

БИОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 53.082:612.017.1

БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПОРИСТОГО КРЕМНИЯ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Н. Ф. Стародуб, В. М. Стародуб

Институт биохимии им. А.В. Паладина НАН Украины,
ул. Леонтовича, 9, 01030, Киев-30, Украина, nstarodub@hotmail.com

Аннотация

**БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПОРИСТОГО КРЕМНИЯ.
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИМЕНЕНИЕ
ДЛЯ МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ**

Н. Ф. Стародуб, В. М. Стародуб

Обсуждаются в суммированном виде экспериментальные результаты по исследованию структуры и свойств пористого кремния, а также относительно разработки на его основе оптических иммунных биосенсоров, предназначенных для медицинской диагностики.

Анотація

**БИОСЕНСОРИ НА ОСНОВІ ФОТОЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ ПОРУВАТОГО КРЕМНІЮ.
ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ЗАСТОСУВАННЯ
ДЛЯ МЕДИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ**

М. Ф. Стародуб, В. М. Стародуб

Обговорюються в підсумованому вигляді експериментальні результати, щодо дослідження структури та властивостей поруватого кремнію та відносно розробки на його основі оптичних імунних біосенсорів для медичної діагностики.

Ключові слова: поруватий кремній, біосенсиори, медична діагностика.

Ключевые слова: пористый кремний, биосенсоры, медицинская диагностика.

Summary

BIOSENSORS BASED ON THE PHOTOLUMINESCENCE OF POROUS SILICON. OVERALL CHARACTERISTICS AND APPLICATION FOR MEDICAL DIAGNOSTICS

N. F. Starodub, V. M. Starodub

It is summarized and discussed the experimental results about the investigation of structure and properties of porous silicon, as well as about the development on its base of optical immune biosensors intended for medical diagnostics.

Keywords: porous silicon, biosensors, medical diagnostics.

1. Введение

В последние годы в области биосенсорики исследователи уделяют все большее внимание пористому кремнию (ПК) как широко доступному, дешевому материалу. Его приготовление не представляет собой сложной процедуры и не требует использования дорогостоящего оборудования, и, что самое главное, он при определенных условиях способен излучать интенсивную флуоресценцию (ФЛ) в широкой области спектра. Именно такие уникальные свойства ПК являются наиболее интересными для создания биосенсоров, поскольку они дают возможность разрабатывать дешевые, простые устройства для выполнения экспрессных анализов без дополнительного использования каких-либо меченых соединений. Так как биосенсоры на основе ПК принадлежат к одним из наиболее интересных разработок последнего десятилетия, представляется целесообразным детально остановиться на них и на самом материале ПК, рассматривая пути его получения, модификации поверхности, основные свойства и возможность использования при изготовлении биосенсоров нового поколения.

2. Механизм формирования ПК

ПК впервые получен в 1956 году при электрохимическом растворении монокристаллов кремния (МК) в электролитах на основе HF [1]. Этот процесс происходит очень медленно, но, пропуская электрический ток между HF и кремнием, можно значительно ускорить процесс преобразования МК в ПК с глубокими узкими порами, которые в основном ориентированы перпендикулярно к поверхности. Наи-

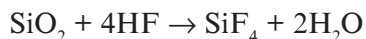
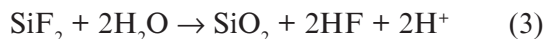
больший интерес к ПК ученые начали проявлять только с 1990-х годов, когда стало известно о ФЛ ПК в условиях комнатной температуры [2-6].

Общая схема получения ПК одним из наиболее распространенных методов гальваностатической анодизации, обеспечивающих широкий диапазон пористости, предусматривает погружение МК (анода) и металлического катода в водный раствор HF, где, при наличии дефектов и “+” носителей заряда (отверстий), происходит растворение Si. Это и приводит к постепенному преобразованию МК в ПК. При этом концентрацию HF удерживают на уровне 10 — 25% (по весу). Для улучшения проницаемости HF в поры Si к раствору добавляют этиловый спирт, а для уменьшения возможности образования пузырьков плотность тока поддерживают на уровне 1 — 100 мА/см². Образование ПК происходит, если плотность тока (j) не превышает определенного критического значения ($j_{кр}$). При $j < j_{кр}$ концентрация ионов F⁻ в зоне реакции очень высока и процесс анодного растворения Si происходит в двухвалентной форме. При $j > j_{кр}$ концентрация ионов F⁻ в зоне реакции недостаточная и равновесие смещается в сторону реакции растворения Si в четырехвалентной форме с образованием пленки SiO₂, которая легко растворяется в HF [7]. Особенности ПК (структура, величина и плотность размещения пор) и его ФЛ определяются многими параметрами, включая характеристики верхнего слоя Si, расположенного близко к поверхности, время анодизации, плотность тока, концентрацию раствора, его pH и величину энергии возбуждения ФЛ [8-12]. Известно несколько модификаций изготовления ПК, к которым принадлежат: анодизация в темноте с последующим травле-

нием на свету, анодизация в магнитном поле, пульсирующая анодизация [13] и травление без использования электрического тока и света [14, 15].

Создание ПК тесно связано со спецификой многоступенчатых химических реакций, которые протекают на границе разделения Si-HF при анодной поляризации кремниевого электрода [16].

При плотности тока $j < j_{кр}$, когда процесс растворения Si ограничен скоростью доставки дыр, происходят реакции (1) и (2). При $j > j_{кр}$ процесс растворения ограничен скоростью доставки ионов F и поэтому доминирующими являются реакции (1) и (3). Наряду с реакцией (1), которая требует использования двух дыр, возможна также реакция с затратой четырёх дыр, что обеспечивает высокую скорость растворения Si [17]. В результате одновременного протекания реакций (1) и (4) эффективная валентность Si проявляется в диапазоне $2 < n_{эф} < 4$.



После травления в растворе HF поверхность Si становится пассивированной атомами водорода [18]. Последние по электроотрицательности похожи на атомы Si, поэтому химические связи Si-Si подвергаются только слабому влиянию со стороны связей Si-H и их прочность существенно не изменяется. Именно этим и обеспечивается химическая инертность Si к ионам F в условиях, когда дыры в приповерхностной области отсутствуют. Если же дыра достигает поверхности, происходит разрыв связи Si-H с замещением H на атом F. Далее, вследствие поляризующего действия связи Si-F происходит взаимодействие со следующим ионом F⁻, сопровождающееся образованием молекулы H₂ и инъекцией одного электрона в Si. Группы Si-F понижа-

ют электронную плотность связей Si-Si и эти ослабленные связи легко разрываются, реагируя с HF или H₂O. Атомы Si, оставшиеся на поверхности, оказываются связанными с водородом. Если атом Si удаляется с атомарно гладкой поверхности, на ней образуется “провал”. Такая модификация геометрии поверхности в свою очередь изменяет распределение электрического поля, и новая дыра направляется именно к этой области.

Если стенкам пор начинает недоставать дыр, их растворение прекращается. Такое состояние реализуется для кремниевого электрода *n*-типа, когда к нему приложено положительное напряжение. В случае Si *p*-типа на поверхности создается слой обогащения, поэтому прекращение реакции растворения стенок пор должно вызываться другими причинами. Допускается, что это может быть вследствие размерного квантования носителей заряда, которое ведет к увеличению ширины запрещенной зоны и образованию энергетических барьеров, препятствующих переходу дыры с кремниевой подложки в участки между стенками пор [19]. В результате достаточно тонкие стенки пор выявляются обедненными дырами и поэтому устойчивыми к HF. Однако на границе дна пор с электролитом энергетические барьеры отсутствуют и химическое травление в таких участках продолжается без препятствий.

Подсушивание ПК после анодизации является важной процедурой, поскольку оказывает значительное влияние на его ФЛ [9]. С помощью ИК спектроскопии установлено, что поверхность свежеприготовленного ПК покрыта слоем ковалентно связанного H₂, что обуславливает образование на поверхности групп типа SiH, SiH₂ и SiH₃. Такой слой H₂ наделяет поверхность низкими рекомбинационными свойствами, что играет важную роль в достижении высокой эффективности ФЛ, но он характеризуется довольно низкой стабильностью. При хранении ПК на воздухе он стареет вследствие взаимодействия H₂ поверхности с O₂. Поскольку свежеприготовленный ПК взаимодействует с O₂ очень медленно, то и его оптоэлектронные свойства изменяются постепенно: от нескольких минут до нескольких месяцев [20]. Скорость и степень окисления ПК зависит от многих факторов: состава окружающего воздуха, уровня влажности, степени

освещенности поверхности и др. [9]. О важности влияния кислородной среды на характеристики ПК и его ФЛ при хранении впервые сообщил Кэнхем в 1991 году [9].

Таким образом, поиск подходов для модификации ПК с целью улучшения его стабильности и сохранения ФЛ является весьма важным и поэтому ниже представлен их короткий обзор.

2.1. Окисление

При получении ПК в условиях освещенности, на нем может появляться оксид, в частности во время извлечения ПК из раствора и нахождения некоторое время на воздухе [21]. Контролируемое окисление ПК можно проводить, выдерживая его на воздухе длительное время при отсутствии освещения. Такое окисление не ухудшает электронных свойств ПК и не уменьшает интенсивность его ФЛ [12]. Освещение поверхности видимым или УФ светом ускоряет ее окисление, что приводит к падению интенсивности ФЛ [22]. При выдерживании ПК на воздухе и дневном освещении интенсивность ФЛ возрастает [23], причем с большей скоростью, чем для образцов, которые находились в темноте. Имеются сведения [24] о химическом окислении ПК с помощью H_2O_2 или HNO_3 . Такой ПК характеризуется повышенной стабильностью, а его ФЛ не изменяется. Используя химическую модификацию ПК тетраэтоксисиланом, достигнуто сохранения интенсивности ФЛ [25]. Существует возможность модификации ПК путем анодного окисления в электролитах типа HCl и KNO_3 , в результате чего повышается выход ФЛ [20, 21]. Электрохимический процесс, вероятно, имеет место на дне пор, но механизм анодного окисления пока что остается не выясненным. Во время быстрого термического окисления ($900^\circ C$ в O_2 , в течение нескольких минут), можно получить поверхность с хорошими электронными свойствами и улучшенной стабильностью [26].

2.2. Нитрозилирование

В процессе обработки ПК в среде N_2 происходит замена нестабильных Si-H концевых групп на более стабильные Si-N, что ведет к усилению и стабилизации ФЛ [27]. Возможны также модификации типа Si-N-Si, Si-NH₂ и Si-NO₂ групп [20].

2.3. Галогенирование

Показана возможность модификации ПК при помещении его в пары галогенов в течение нескольких минут [20]. При этих условиях ФЛ гасится, но можно добиться ее восстановления на воздухе, однако, поверхность становится окисленной. Галогенирование рассматривается как интересный промежуточный этап в дальнейших преобразованиях ПК.

2.4. Модификация поверхности с участием ионов металлов.

