако, как выяснилось, в пробе обычно так мало этого белка, что выявить его сигнал трудно. Чтобы решить задачу, собрали Брегговское зеркало из двадцати слоев нанопористого кремния; каждый слой протравлен при разных режимах, поэтому у них разные показатели преломления. Поверхность получившегося фотонного кристалла модифицировали антигеном к антителам белка паразитов и подстраивали так, что его фотонная запрещенная зона совпадает с длиной волны люминесценции квантовых точек CdSe/ZnS. А к самим светящимся квантовым точкам пришили антитело к искомому белку.

В результате анализ выглядит так. На пористую пленку капают образец изучаемой крови, выжидают, пока возможный белок прилипнет к поверхности пор, а затем капают реагент, содержащий антитела с пришитыми квантовыми точками. Затем поверхность протирают и освещают лучом, возбуждающим свечение квантовых точек. Если меченые антитела присоединились к осажденным белкам, то присоединенные к ним квантовые точки дадут свет и зеркало его усилит; тогда сигнал удастся заметить. Такой датчик может найти до 300 фемтограммов белка в миллилитре пробы.

Очень интересно сделать на основе нанопористого кремния датчики на нуклеотидных последовательностях. Для этого на него пришивают короткие фрагменты ДНК или РНК, так называемые аптамеры, и они вступают в реакцию с молекулами, содержащими участки, комплиментарные к этим фрагментам. Первыми датчик из пористого кремния с аптамерами в 2017 году опробовали исследователи из Израильского технологического института в Хайфе во главе с Эстер Сегал (Ester Segal), а сейчас это направление считается наиболее перспективным.

Аптамеры, как и антитела, способны приклеивать к кремниевой пластинке практически всё, начиная от ионов металла и отдельных белковых молекул до целых микроорганизмов. Однако в отличие от антител, аптамеры очень удобно синтезировать с помощью разработанной в 1990 году автоматизированной процедуры, названной методом SELEX (систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением). А самое главное, датчик с аптамерами гораздо дольше сохраняет работоспособность, чем его аналог с антителами, и не требует особых условий хранения. Более того, некоторые аптамерные датчики можно использовать многократно, удалив с них изучаемые вещества после анализа.

Экспериментаторы в разных лабораториях уже создали работоспособные аптамерные датчики, чтобы измерять, например, содержание лактобактерий в кисломолочных продуктах. Чувствительность такого датчика составляет миллион бактерий в миллилитре продукта, что примерно в сто раз меньше, нежели должно быть в приличном йогурте. Аналогичные датчики на белки, например на альфа-тромбин (его содержание надо знать для выявления склонности к закупорке сосудов), дают наномолярную точность, что очень неплохо для практических целей, когда требуется низкая цена и высокая скорость анализа.

Так нанопористый кремний из курьеза, даже скорее брака при полировке кремниевых пластинок стал важным материалом, который может обеспечить появление дешевых методов массовой диагностики, необходимых буквально во всех областях жизни. Более того, если в системе здравоохранения имеется большое число разнообразных методик, доступных любому гражданину, то в ветеринарии, особенно в мелких хозяйствах, ситуация гораздо хуже. Именно из-за недостатка дешевых методов оперативной диагностики заболеваний постоянно возникают страшные эпизоотии, заставляющие истреблять тысячи животных на зараженных фермах.

Теоретически диагностика нанопористыми пластинками не требует даже дорогостоящего оптического оборудования, ведь обработанные пробами пластинки можно переслать в специализированную лабораторию, которая проведет необходимые измерения. Для этого нужны лишь отлаженная методика и налаженное производство. Главное же, чтобы у исследователей не иссякала фантазия, а у финансирующих органов — желание поддерживать такие работы.

Фото предоставила **Л.А. Осминкина**