Предложены химические методы модификации поверхности ПК в растворах хлоридов металлов $CsCl$, $NaCl$, $ZnCl_2$, $BaCl_2$ и концентрированных кислот: HCl , H_2SO_4 , HNO_3 и H_3PO_4 [28]. Благодаря такой обработке интенсивность ФЛ ПК возрастала, причем в случае использования растворов хлоридов металлов она увеличивалась при увеличении их концентрации. Модификация ПК [29, 30] гидротермической обработкой в растворе, содержащем HF и $Fe(NO_3)_3$, на протяжении 45-50 минут при $140-142^\circ C$ приводит к сильной и стабильной ФЛ.

Описана термическая модификация ПК при погружении его на несколько часов в чистые спирты или их растворы в диоксане [31, 32]. Действие Br_2 на ПК в течение 5 минут приводит к его бромированию и он становится реактивным по отношению к различным спиртам, сохраняя до 40% интенсивности ФЛ [20]. В случае модификации ПК алкильными группами наблюдается лишь незначительное уменьшение интенсивности ФЛ, в тоже время присоединение к нему ароматических молекул вызывает почти полное гашение ФЛ [33]. Ароматическим молекулам вообще присуще свойство гасить ФЛ при взаимодействии с ПК [34]. Механизм такого влияния объясняют передачей энергии от Si, находящегося в возбужденном состоянии, к ароматике [33, 34]. Отрицательно влияют на интенсивность ФЛ и органические растворители [35, 36].

При модификации ПК полимером поли(9-винил карбазол) в комбинации с TiO интенсивность ФЛ повышалась в 2 раза [37]. При создании светоизлучающих диодов ПК модифицировали полипирролом путем электрохимической полимеризации при малых плотностях тока, что позволило получить образцы с улуч-

шенными свойствами и способностью к образованию стабильных контактов [38]. В случае электрохимической модификации ПК путем анодизации его в электролите HCOOH с 1M HCOONa карбоксильная группа присоединяется к поверхности путем разрыва Si-Si связей с образованием новых связей типа SiOC и SiH [39]. Хотя такая модификация неблагоприятная для ФЛ, она рассматривается как перспективная и важная для дальнейших превращений ПК, например, с помощью спиртов. Разработана схема прямой модификации ПК метильными группами, которые являются наиболее подходящими для стабилизации поверхности через их небольшой размер и способность заменять наибольшее количество Н-протонов [20]. Эта схема предусматривает анодирование ПК в электролите, в состав которого входят диэтиловый эфир и CH_3Li , LiI или CH_3MgI при плотности тока на уровне $1\text{-}10\text{mA}/\text{cm}^2$ и длительности процедуры 10 минут. При этом сохраняется интенсивность ФЛ и улучшается стабильность ПК во время хранения.

Таким образом, среди большого разнообразия путей превращения ПК очень интересными являются быстрое термическое окисление, под действием которого ПК превращается в довольно стабильный материал, и прямое метилирование, что способствует сохранению интенсивности ФЛ и улучшению стабильности ПК. Характеристики ФЛ значительно зависят от метода изготовления и обработки ПК. Образцы ПК могут содержать в себе кристаллические нити, сферические образования Si и аморфные зоны. Все это приводит к тому, что они не являются однородными, а это, в свою очередь, вызывает сложность в исследовании их оптических характеристик. Однако, несмотря на эти недостатки, легкость получения ПК, его дешевизна, высокая эффективность ФЛ при комнатной температуре ($1\text{-}10\%$) и ее широкий спектр вызывают значительный интерес к использованию ПК при создании оптических устройств, эффективно работающих при комнатной температуре, а также биосенсоров, как аналитических приборов, пригодных к выявлению широкого спектра веществ.

3. Пористый кремний и сенсорные устройства

Применение ПК для обеспечения связи биологической и кристаллической систем, исходя из его способности присоединяться к костям, является одним из перспективных направлений. Создание таких биочипов на основе ПК, которые можно было бы вводить в организм, позволило бы проводить функциональную электронную стимуляцию органов, программированную доставку лекарств и др. [40, 41].

В качестве примеров использования ПК в оптических приборах можно привести световые излучаемые диоды [6, 11, 42-44] и фотогальванические элементы, которые являются весьма перспективными при создании солнечных элементов [45]. Благодаря возможности получения ПК с различными характеристиками пористости можно подобрать образцы с эффективным показателем преломления света в довольно широкой области — $1,1\text{-}2,6$. Благодаря этому ПК является пригодным материалом для создания многослойных оптических фильтров как в области видимого, так и инфракрасного света [46].

На сегодняшний день уже предложено несколько биосенсоров на основе ПК для анализа ряда веществ. Одним из простейших вариантов является использование развитой поверхности ПК в реакторах для иммобилизации ферментов [47]. Именно развитость и значительная химическая реактивность поверхности ПК используется при создании ионных биосенсоров. Принцип их работы состоит в измерении емкости ПК и иммобилизованной ионофорной мембраны при появлении на поверхности исследуемых ионов. Возможность разработки таких устройств продемонстрирована на примере определения ионов Na^+ [48]. Предложено использовать ПК и в качестве проводника света при создании оптических сенсоров [49], а также продемонстрирована возможность использования толстых окисленных образцов ПК в качестве эффективного теплового изолятора для калориметрических биосенсоров [50]. Тепловая проводимость ПК уменьшается при увеличении плотности тока и времени анодизации в процессе его получения. Как результат этого ПК проявляет наилучшие термоизолирующие свойства среди материалов, уже использованных ранее при соз-

дании калориметрических биосенсоров. Разработаны сенсоры на основе ПК для измерения влажности воздуха [51, 52]. Принцип их работы состоит в измерении незначительных изменений в емкости, возникающих в результате конденсации воды на поверхности ПК, размещенного на термоэлектрическом охладителе. Такой же принцип относительно измерения изменений емкости был использован и при разработке сенсора для определения спирта в парах воздуха [53]. Созданы потенциометрические биосенсоры, основанные на измерении кривых емкость-напряжение [54-56]. ПК в данном случае используют в качестве матрикса для иммобилизации фермента пенициллиназы. Биосенсор имеет чувствительность к пенициллину на уровне 0,1 ммоль/л и она может быть повышена путем нанесения на пористую поверхность Si_3N_4 .

Разработан интерферометрический биосенсор на основе ПК [57]. Принцип его работы состоит в том, что взаимодействие света, отражающегося от верхней и нижней поверхности ПК, приводит к появлению соответствующей интерференционной картины, вид которой зависит от эффективной оптической толщины образца. Таким образом, изменение эффективной оптической толщины, возникающей в результате специфического взаимодействия биомолекул на поверхности, является параметром, который и измеряется. Данный биосенсор с довольно высокой чувствительностью регистрирует биотин (чувствительность — 10^{-12} моль/л), дигоксигенин (10^{-6} моль/л), олигомеры ДНК, которые содержали 16 нуклеотидных оснований (10^{-15} моль/л), стрептавидин (10^{-14} моль/л) и IgG (10^{-8} моль/л). О биосенсоре именно с таким принципом измерения сообщалось и в работе [58]. Его эффективность проверяли при регистрации взаимодействия между биотином и стрептавидином. В следующей работе [59] эти же исследователи представили усовершенствованный вариант биосенсора, ПК которого активировали озоном, а потом модифицировали гидрофильным белком, а к последнему пришивали белок А, способный специфически связываться с IgG. Такая модификация ПК не только позволяла проводить эффективную иммобилизацию иммунных компонентов, но и способствовала увеличению стабильности ПК при работе в водных средах.

Используя метод эллипсометрии для регистрации взаимодействий биотина со стрептавидином, показана возможность создания биосенсора на основе ПК [60]. Его чувствительность по отношению к биотину была на уровне 40 мкмоль/л. На этом же принципе предложено использование ПК для регистрации разнообразных паров (например, ацетона, метанола, воды) в воздухе [61]. Минимальная определяемая концентрация ацетона равнялась 12 мкг/мл. На основании открытого свойства SO_2 гасить ФЛ ПК, предложена модель оптического биосенсора для определения этого экологически вредного газа [62]. О возможности использования ПК для разработки газовых сенсоров сообщалось также в работе [63], в которой исследовали электрические характеристики (зависимость силы тока от приложенного напряжения) структуры золото-ПК в условиях наличия разнообразных газов.

Таким образом, сегодня ПК оказывается достаточно перспективным материалом при разработке не только оптических устройств, таких как светоизлучающие диоды, фотогальванические элементы и оптические фильтры, но и биочипов, которые можно вводить в организм и направлять лечение и диагностику с их помощью, а также для создания сенсоров вообще и биосенсоров, в частности. Хотя интерес исследователей к этой области и достаточно высок, все же пока что мало сведений относительно использования ПК, а особенно его ФЛ, в биосенсорной технологии, несмотря на то, что ПК благодаря своей дешевизне, простоте изготовления, способности к эффективной ФЛ представляет собой едва ли не наилучший и наиболее подходящий материал для биосенсорики.

4. Изготовление пористого кремния, иммобилизация на нем биологического материала и измерение интенсивности его фотолюминесценции [64-69]

В своих исследованиях мы использовали для изготовления образцов ПК пластины МК (р-тип, удельное сопротивление $\rho=10$ Ом·см). Их сначала обрабатывали компьютерно-контролируемым сфокусированным лучом YAG: Nd (иттрий алюминиевый гранат, легированный Nd^{3+}) лазера ($\lambda=1,06$ мкм, длительность импульса $\tau = 2 \times 10^{-4}$ с, энергия $E = 0,3$ Дж) в ре-

жиме сканирования по поверхности, а затем смесью $\text{HF}:\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O} = 1:3:5$ (по объему) в течение 3-10 мин. После этого пластины ПК разрезали на отдельные части размером $4 \times 4 \text{ мм}^2$. Глубину и диаметр пор ПК контролировали с помощью микроскопии атомных сил (AFM).

Для наблюдения видимой ФЛ, ПК помещали в кварцевую ячейку объемом 2 мл и подвергали действию He-Cd лазера ($\lambda = 440 \text{ нм}$, $P = 0,001 \text{ Вт}$). Интенсивность ФЛ измеряли с помощью устройства, включающего стандартный монохроматор УМ-2, фотоумножитель ФЕУ-83 и персональный компьютер.

Перед иммобилизацией биомолекул ПК промывали спиртом и несколько раз дистиллированной водой, после чего образцы высушивали при комнатной температуре в ламинарно-чистых условиях. Процесс иммобилизации осуществляли пассивной сорбцией. Для этого ПК погружали в раствор одного из ком-

понентов иммунной реакции, что были взяты в необходимых концентрациях, и выдерживали там в течение определенного времени (концентрации растворов и время иммобилизации определяли экспериментально для каждого отдельного случая). Поверхность ПК после иммобилизации одного из компонентов иммунной реакции промывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР) на основе Na-фосфатного буфера (20 ммоль/л, pH 7,3) и NaCl (140 ммоль/л), затем высушивали. ПК с иммобилизованными биоконпонентами использовали в дальнейших экспериментах. Глубина пор составляла 10-200 нм, а их диаметр (d) и ширина “возвышений” (кремниевых кристаллитов) — 50-400 нм (рис. 1). Соответственно классификации ПК на микропористые ($d < 2 \text{ нм}$), мезопористые ($2 < d < 50 \text{ нм}$) и макропористые ($d > 50 \text{ нм}$), приведенной в работе [56], полученные нами образцы, можно отнести к макропористым.

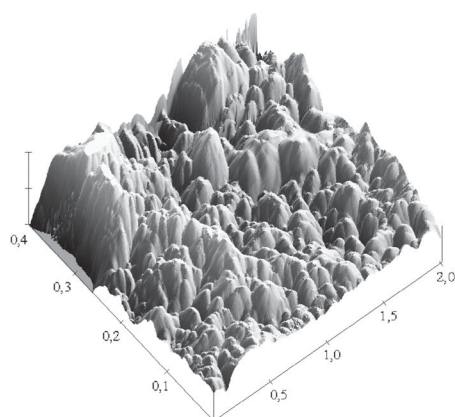
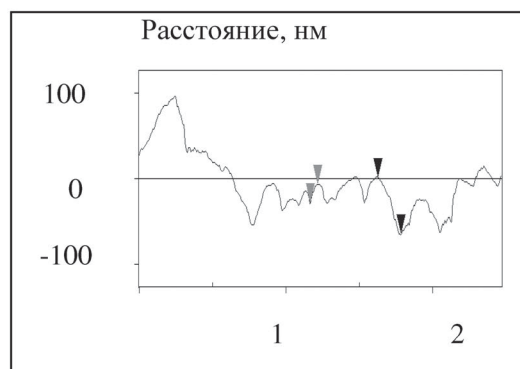


Рис. 1. Вид поверхности ПК и ее срез при исследовании методом AFM



▼ ▼	нм
Расстояние от поверхности	176,330
Горизонт. расстояние	165,250
Вертик. расстояние	67,229
Величина угла (°)	23,281
▼ ▼	
Расстояние от поверхности	63,015
Горизонт. расстояние	54,688
Вертик. расстояние	23,972

ФЛ высокой интенсивности для ПК *p*-типа наблюдают в широкой области спектра — от инфракрасного к ультрафиолетовому свету, в зависимости от пористости и характера его химической обработки. Выделяют четыре

типа спектров ФЛ, а именно в: (1) близкой к инфракрасной; (2) красной; (3) синей и (4) ультрафиолетовой (УФ) областях [70, 71].

ФЛ в красной области спектра была открыта первой, в 1990 году [6, 64], и она на сегодня

есть наиболее изученной. В 1992 году были опубликованы данные относительно наблюдения слабой, но быстрой ФЛ ПК в синий области [70]. Позднее, в 1993 году была получена сильная синяя ФЛ ПК, который окислялся при повышенных температурах [5]. В дополнение к этим двум видимым спектрам ФЛ ПК также способен излучать свет в ИК области спектра, но такого рода ФЛ не получила большой заинтересованности. Впервые о ней было сообщено в 1993 году [70]. Время спонтанного падения интенсивности этой ФЛ составляет от 50 наносекунд до 50 микросекунд, а максимум лежит в области 1.5 — 1.1 мкм. Такая ФЛ зависит от температуры и характеризуется неэкспоненциальным характером спонтанного падения интенсивности. ФЛ в УФ области есть наименее изученной. О ней было сообщено Янгом с соавт. в 1993 году [70].

Наиболее интересной для исследователей и наиболее изученной есть ФЛ в видимой области спектра. Характеристики ФЛ в значительной мере зависят от метода приготовления ПК и его дальнейшей обработки. Природа ФЛ ПК остается до конца не выясненной, чем поясняется существование ряда моделей, о которых речь будет идти ниже.

Нами исследованы стационарные спектры ФЛ и величина интенсивности ФЛ в ее максимуме в зависимости от плотности энергии лазерного луча, используемого при приготовлении ПК. Установлено, что ПК, полученный при возбуждении He-Cd лазером с $\lambda = 440$ нм и мощностью $P = 0,001$ Вт [72], способен к видимой ФЛ с максимумом интенсивности при длине волны 650 нм с полушириной полосы ~ 400 мэВ. С увеличением плотности энергии лазера от 11,5 до 33,5 Дж/см² интенсивность ФЛ увеличивается. Эти данные согласовываются с результатами, представленные в [74]. Спонтанное падение интенсивности ФЛ ПК при 300 К описывается растянутой экспонентой и происходит на протяжении ≥ 200 микросекунд [64-66].

5. Исследование характеристик фотолуминесценции при взаимодействии пористого кремния с разными растворами и иммунными компонентами [64-69]

Поскольку ФЛ довольно нестабильна в первые 2-4 недели после приготовления ПК [74], его предварительно стабилизировали путем

выдерживания на воздухе при дневном освещении.

Возбуждая ПК He-Cd лазером, измеряли интенсивность ФЛ при контакте ПК с воздухом; дистиллированной водой; буферами — Na-фосфатом (20 ммоль/л, pH 7,3), трис-HCl (20 ммоль/л, pH 7,3); приведенными выше буферными растворами, содержащими NaCl в физиологической концентрации (3ФР); растворами: бычьего сывороточного альбумина (БСА); иммуноглобулина (IgG) кролика; IgG овцы к IgG кролику; миоглобина (Mb) человека; моноклональных IgG мыши к Mb человека и поликлональных антител (АТ) к ним, что были приготовлены на основе 3ФР в широком диапазоне концентраций (от 10 до 1000 мг/л). Установлено, что независимо от природы использованных сред, в которых выдерживали ПК при регистрации ФЛ, ее интенсивность оставалась стабильной на протяжении первого часа измерений. Незначительное падение этой интенсивности наблюдается лишь на протяжении 2-4-го часа измерений. Значение интенсивности ФЛ за эти промежутки времени уменьшилось на 7%, 15 %, и 25% соответственно (рис. 2). На основании полученных результатов можно говорить о стабильности ФЛ в любом из растворов на протяжении первых 2 часов измерений.

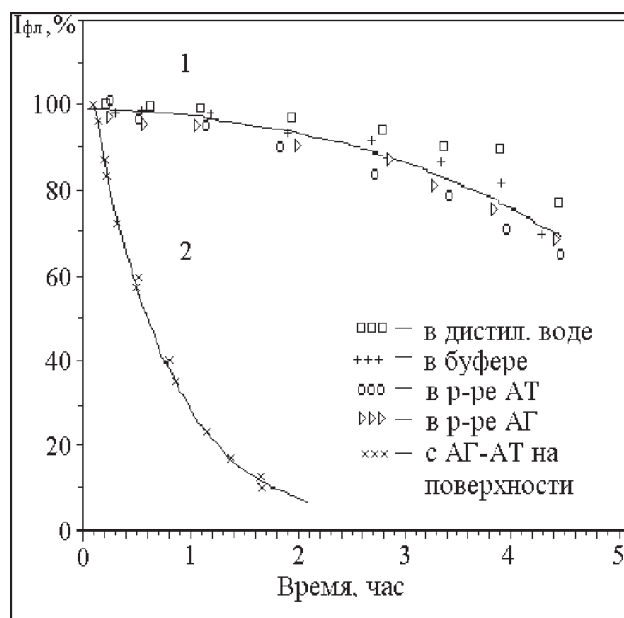


Рис. 2. Изменение интенсивности ФЛ во времени при условиях контакта ПК с дистиллированной водой, буферными растворами, растворами АТ и АГ — Кривая 1, и при условии образования комплекса [АГ-АТ] на его поверхности — Кривая 2.

В следующих экспериментах на поверхность ПК иммобилизовали IgG кролика и Mb человека. Процесс иммобилизации длился 1 час, а растворы АГ использовали в широком диапазоне концентраций — от 10 до 1000 мг/л. Все другие процедуры иммобилизации были общими для любых биоконпонентов. Полученные образцы потом погружали в растворы соответствующих специфических АГ в концентрациях соответствующих концентрациям иммобилизованных АГ, позволяя образованию специфического иммунного комплекса на поверхности ПК. Интенсивность ФЛ измеряли по прохождению 12, 30, 40, 70 и 100 минут после контакта АГ поверхности с АТ раствора. Полученные результаты свидетельствуют о значительном уменьшении интенсивности ФЛ ПК по мере увеличения времени на образование специфического иммунного комплекса на поверхности. При сравнении временных характеристик ФЛ образцов ПК одной группы, но с разными концентрациями образованного иммунного комплекса на поверхности, оказалось, что в любом случае присутствие иммунного комплекса приводит к гашению ФЛ. Скорость этого процесса зависит от количества образованных на поверхности ПК комплексов [АГ-АТ] и, таким образом, от концентрации иммунных компонентов, которые определяются, и тех, что иммобилизованы на поверхности. Прежде всего было установлено, что концентрация IgG кролика в растворе равная 100 мг/л есть оптимальной для его иммобилизации на поверхности ПК. Для изучения влияния неспецифических взаимодействий на характеристики ФЛ образцы ПК с иммобилизованными на поверхности IgG кролика и Mb человека погружали в растворы БСА, Hb и казеина в концентрациях 1-2 г/л и измеряли интенсивность ФЛ. Оказалось, что степень падения интенсивности ФЛ во времени не отличается от такого, если чистый ПК выдерживали в буферных растворах или же растворах отдельных иммунных компонентов. Для создания полной картины влияния иммунного комплекса, который формируется на поверхности ПК, на интенсивность излучаемой им ФЛ, изучали, каким образом изменяются характеристики ФЛ, если сначала на поверхность иммобилизовали АТ, а потом приводили их в контакт с растворами АГ. Спектры ФЛ в этом случае оказались идентичными спектрам, когда сна-

чала иммобилизовали различные вещества, как антигены, а потом они взаимодействовали с растворами АТ.

6. Природа фотолюминесценции пористого кремния

Для объяснения эффекта падения ФЛ в красной области спектра при образовании специфического иммунного комплекса на поверхности ПК нами была предложена гипотеза. Для детального ознакомления с ней, предлагаем рассмотреть основные существующие модели ФЛ ПК, с учетом которых, и была сформулирована эта гипотеза.

6.1. ФЛ в красной области спектра

Для объяснения природы ФЛ ПК предложен ряд моделей: в основу первой из них положены квантово-размерные эффекты, а существование второй — связывают с веществами на поверхности кремниевых нитей или кластеров.

Первой попыткой объяснить видимую ФЛ ПК была квантово-размерная модель [2]. Она предусматривает ФЛ вследствие рекомбинации электронно-дырочных пар в Si-кристаллитах, а квантово-размерный эффект обуславливает большую энергию излучения, чем энергия запрещенной зоны объемного кремния. Основными обстоятельствами, поддерживающими эту, наиболее распространенную модель, есть: (1) наличие кристаллитов с размерами в границах нанометров; (2) наблюдение ФЛ во всех типах структур, кроме структур с максимальным диаметром пор; (3) наличие корреляции между размерами кремниевых кристаллов и спектральным положением максимума ФЛ; (4) отсутствие связи существования ФЛ с наличием или отсутствием полисиланов на поверхности, поскольку полуширина полосы ФЛ значительно меньшая, чем полуширина полосы ФЛ полисиланов. За квантово-размерную модель объяснения природы ФЛ высказываются многие [26, 29-37, 70, 75-81], а другие не отвергают возможность ее существования наряду с моделями, основанными на механизмах ФЛ иной природы [71, 82]. Альтернативные объяснения базируются на том, что ФЛ может излучаться не кристаллитами, а неблагоприятной фазой аморфного

Si и, как доказательство, указывают на наличие в ПК большого количества именно такой фазы с сильной ФЛ. Однако существуют данные о высокой интенсивности ФЛ у ПК с отсутствующей аморфной фазой [6].

Следующая гипотеза, рассматривает Si_2 в качестве люминофора. Она предложена из наблюдения значительного уменьшения интенсивности ФЛ p-Si после термической десорбции H_2 от ПК и возможности восстановления ФЛ путем кратковременной обработки с помощью HF, восстанавливающей слой H_2 на поверхности [30]. При объяснении выдвинутого предположения исходят из того, что при десорбции H_2 получают оборванные связи Si, которые могут выступать как безлучеиспускающие центры [62, 83, 84].

Другие гипотезы предусматривают, что люминесценция все же происходит от специфических связей или молекул, расположенных на поверхности, хотя адсорбция может иметь место в нанокристаллитах ПК. Одна из наиболее распространенных гипотез рассматривает силоксаны как источник люминесценции [85]. Оптические свойства силоксанов ($\text{Si}_6\text{O}_3\text{H}_6$) и целого ряда похожих на них химических компонентов действительно очень подобные характеристикам p-Si. Однако, силоксаны едва ли есть центрами люминесценции в ПК, поскольку можно приготовить такие образцы, в которых Si-H и Si-O связи будут отсутствовать, но ПК будет излучать сильную ФЛ в красной области [6].

Третий тип гипотез, альтернативных квантово-размерной, объясняет ФЛ с точки зрения наличия дефектов в p-Si [71]. Ее не так легко отвергнуть, наоборот, она довольно убедительно объясняет ФЛ, измеренную в некоторых образцах ПК. В соответствии с этой гипотезой ФЛ в красной области связана с дефектами в диоксиде Si. Известно, что SiO_2 может излучать довольно эффективную ФЛ. Детальнее это будет проанализировано при объяснении ФЛ в синей области. Что же касается гипотезы о дефектах в SiO_2 , то ее недостатком есть то, что ПК, в котором отсутствует кислород, способен к эффективной ФЛ в красной области. Гипотеза, предусматривающая существование флуорофоров с OH-группами в структуре, типа $\text{Si}(\text{O})\text{H}_2$, $\text{Si}(\text{O})\text{H}(\text{OH})$, $\text{Si}(\text{O})(\text{OH})_2$, $\text{Si}(\text{O})\text{H}(\text{OSiH}_3)$, $\text{Si}(\text{O})(\text{OH})(\text{SiH}_3)_2$, которые являются аналогичными дефектами (или

центрами) поверхности, и которые ответственны за ФЛ, предложена в [86].

6.2. ФЛ в синей области спектра

Существует три модели для объяснения ФЛ в этой области спектра. Первая из них предусматривает, что ФЛ происходит от c-Si нанокристаллитов маленького размера [6]. После сильного окисления большое их количество превращается в SiO_2 , поэтому средний размер любых остатков c-Si может быть очень маленьким и не будет превышать 1 нм. В соответствии с теорией для таких размеров c-Si максимум спектра должен приближаться до 3 эВ, что, как уже отмечалось выше, и есть характеристикой ФЛ в синей области. Однако, эта модель неспособна объяснить результаты экспериментов по гашению ФЛ от окисленного p-Si. Поскольку остатки c-Si окружены слоем оксида кремния толщиной, по крайней мере, в несколько монослоев, синяя ФЛ должна быть нечувствительной к окружающей химической среде, но если окисленный p-Si с синей ФЛ поддается действию метанола наблюдается обратное гашение ФЛ. Таким образом, эта модель не может полностью объяснить природу ФЛ. Другая гипотеза описывает ФЛ как результат наличия или SiO_2 на остатках c-Si, или границы деления SiO_2/Si . Она поддерживается в ряде работ [87-93]. Соответственно третьей гипотезе ФЛ излучается не самым SiO_2 , а веществами, присутствующими на его поверхности. В некоторых случаях при хранении ПК в атмосфере с большим разнообразием веществ (пары воды, диоксид углерода и др.) интенсивность синей ФЛ увеличивается больше, чем на порядок [70]. Предполагается [70, 82, 93], что за синюю ФЛ отвечают силанольные молекулы, но пока что относительно их роли все еще существуют значительные споры, поскольку синюю ФЛ наблюдали в образцах ПК, где отсутствовали эти молекулы [6].

Таким образом, как можно видеть из приведенного многообразия существующих гипотез на сегодня пока что не существует единого мнения относительно объяснения ФЛ. Любая из гипотез имеет своих приверженцев, которые находят ее подтверждения, и критиков, которые указывают на возможные существующие возражения ее справедливости.

Исходя из приведенных сведений, объясня-

ющих ФЛ в красной области спектра, мы отдаем предпочтение туннельному механизму рекомбинации носителей при возбуждении в нанокристаллитах, или в оксиде, или в интерфейсе, а также считаем роль водорода на поверхности важной для генерации и гашения ФЛ. Такое объяснение есть результатом анализа возможных причин падения ФЛ при условии образования иммунного комплекса на поверхности ПК. К ним принадлежат следующие: изменение поглотительной способности в растворе при образовании комплекса [АГ-АТ] относительно ФЛ ПК; изменение характеристик возбуждающего лазерного луча; изменение оптических параметров раствора под действием луча лазера, который возбуждает ФЛ ПК; действие иммунных компонентов, или же процесса их взаимодействия, на рекомбинационный процесс фото носителей в ПК. Поглощение света, как на длине волны лазерного возбуждения ($\lambda=440$ нм), так и в широкой полосе ФЛ ПК, отсутствует в растворах АГ и АТ, а также их комплексов. Более того, отсутствие влияния растворов и отдельных иммунных компонентов на ФЛ ПК, подтверждается нашими результатами. В частности, установлено, что при погружении образцов ПК в буферные растворы и в растворы, содержащие отдельные иммунные компоненты, интенсивность ФЛ остается постоянной на протяжении первых двух часов измерений, с незначительным снижением ее в течение следующего периода наблюдения. Поэтому на наш взгляд, наиболее возможной причиной гашения ФЛ ПК может быть эффективная активация рекомбинационного безызлучательного канала за счет возможной депассивации поверхности кристаллитов (разрыв связи Н с Si в его пористой структуре) и включение поверхностных безызлучательных уровней в рекомбинационный процесс. Мы считаем, что водород, оторванный от поверхности ПК при образовании специфического иммунного комплекса на его поверхности, вероятно, захватывается им. Получение доказательств относительно такого отрыва H_2 в процессе образования иммунного комплекса дало бы весомые аргументы относительно роли оборванных связей Si в качестве рекомбинационных поверхностных центров, конкурирующих с лучеиспускательной рекомбинацией ПК, а, с другой стороны, оказало бы содействие углублению представ-

лений о физико-химических процессах АГ-АТ взаимодействия.

7. Разработка иммунного биосенсора на основе фотолюминесценции пористого кремния для определения миоглобина [94-97]

7.1. Исследование характеристик иммунного биосенсора при определении концентрации Mb в модельных растворах

В экспериментах иммобилизовали моноклональные АТ мыши к Mb человеку на поверхности ПК путем физической адсорбции.

Прежде всего, установили, какое есть оптимальное время иммобилизации АТ к Mb на поверхности ПК. Для этого образцы ПК распределили на 4 группы, отличающиеся по времени иммобилизации АТ, а именно: на протяжении 15 (1-ая группа), 30 (2-ая группа), 60 (3-я группа) и 90 (4-ая группа) минут из раствора при концентрации 100 мг/л. Все растворы готовились на 3ФР. Образование иммунного комплекса происходило при контакте иммобилизованных на поверхности АТ с раствором Mb, концентрация которого равнялась 100 мг/л.

Оказалось, что скорость изменения интенсивности ФЛ для образцов ПК 1-ой и 2-ой групп была значительно меньшей, чем для образцов, которые принадлежали к 3-ой и 4-ой группам. Вместе с тем, характеристики ФЛ ПК, отнесенных к 3-ой и 4-ой группам, оказались очень похожими. Данные результаты стали основанием для вывода, что оптимальным для проведения иммобилизации АТ к Mb на поверхность ПК есть время равное 60 мин.

В дальнейшем было показано, что концентрация 100 мг/л АТ к Mb является оптимальной при их иммобилизации.

Для более полного представления о процессе взаимодействия иммунных компонентов с ПК и о его особенностях, поверхность сканировали с помощью AFM (рис. 3 и 4). В одном случае на поверхности ПК был иммобилизованный Mb (концентрация раствора 100 мг/л, время — 60 минут), а во втором — на ней присутствовал образованный специфический иммунный комплекс [Mb-АТ] (концентрация АТ—100 мг/л, время взаимодействия — 60 минут). Можно видеть определенные характер-

ные отличия в АФМ чистой поверхности ПК (рис. 1), после иммобилизации на ней Mb

(рис. 3) и после образования на ней иммунного комплекса (рис. 4).

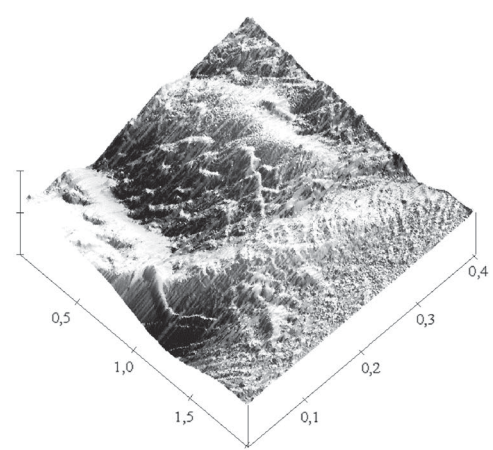
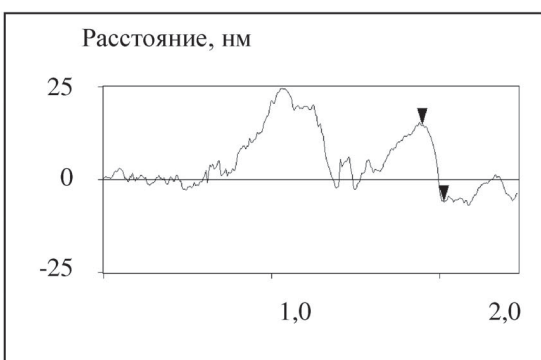


Рис. 3. Вид поверхности ПК с иммобилизованным Mb (время иммобилизации — 60 мин, концентрация раствора — 100 мг/л) и ее вертикальный разрез при исследовании методом АФМ



	нм
Расстояние к поверхности	127,960
Горизонт. расстояние	125,000
Вертик. расстояние	20,826
Величина угла (°)	9,459

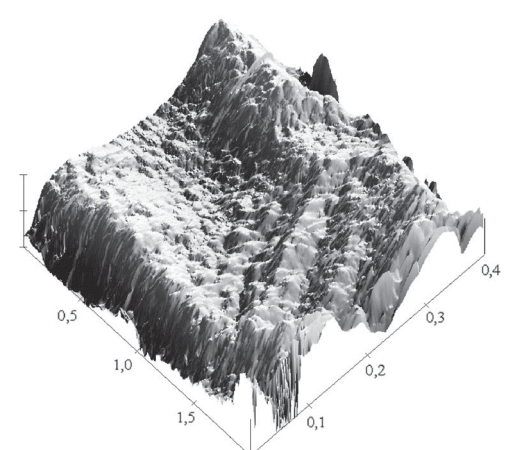
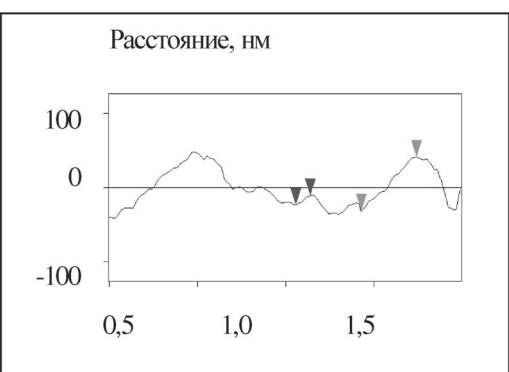


Рис. 4. Вид поверхности ПК с образованным иммунным комплексом [Mb-AT] и ее поперечное пересечение при исследовании методом АФМ



	нм
Расстояние от поверхности	87,584
Горизонт. расстояние	95,938
Вертик. расстояние	13,356
Величина угла (°)	8,834
Расстояние от поверхности	323,070
Горизонт. расстояние	312,500
Вертик. Расстояние	71,008
Величина угла (°)	12,802

Для определения чувствительности разработанного биосенсора, поверхность ПК после иммобилизации на нем АТ приводили в контакт с растворами Mb в диапазоне концентраций от 1 мкг/л до 10 мг/л и выдерживали там 15 минут, после чего измеряли интенсивность ФЛ. Оказалось, что удастся определить Mb в концентрации 10 мкг/л, а линейный отрезок графика зависимости характеристик ФЛ от его содержания в растворе лежит в диапазоне 0,01-1 мг/л.

Чувствительность анализа Mb методом ELISA составляет 0,5 мкг/л, а диапазон линейной зависимости экстинкции от концентрации Mb находится в пределах 0,5 мкг/л — 1 мг/л.

Общее время, необходимое для осуществления одного анализа иммунным биосенсором на основе ФЛ ПК составляет около 80 мин, учитывая продолжительность всех подготовительных этапов, а методом ELISA — более 6 часов. Больше того, иммунный биосенсор более прост в использовании и не требует конъюгатов иммунных компонентов с ферментативными метками.

Изучали и операционную стабильность разработанного биосенсора. Для разрушения иммунных комплексов ПК после каждого цикла измерений обрабатывали раствором HCl (0,1н) или ацетатного буфера (50 ммол/л, рН 2,2) на протяжении 5 мин, после чего его промывали 3ФР, высушивали и исследовали ФЛ. После первого цикла измерений интенсивность ФЛ уменьшилась на 50 % по сравнению с ее первоначальным уровнем. Затем такие образцы ПК помещали в раствор Mb (100 мг/л) на 60 мин, после чего их снова обрабатывали в кислой среде по процедуре, описанной выше. После второй обработки растворами с низким значением рН интенсивность ФЛ уменьшилась почти до 0. Мы предположили, что причиной такого падения интенсивности ФЛ является неполное разрушение иммунных комплексов или же повреждение ПК в результате действия растворов с низким рН. Все же последнее обстоятельство кажется более вероятным, поскольку известно, что ФЛ ПК весьма чувствительна к условиям среды.

Следовательно, исходя из операционной стабильности разработанного биосенсора, можно сделать вывод, что ПК не пригоден для многократного использования. Однако, по-

скольку МК, из которого изготавливают ПК, есть довольно дешевым и широко распространенным материалом, а процесс получения ПК, способного к ФЛ, не сложный и не дорогой, то невозможность многократного использования ПК не является проблемой. Учитывая приведенные выше преимущества ПК, можно прийти к выводу, что его недостаток, связанный с невозможностью многократного использования, не является существенным при решении вопроса о перспективности практического применения иммунных биосенсоров на основе ФЛ ПК.

7.2. Применение разработанного иммунного биосенсора на основе ФЛ ПК для определения Mb в сыворотке крови человека [66]

Использовали сыворотки крови 3-х здоровых лиц, которые смешивали и готовили 3-и образца: не разведенные, разведенные в соотношении 1:10 и 1:100. Разведение выполняли с помощью 3ФР. ПК с АТ на поверхности (время иммобилизации — 60 мин, концентрация АТ — 100 мг/л) погружали в приготовленные образцы на 15 мин, после чего измеряли интенсивность ФЛ. Полученные результаты представлены на рис. 5, где для их лучшей иллюстрации также приведены значения ФЛ при выдержке ПК с АТ на поверхности на протяжении 15 мин в буферном растворе Mb концентрацией 0,1 мг/л (N0).

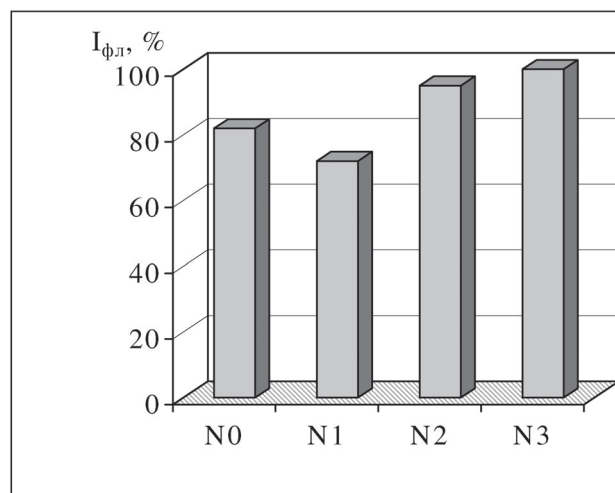


Рис. 5. Изменение интенсивности ФЛ в случае погружения образца ПК с иммобилизованными АТ (100 мг/л; 60 минут) на 15 минут в буферный раствор с Mb (0,1 мг/л) (N0) и сыворотку крови человека: неразведенную (N1); разбавленную 3ФР в соотношении 1:10 (N2) и 1 : 100 (N3)

При использовании неразбавленной сыворотки (N1) интенсивность ФЛ уменьшилось на 30% относительно исходного уровня, в то время как для образцов разбавленных сывороток (N2 и N3), оно приближалось до 100%. Для объяснения изменений интенсивности ФЛ в вариантах опыта с неразбавленной сывороткой мы выдвинули два предположения. Первое из них базируется на том, что сыворотка здоровых людей в норме может содержать Mb в концентрациях 100-150 мкг/л, что и есть причиной падения ФЛ. Подтверждением чего есть тот факт, что значение интенсивности ФЛ для образцов с неразбавленной сывороткой (N1), в незначительной мере отличается от величины интенсивности ФЛ для тех образцов, которые содержали Mb при концентрации 100 мкг/л (N0). Второе предположение имеет в своей основе неспецифичное влияние других белков сыворотки, но оно менее вероятно, поскольку в ранее было показано, что другие белковые компоненты сыворотки не влияют на характеристики ФЛ.

Для подтверждения сделанных предположений к образцам разбавленной (1:10) сыворотки прибавляли разные количества Mb из растворов с исходными концентрациями от 1 мкг/л до 10 мг/л, после чего их использовали в дальнейших экспериментах для исследования влияния на характеристики ФЛ. Образцы ПК с АТ на поверхности (время иммобилизации — 60 мин, концентрация раствора АТ — 1 мг/л) погружали в образцы сывороток, приготовленные как указано выше, и определяли интенсивность ФЛ. На рис. 6 представлены полученные данные, которые для более наглядного восприятия, приведенные вместе с калибровочной кривой (1) для определения концентрации Mb в буферных растворах.

На основе полученных результатов можно прийти к выводу, что разность в интенсивности ФЛ ПК при измерении содержания Mb в буферном растворе (кривая 1) и разбавленной сыворотке (кривая 2) не является значительной, и проявляется в большей мере при малых концентрациях добавленного Mb. Это, вероятно, свидетельствует о наличии определенной начальной концентрации гемопротеида в сыворотке. Более того, кривая зависимости интенсивности ФЛ от концентрации Mb в сыворотке имеет тот же линейный участок, как и при определении Mb в буферном

растворе. Он находится в диапазоне от 0,01 до 1 мг/л.

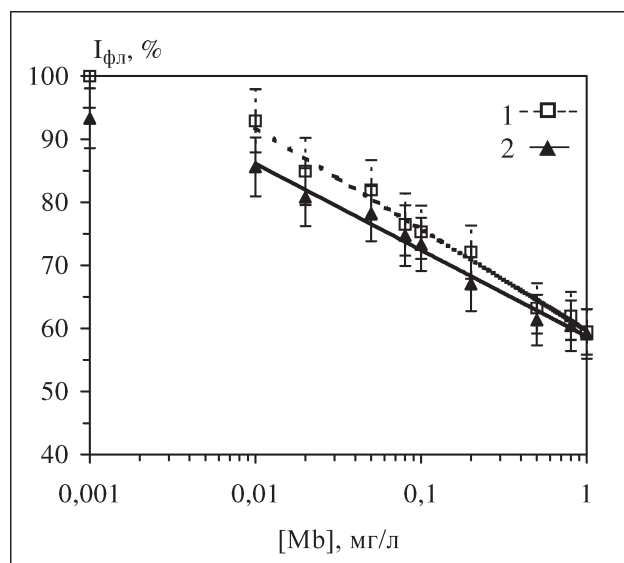


Рис. 6. Изменение интенсивности ФЛ при погружении образца ПК с иммобилизованными АТ (100 мг/л, 60 минут) на 15 минут в: буферные растворы Mb разных концентраций (Кривая 1) и сыворотку крови человека, разбавленную 3ФР 1:10, к которой прибавляли разные концентрации Mb (Кривая 2)

В сыворотке здоровых людей концентрация Mb колеблется в пределах 10–100 мкг/л с небольшими отклонениями в сторону высоких концентраций при развитии таких болезней, как почечная недостаточность, дистрофия мышц, бронхиальная астма, нервно-мышечные заболевания и травмы. Особое повышение концентрации Mb (>100-200 мкг/л) может быть первым признаком развития инфарктного состояния. Скорость диагностики инфаркта миокарда и успех его лечения в значительной мере зависят от возможности экспрессного определения содержания Mb (концентрации до 1 мг/л присуща острому развитию болезни). Разработанный иммунный биосенсор дает возможность определять Mb как в сыворотке здоровых людей, так и пациентов с острой формой инфарктного состояния.

Было проанализировано три типа сывороток: от здоровых лиц (I группа), от лиц с начальной формой инфаркта миокарда (II группа) и от пациентов с признаками острого инфарктного состояния (III группа). Всего обследовано 15 лиц — по 5 от каждой группы. Образцы сывороток больных разводили 1:10 с помо-

щью ЗФР, а здоровых лиц — оставляли не разведенными. Все образцы подвергали анализу с помощью оптического иммунного биосенсора

и стандартного метода ELISA. Данные табл. 1, представляют собой среднее значение трех измерений.

Таблица 1

Определение концентрации Mb в сыворотках здоровых людей и больных на инфаркт миокарда разной степени тяжести

Концентрация Mb, мкг/л					
ELISA-метод					
Тип/№ образца сыворотки	1	2	3	4	5
I группа	14,3±0,58	19,7±1,53	22,0±1,43	22,6±1,52	29,3±1,27
II группа	21,1±1,13	15,8±0,93	17,5±0,82	17,9±0,92	22,7±1,33
III группа	61,2±2,55	42,4±2,04	51,8±2,32	68,9±2,93	45,6±1,86
Иммунный биосенсор на основе ФЛ ПК					
I группа	15,3±1,82	18,6±1,67	21,4±2,07	23,3±2,39	31,2±3,28
II группа	20,6±1,87	16,3±1,57	18,3±1,67	17,3±1,82	21,8±2,24
III группа	58,7±5,82	40,6±3,87	54,3±5,16	71,6±6,79	43,3±4,41

Оказалось, что разность между данными, полученными с помощью иммунного биосенсора и метода ELISA, не является статистически значимой. Все же приведенные данные указывают на то, что иммунный биосенсор есть несколько менее точным по сравнению с методом ELISA, что, вероятно, вызвано использованием образцов ПК, полученных из разных пластин МК. Такой недостаток может быть устранен путем усовершенствования технологии производства ПК, сортировки и маркированию его отдельных образцов. С помощью иммунного сенсора на основе ФЛ ПК можно проводить анализы за значительно более короткий срок времени, чем с использованием метода ELISA, и как уже отмечалось, он есть значительно более простым в использовании и не требует дорогих конъюгатов АГ или АТ с ферментными метками.

7.2. Сравнение характеристик разработанного оптического иммунного биосенсора на основе ФЛ ПК с другими существующими методами определения Mb

Для лучшего анализа характеристик разработанного иммунного биосенсора на основе ФЛ ПК считаем необходимым сравнить их с характеристиками существующих методов определения Mb.

До недавнего времени для определения Mb применяли радиоиммунный анализ [98, 99, 100], время проведения которого длится больше 3 часов, что значительно лимитирует использование его для диагностики начальных

стадий развития инфаркта миокарда. Учитывая важность экспрессного определения прироста концентрации Mb для успешной регистрации начала и степени развития инфарктного состояния, исследователи искали новые, более быстрые, простые, дешевые, и в тоже время чувствительные методы его выявления в сыворотке крови. Это привело к появлению ряда альтернативных методов. Один из них — так называемый хемилюминесцентный метод [101], который базируется на окислении люминола атомарным кислородом, образующимся при распаде H_2O_2 в присутствия гема. Окисление сопровождается излучением света, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации гема в реакционной среде. С целью дифференциального определения Mb и Hb, образцы предварительно подвергают хроматографии. Другой подход для определения уровня Mb разработан на основе гетерогенного иммуно-ферментного анализа, когда в качестве твердой фазы использовали микротитровальные планшеты, а в качестве маркера — пероксидаза хрена [102]. Время анализа составляет больше 1,5 часа. В литературе имеется сообщение об использовании одностадийного, флуоресцентного иммуноанализа для определения уровня Mb [98]. Для его проведения получают два типа моноклональных АТ к Mb, которые отличаются разной эпитопной специфичностью. Один тип АТ пассивно адсорбируют на поверхности латексных частиц, а вторые АТ метят флуоресцеином. После того, как происходит иммунная реакция, удаляют компоненты, несвязанные с латексными час-

тицами, путем фильтрации под небольшим давлением, и каждую ячейку с образованным иммунным комплексом облучают при длине света 485 и 590 нм. Флуоресценцию измеряют при 535 и 620 нм для количественного определения соответственно образованного комплекса [Mb — флуоресцеин меченные АТ] и присутствующих латексных частиц. Наименьшая концентрация, которую можно определить с помощью такого метода, составляет 7 мг/л, а продолжительность анализа близко 1 час. Методом турбидиметрической агглютинации латекса можно определить содержание Mb на протяжении 10 минут с чувствительностью равной 96 мкг/л [103]. Применяя флуорометрический иммуноанализ, Mb регистрируют при концентрации 110 мкг/л за 8 минут [104]. В этом анализе используют два типа АТ, один из них иммобилизируют на твердой фазе, а другой — находится в растворе. Последний конъюгирован со щелочной фосфатазой, расщепляющей 4-метил-умбеллиферил фосфат и продуцирующей метилумбеллиферон, способный к флуоресценции.

Еще один метод предложен на основании коммерческого иммуносорбента и двух типов моноклональных АТ. Чувствительность этого метода — 110 мкг/л, а продолжительность анализа — 1 час [105]. Разработан иммунный биосенсор для определения Mb, используя ион-селективные полевые транзисторы (ИСПТ) и химическую реакцию окисления аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую атомарным кислородом, появляющимся во время каталитического расщепления H_2O_2 [94, 95]. Его чувствительность около 1 мкг/л при общем времени проведения 1 анализа до 60 мин. Другой метод для регистрации Mb разработан на основе эффекта поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [106]. Его чувствительность составляет 1 мкг/л.

Все предложенные методы являются или же достаточно продолжительными, или же недостаточно чувствительными, или же они не совсем простые и дешевые, или же имеют определенную комбинацию этих недостатков, что значительно ограничивает клиническое использование Mb в качестве биохимического маркера инфаркта миокарда. Что же касается регистрации Mb биосенсором на основе ФЛ ПК, то его чувствительность на уровне 10 мкг/л при общем времени анализа, включая продол-

жительность всех подготовительных этапов, 80 мин. Такой уровень чувствительности разработанного оптического иммунного биосенсора соответствует большинству предложенных методов. Сравнение же продолжительности проведения анализа с помощью разработанного биосенсора и других методов в полной мере невозможно из-за того, что в некоторых работах исследователи, говоря о времени анализа, не уточняют о какой же продолжительности (общей, с учетом всех подготовительных этапов, продолжительности или о проведении одного измерения) идет речь. Поэтому наиболее полно временные характеристики предложенного иммунного биосенсора можно сравнить лишь с характеристиками известных, традиционно используемых методов, типа ELISA. Общее время анализа иммунным биосенсором было значительно меньше, чем методом ELISA. Кроме того, его можно сократить за счет использования ПК с заблаговременно иммобилизованными специфическими АТ. Можно уменьшить и время, отведенное на образование иммунного комплекса (лимитирующей стадии во время любых иммунохимических реакций) и на проведение измерений не в стационарном, а в кинетическом режиме.

Иммунный биосенсор на основе ФЛ ПК имеет ряд преимуществ, а именно: 1) отсутствия необходимости использования любых меток; 2) распространенности и дешевизне начального материала (МК) для изготовления сенсоров, 3) простоте их создания и использования в работе. Кроме того, возможность автоматического производства сенсорных устройств и их одноразового использования (что сокращает общее время анализа из-за отсутствия необходимости очистки поверхности после предшествующего опыта и ее подготовки к следующим измерениям) дает возможность рассматривать оптический иммунный биосенсор на основе ФЛ ПК в качестве перспективного инструментального средства для медицинской диагностики.

Список литературы

1. Uhler Jr. A. Electrolytic shaping of Ge and Si // Bell Syst. Tech. J. — 1956. — N35. — P. 333-347.
2. Canham L. T. Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical

- dissolution of wafers // *Appl. Phys. Lett.* — 1990. — N57. — P. 1046-1048.
3. Bsiesy A., Vial J.C., Gaspard F. et al. Photoluminescence of high porosity and of electrochemically oxidized p-Si layers // *Surface Sci.* — 1991. — N254. — P. 195-200.
4. Koshida N., Koyama H. Efficient visible photoluminescence from p-Si // *Japanese J. Appl. Phys.* — 1991. — N30. — P. L1221-L1223.
5. Gardelis S., Rimmer J.S., Dawson P. et al. Evidence for quantum confinement in the photoluminescence of p-Si and SiGe // *Appl. Phys. Lett.* — 1991. — N59. — P. 2128-2120.
6. Lackwood D.J. *Light Emission in Silicon // Semicond. and Semimetals.* — San Diego: Academic Press. — 1998. — V. 49. — P. 1-35.
7. Свечников С.В., Саченко А.В., Сукач Г.А. и др. Светоизлучающие слои пористого кремния: получение, свойства и применение (обзор) // *Оптоэлектроника и полупроводниковая тех.* — 1994. — N27. — С. 3-28.
8. Fauchet P.M. Porous silicon: photoluminescence and electroluminescent devices // *Semicond. and Semimetals.* — San Diego: Academic Press. — 1998. — V. 49. — P. 206-252.
9. Canham L.T. Porous semiconductors: a tutorial review // *Proc. Mat. Res. Soc. Symp.* — 1997. — V.452. — P. 29-42.
10. Goudeau P., Naudon A., Vezin V. et al. Correlation between the porous silicon morphology and the photoluminescence efficiency // *Phys. Stat. Sol. B.* — 1995. — V.190, N63. — P. 63-67.
11. Mehra R.M., Agarwal V., Mathur P.C. Development and characterization of porous silicon (a review) // *Ibid.* N9. — 75-79.
12. Koyama H., Tsybeskov L., Fauchet P. M. Strongly nonlinear luminescence in oxidized porous silicon films // *J. Luminescence.* — 1999. — N80. — P. 99-102.
13. Cullis A.G., Canham L.T., Calcott P.D.J. The structural and luminescence properties of porous silicon // *Appl. Phys. Rev.* — 1997. — V.82, N3. — P. 909-965.
14. Jiang J.C., White R.C. Visible light emission from porous silicon made without using any external electric power supply // *Proc. Mat. Res. Symp., Session AA, Pitsburg, PA.* — 1992. — P. 11.
15. Shih A., Jung K. H., Hsieh T.Y. et al. Photoluminescence and structure of chemically etched porous Si and laterally anodized porous Si // *Ibid.* — P. 5.
16. Лабунюв В.А., Бондаренко В.П., Борисенко В.Е. Пористый кремний в полупроводниковой электронике // *Зарубежн. электрон. тех.* — М. : ЦНИИ “Электроника”. — 1978. — 48 с.
17. Dubin V.M. Formation mechanism of porous silicon layers obtained by anodization of monocrystalline n-type silicon in HF solutions // *Surf. Sci.* — 1992. — V.274, N1. — P. 82-92.
18. Lehmann V., Gosele U. Porous silicon formation: a quantum wire effect // *Appl. Phys. Lett.* — 1991. — V.58, N10. — P. 856-859.
19. Lehmann V., Gosele U. Porous silicon. Quantum sponge structures grown via a self-adjusting etching process // *Adv. Mater.* — 1992. — V.4, N2. — P. 114-116.
20. Chazalviel J. — N., Ozanam F. Surface chemistry of porous silicon // *Proc. Mat. Res. Soc. Symp.* “Microcrystalline and Nanocrystalline Semicond. Nov. 30 — Dec. 3, 1998. Boston, Massachusetts, USA”. — 1998. — V. 536. — P. 155-166.
21. Show Y., Rath S., Nozaki S., Morisaki H. Improved PL in porous silicon due to the compensation of the defect center by anodic oxidation // *Ibid.* — P. F5.2
22. Tischler M.A., Collins R.T., Stathis J.H., Tsang J.C. Luminescence degradation in porous silicon // *Appl. Phys. Lett.* — 1992. — V.60, N5. — P. 639-641.
23. Dacenko O.I., Makara V.A., Naumenko S.M., et al. Evolution of the porous silicon sample properties in the atmospheric ambient // *J. Luminescence.* — 1999. — N81. — P. 263-270.
24. Nakajima A., Ikatura S., Watanabe S., Nakayama N. // *Appl. Phys. Lett.* — 1992. — V. 61, N46. — P. 46.
25. Linsmeier J., Wuest K., Schenk H. et al. Chemical surface modification of porous silicon using tetraethoxysilane // *Thin Solid Films.* — 1997. — V297, N1-2. — P. 26-30.
26. Petrova-Koch V., Muschik T., Kux A. et al. // *Appl. Phys. Lett.* — 1992. — N61. — P. 943.
27. Daami A., Bremond G., Stalmans L., Poortmans J. Efficient luminescence from porous silicon // *J. Luminescence.* — 1999. — N80. — P. 169-172.
28. Maronchuk I.E., Naidenkov M.N., Naidenkova M.V. et al. Influence of physical and chemical surface treatment on the photoluminescence of porous silicon // *Tech. Phys.* — 1999. — V. 44, N1. — P. 122-123.
29. Li X.J., Zhu D.L. Chen Q.W., Zhang Y.H. Strong- and nondegrading-luminescent porous silicon prepared by hydrothermal etching // *Appl. Phys. Lett.* — 1999. — V. 74, N3. — P. 389-391.
30. Zhang Y.H., Li X.J., Zheng L., Chen Q.W. Nondegrading photoluminescence in porous silicon // *Phys. Rev. Lett.* — 1998. — V. 81, N8. — 1710-1713.
31. Kim N.Y., Laibinis P.E. Thermal derivatization of porous silicon with alcohols // *J. Americ. Chem. Soc.* — 1997. — V.119, N9. — P. 2297-2298.
32. Kim N.Y., Laibinis P.E. Functionalization of porous silicon surfaces by solution-phase reactions

- with alcohols and Grinard reagents // *Proc. Mat. Res. Soc. Symp. "Microcrystalline and Nanocrystalline Semicond. Nov. 30 — Dec. 3, 1998. Boston, Massachusetts, USA, 1998"*. — 1998. — V. 536. — P. 167-169.
33. Buriak J., Allen M.J. Photoluminescence of porous silicon surfaces stabilized through Lewis acid mediated hydrosilation // *J. Luminescence*. — 1999. — N80. — P. 29-35.
 34. Song J.H., Sailor M. Quenching of photoluminescence from porous silicon by aromatic molecules // *J. Americ. Chem. Soc.* — 1997. — N119. — P. 7381-7385.
 35. Fellah S., Wehrspohn R.B., Gabouze N. et al. Photoluminescence quenching of porous silicon in organic solvents: evidence for dielectric effects // *J. Luminescence*. — 1999. — N80. — P. 109-113.
 36. Jin W.J., Shen G.L., Yu R.Q. Organic solvent induced quenching of porous silicon photoluminescence // *Spectrochimica Acta Part A*. — 1998. — N54. — P. 1407-1414
 37. Wakefield G. Dobson P.J., Hutchison J.L., Foo Y.Y. Charge injection into porous silicon electroluminescent devices // *Mat. Sci. and Engineer. B*. — N51. — P. 141-145.
 38. Soni R.K., Fonseca L.F., Resto O. et al. Electropolymerization in porous silicon films // *Proc. Mat. Res. Soc. Symp. "Microcrystalline and Nanocrystalline Semicond. Nov. 30 — Dec. 3, 1998. Boston, Massachusetts, USA, 1998"*. — 1998. — V. 536. — P. 197-201.
 39. Lee E.J., Bitner T.W., Ha J.S., Shane M.J., Sailor M.J. Light-Induced Reactions of Porous and Single-Crystal Si Surfaces with Carboxylic Acids // *J. Americ. Chem. Soc.* — 1996. — V.118, N23. — P.5375-5382.
 40. Canham L.T. Biomedical applications of porous silicon // *Properties of Porous Silicon. EMIS Data Reviews Series*. — 1997. — N18. — P. 371-376.
 41. Canham L., Reeves C.L., Wallis D.J. et al. Silicon as an active biomaterial // *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* — 1997. — V. 452. — P. 579-589.
 42. Koshida N., Koyama M. Visible electroluminescence from porous silicon // *Appl. Phys. Lett.* — 1992. — V. 60, N3. — P. 347-349.
 43. Richter A., Steiner P., Kozlowski F., Lang W. Current-induced light emission from a porous silicon device // *IEEE Electr. Dev. Lett.* — 1991. — V. 12, N3. — P. 691-692.
 44. Namavar F., Maruska H.P., Kalkhoran N.M. Visible electroluminescence from porous silicon np heterojunction diodes // *Appl. Phys. Lett.* — 1992. — V. 60, N20. — P. 2514-2516.
 45. Vikulov V., Verba A., Kirichenko Y. Silicon solar cells with porous silicon layers // *Proc. Mat. Res. Soc. Symp. "Thin-Film Structures for Photovoltaics" Dec. 2 — 5. — 1997. — V. 485. — P.G2.2*
 46. Mattei G., Marucci A., Yakovlev V.A. Splitting of porous silicon microcavity mode due to the interaction with Si — H vibrations // *Mat. Sci. and Engineer. B*. — 1998. — N51. — P. 158-161.
 47. Laurell T., Drott J., Rosengren L., Lindstrom K. Enhanced enzyme activity in silicon integrated enzyme reactors utilizing porous silicon as the coupling matrix // *Sensors and Actuators B*. — 1996. — N31. — P. 161-168.
 48. Ben Ali M., Mlika R., Ben Ouada H. et al. Porous silicon as substrate for ion sensors // *Ibid. A*. — 1999. — N74. — P. 123-125.
 49. Arrand H.F., Benson T.M., Loni A. et al. Solvent detection using porous silicon optical waveguides // *J. Luminescence*. — 1999. — N80. — P. 119-123.
 50. Lysenko V., Roussel Ph., Delhomme G. et al. Oxidized porous silicon: a new approach in support thermal isolation of thermopile-based biosensors // *Sensors and Actuators A*. — 1998. — N67. — P. 205-210.
 51. Sorli B., Garcia M., Benhida A. et al. Porous silicon layer used as a humidity sensor // *Proc. Europ. Mat. Conf. E-MRS 1999 Spring Meeting*. — 1999. — Symp. I: Microcrystalline and Nanocrystalline Semicond. — P. I-8.
 52. Rittersma Z.M., Benecke W. A novel capacitive porous silicon humidity sensor with integrated thermo- and refresh resistors gas sensors // *Proc. 13th Europ. Conf. Solid-State Transducers "Euroensors XIII", Sept. 12-15, 1999, the Hague, the Netherlands. 1999. — P. 371-374.*
 53. Kim S. — J., Jeon B. — H., Choi K-S. Improvement of the sensitivity by UV light in alcohol sensors using porous silicon layer // *CAS'99 Proc. 1999 Int. Semicond. Conf.* — V. 2. — Sinaia (Romania). — 1999. — P. 475-478.
 54. Thust M., Schoening M.J., Frohnhoff S., Arens-Fischer R., Kordos P., Luth H. Porous silicon as a substrate material for potentiometric biosensors // *Meas. Sci. Technol.* — 1996. — N7. — P.26-29.
 55. Bogue R.W. Novel porous silicon biosensor // *Biosensors and Bioelectronics* — 1997. — V. 12, N1. — P. xxvii-xxix.
 56. Schoening M.J., Ronkel F., Crott M. et al. Miniaturization of potentiometric sensors using porous silicon microtechnology // *Electrochim. Acta*. — 1997. — V. 42, N20-22. — P. 3185-3193.
 57. Lin V.S. — Y., Motesharei K., Dancil K-P. S. et al. A porous silicon-based optical interferometric biosensor // *Science*. — 1997. — V.278, N31. — P. 840-842.
 58. Dancil K. — P.S., Douglas P.G., Gurtner C., Sailor M.J. Development of a porous silicon based biosensor // *Proc. Mat. Res. Soc. Symp. "Microcrystalline and Nanocrystalline Semicond. Nov. 30 — Dec. 3, 1998. Boston, Massachusetts, USA" — 1998. — V. 536. — P. F3.3*

59. Dancil K. — P.S., Greiner D.P., Sailor M.J. A porous silicon optical biosensor: detection of reversible binding of IgG to a protein A-modified surface // *J. Americ. Chem. Soc.* — 1999. — N121. — P. 7925-7930.
60. van Noort D., Welin-Klintstroem S., Arwin H. et al. Monitoring specific interaction of low molecular weight biomolecules on oxidized porous silicon using ellipsometry // *Biosensors and Bioelectronics* — 1998. — V. 13, N3-4. — P. 439-449.
61. Zangoie S., Bjorklund R., Arwin H. Vapor sensitivity of thin porous silicon layers // *Sensors and Actuators B.* — 1997. — N43. — P. 168-174.
62. Kelly M.T., Bocarsly A.B. Mechanisms of photoluminescent quenching of oxidized porous silicon. Applications to chemical sensing // *Coordination Chem. Rev.* — 1998. — N171. — P. 251-259.
63. Foucaran A., Pascal-Delannoy F., Giani A. et al. Porous silicon layers used for gas sensor applications // *The Solid Films.* — 1997. — N297. — P. 317-320.
64. Starodub N.F., Fedorenko L.L., Starodub V.M., Dikiy S.P. and Svetchnikov S.V. Use of the silicon crystals photoluminescence to control immunocomplex formation // *Sensors and Actuators B.* — 1996. V. 35-36. — P. 44-47.
65. Starodub N.F., Fedorenko L.L., Starodub V.M., Dikiy S. P., Svechnikov S.V. Extinguishing visible photoluminescence of porous silicon stimulated by antigen-antibody immunocomplex formation // In: *Proc. SPIE Optical Organic and Semiconductor Inorganic Materials.* — 1997. V. 2968. — P. 73-76.
66. Стародуб В.М. Розробка імунних сенсорів на основі поруватого кремнію та дослідження їх функціональних характеристик // Автореферат дис. канд. біол. наук, Київ, 2000.
67. Starodub M., Starodub V., Fedorenko L. and Dikiy S. Immunosensor based on porous silicium photoluminescence for detection of specific antibodies level // In: *Proc. of the first national scientific-applied conference on the problem of AIDS with international participation, Kiev, 24-25.01.1995.* Kiev: Pravo, 1995. — P. 73-74.
68. Starodub N.F., Starodub V.M., Fedorenko L.L. and Dikiy S.P. Usage of the silicium crystal photoluminescence to registrate immunocomplex formation // In: *Proc. of the Sixth International Meeting on Chemical Sensors, July 22-25, 1996, NIST, Gaithersburg, 1996.* — P. 248.
69. Starodub V. M., Fedorenko, L.L., Dikiy, S.P. and Starodub, N.F. Antigen-antibody interaction: new aspects of the signal generation at the specific complex formation // In: *Proc. of the 17-th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in Conjunction with 1997 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, August 24-29, 1997, San Francisco, USA, 1997.* — P. 1787.
70. Canham L.T. Luminescence band and their propose origins in highly porous silicon // *Phys. Stat. Sol. B.* — 1995. — V.190, N9. — P. 9-14.
71. Fukuda Yo., Furuya K., Ishikawa N., Saito T. Aging behavior of photoluminescence in porous silicon // *J. Appl. Phys.* — 1997. — V. 82, N11. — P. 5718-5721.
72. Fedorenko L.L., Sardarly A.D., Kaganovich E.B., et al. Relaxation spectra of photoluminescence from porous silicon obtained by chemical etching of laser-modified silicon // *Semicond.* — 1997. — V.31, N1. — P. 4-7.
73. Свєчникoв С.В., Федoренкo Л.Л., Кагaнoвич Е.Б. та ін. Фoтoлюмiнесценцiя порувaтoгo кремнiю, одержaнoгo при зaстoсoвaннi лaзернoгo випрoмiнювaння // *Укр. Фiз. Ж.* — 1994. — Т.39, N6. — С. 704-705.
74. Torchinskaya T.V., Korsunskaya N.E., Khomenkova L.Yu. et al. Two ways of porous Si photoluminescence excitation // *Mat. Sci. and Engineer. B.* — 1998. — N51. — P. 162-165.
75. Calcott P.D.J. The mechanism of light emission from porous silicon: where are we 7 years on? // *Mat. Sci. and Engineer. B.* — 1998. — N51. — P. 132-140.
76. Chi N., Phillips D.L., Chan K. — Yu. In situ photoluminescence characterization of porous silicon formation // *Thin Solid Films.* — 1999. — N342. — P. 142-147.
77. Belogorokhov A.I., Endelein R., Tabata A. et al. Enhanced photoluminescence from porous silicon formed by nonstandard preparation // *Phys. Rev. B.* — 1997. — V. 56, N16. — P. 10276-10282.
78. Toyama T., Kotani Y., Shimode A., Okamoto H. Direct transition at the fundamental gap in light-emitting nanocrystalline Si thin film // *Appl. Phys. Lett.* — 1999. — V. 74, N22. — P. 3323-3325.
79. Chang I.M. Study on photoluminescence property of porous silicon // *Americ. Phys. Soc., March 1997 Meeting Program, 17-21 March 1997, Kansas City.* — 1997. — P. H41.45.
80. Withrow S.P., White C.W., Budai J.D., Meldrum A.L. Effect of hydrogen on photoluminescence from Si nanocrystals in SiO₂ // *Proc. Mat. Res. Soc. Symp. "Microcrystalline and Nanocrystalline Semicond. Nov. 30 — Dec. 3, 1998. Boston, Massachusetts, USA".* — 1998. — V. 536. — P. F3.9
81. Kovalev D., Heckler H., Averboukh B., Ben-Chorin M., Schwartzkopff M., Koch F. The origin of light emission porous silicon // *Ibid. "Symp. H".* — 1998. — V. 486. — P. H12.1
82. Fan J.C., Chen C.H., Chen Y.F. Observation of persistent photoluminescence in porous silicon:

- evidence of surface emission // *Appl. Phys. Lett.* — 1998. — V. 72, N13. — P. 1605-1607.
83. Nirmal M., Brus L. Luminescence photophysics in semiconductor nanocrystals // *Acc. Chem. Res.* — 1999. — N32. — P. 407-414.
 84. Kelly J.J., Kooij E.S., Vanmaekelbergh D. Generation and quenching of luminescence in n-type porous silicon/solution diodes: role of adsorbed hydrogen // *Langmuir*. — 1999. — N15. — P. 3666-3671.
 85. Brandt M.S., Fuchs H.D., Stutzmann M. et al. The origin of visible luminescence from “porous silicon”: a new interpretation // *Solid State Communications*. — 1992. — V. 81, N4. — P. 307-312.
 86. Gole J.L., Dudel F.P., Grantier D., Dixon D. Origin of porous silicon photoluminescence: Evidence for a surface bound oxyhydride-like emitter // *Phys. Rev. B*. — 1997. — V. 56, N4. — P. 2151-2153.
 87. Sendova-Vassileva M., Dimova-Malinovska D., Kamenova M. et al. Depth dependence of photoluminescence and chemical bonding in porous silicon // *J. Luminescence*. — 1999. — N80. — P. 179-182.
 88. Torchinskaya T.V., Korsunskaya N.E., Khomenkova L.Yu., Dzhumaev B.R. Adsorption assisted excitation of porous silicon photoluminescence // *Proc. Mat. Res. Soc. Symp. “Microcrystalline and Nanocrystalline Semiconductors*. Nov. 30 — Dec. 3, 1998. Boston, Massachusetts, USA.” — 1998. — V. 536. — P. F5.11
 89. Torchinskaya T.V., Korsunskaya N.E., Khomenkova L.Yu., Dzhumaev B.R. Role of oxidation process on porous silicon photoluminescence and its excitation // *Ibid.* — P. F5.41
 90. Obratsov A.N., Timoshenko V.Yu., Okushi H., Watanabe H. Comparative study of the optical properties of porous silicon and the oxides SiO and SiO₂ // *Semicond.* — 1999. — V. 33, N3. — P. 323-326.
 91. Bangert U., Gardelis S., Hamilton B., Pettifer R. Core shell spectroscopy of rapidly oxidised porous silicon // *Phys. Stat. Sol. B*. — 1995. — V. 190, N69. — P. 75-76.
 92. Song H.Z., Qin G.G., Yao D.C. et al. Microsecond photoluminescence decay and oxidation of porous silicon // *Solid State Communications*. — 1997. — V. 102, N11. — P. 813-816.
 93. Sheinkman M., Torchinskaya T.V., Korsunskaya N.E., Dzhumaev B., Khomenkova L. Complex studies of excitation mechanisms of porous silicon photoluminescence // *Proc. Mat. Res. Soc. Symp. “Symposium H.”* — 1997. — V. 486. — P. H12.7
 94. Starodub V. M., Fedorenko L. L., Sisetskiy A. P. and Starodub N. F. Control of myoglobin level in a solution by an immune sensor based on the photoluminescence of porous silicon // *Sensors and Actuators B*. — 1999. — V. 58 (1-3). — P. 409-414.
 95. Стародуб В. М., Федоренко Л. Л., Сісецький А. П., Курський М. Д. Імунний сенсор для визначення рівня міоглобіну // *Укр. Біохім. Ж.* — 1999. — V. 71 (3). — P. 68-72.
 96. Starodub N., Starodub V., Porous silicon: some theoretical aspects and practical application as transducer for immune sensor // *Extended abstracts of the 3d international conference. Porous semiconductors science and technology*. Puerto de la Cruz, Tenerife, Spain 10-15.03/2002. — 2002. — P.155-157.
 97. Стародуб М.Ф., Федоренко Л.Л., Стрільченко І.Ю., Стародуб В.М., Свечніков С.В. Спосіб фотолюмінесцентного імуноаналізу // 44341, Україна, Бюл. №2, 15.02.2002.
 98. Стародуб Н.Ф., Коробов В.Н., Назаренко В.И. Миоглобин: структура, свойства, синтез, биологическая роль. — К.: Наук. Думка, 1992. — 284 с.
 99. Woo J., Lacbawan F. L, Sunheimer R. et al. Is myoglobin useful in the diagnosis of acute myocardial infarction in the emergency department setting? // *Americ. J. Clin. Pathol.* — 1995. — N103. — P. 725-729.
 100. Ellis A.K., Little T., Masud Z. et al. Patterns of myoglobin release after reperfusion of injured myocardium // *Circulation*. — 1985. — V. 72, N3. — P. 639-647.
 101. Барон И.И., Бондарь В.С., Высоцкий Е.С. и др. Определение гемоглобина и миоглобина в моче хемилюминесцентным методом // *Ин-т физиологии СО АН СССР. Препр.* — 1986. — N416. — С. 12.
 102. Ротт Г.М., Лапшина Г.М., Ражинская И.В. и др. Разработка и сопоставление информационной значимости определения миоглобина в диагностике инфаркта миокарда. Тезисы сообщ. Всесоюзн. конференц. по применен. ферментов в биохимич. анализах. Паланга. 22-25 мая 1984 г. Вильнюс, 1984. — С. 18.
 103. Черняев А.Л. Миоглобин миокарда и скелетной мускулатуры // *Архив патолог.* — 1988. — Т. 50, вып. 1. — С. 82-87.
 104. Silva D.P., Landt Jr.Yv., Porter S.E. et al. Development and application of monoclonal antibodies to human cardiac myoglobin in a rapid fluorescence immunoassay // *Clin. Chem.* — 1991. — V. 37, N8. — P. 1356-1364.
 105. Ishii J., Nomura M., Ando T. et al. Early detection of successful coronary reperfusion based on serum myoglobin concentration: Comparison

- with serum creatine kinase isoenzyme MB activity
// *Americ. Health J.* — 1994. — V. 128, N4. —
P. 641-648.
106. Starodub V.M., Dibrova T.L., Kostjukevich K.,
Shirshov Y.M., Starodub N.F. Optical sensors for
medical diagnostics and environmental monitoring
// *Lecture Notes ICB Seminars “Measur. and
Microtech. for Determin. (Bio)chem. Quant. in
Med. and Environ. Monitor”*, Warsaw, Poland,
March 1998. — 1998. — P. 192-205.
107. Starodub V. M. and Starodub N. F. Optical
immune sensors for the monitoring protein
substances in the air // In: *Proc. of the 13th
European Conference on Solid-State Transducers*,
September 12-15, 1999, the Hague, the
Netherlands. — 1999. — P. 181-184.