

УДК 535.371

УСИЛЕНИЕ СИГНАЛА ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННЫХ ЭКЗОСОМ: ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ПРИСУТСТВИИ ПЛАЗМОННЫХ НАНОЧАСТИЦ

И.А. Нечепуренко^{1,2}, А.В. Дорофеев^{1,2,3}, А.П. Виноградов^{1,2,3}, Е.Г. Евтушенко⁴,
И.Н. Курочкин⁴

¹Всероссийский научно-исследовательский институт автоматики им. Н.Л. Духова;

²Московский физико-технический институт (Государственный университет);

³Институт теоретической и прикладной электродинамики РАН; ⁴Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; email: adorofeevko@yandex.ru

Предложен способ измерения концентрации экзосом в биологических образцах с использованием неселективного флуоресцентного мечения с последующим селективным усилением плазмонными наночастицами. Проведено теоретическое исследование предложенного подхода. Разработана модель для описания взаимодействия падающей волны, флуорофора и плазмонной наночастицы. Проведены расчеты усиления флуоресценции молекулы вблизи золотой или серебряной наночастицы с учетом реальной дисперсии диэлектрических проницаемостей металлов. Проанализированы физические механизмы усиления флуоресценции: изменение локальной интенсивности поля вблизи наночастицы, различие в эффективности излучения флуорофора и наночастицы, а также сверхизлучение.

Ключевые слова: экзосомы, усиление флуоресценции, плазмоны, металлические наночастицы.

Экзосомы – один из классов внеклеточных везикул, секретируемых животными клетками как в норме, так и под действием стимулов [1–3], которые участвуют в межклеточной коммуникации [4–6]. Типичный размер экзосом составляет от 30 до 100 нм, они имеют двойную липидную мембрану, ограничивающую внутреннюю водную полость, т.е., по сути, являются моноламеллярными липосомами естественного происхождения. Помимо липидов в состав экзосом входят белки и нуклеиновые кислоты [1, 2] (мембранные белки, белки внутренней полости, матричные и микро-РНК [7], иногда двуспиральная ДНК [8]), тип и число которых сильно меняются в зависимости от происхождения экзосом. Резко возросший в последние годы научный интерес к этим объектам связан прежде всего с возможностью их диагностического применения [2, 8–12], так как концентрация экзосом в биологических жидкостях (плазма крови, слюна, моча, амниотическая жидкость и т.д.), а также типы белков и нуклеиновых кислот в их составе существенно меняются при некоторых патологических состояниях организма.

Исследования, проведенные в последние годы, показали возможность использования флуоресцентного режима в методе анализа траекторий наночастиц (АТН) для селективного измерения размеров и

концентрации диагностически значимых фракций субмикронных частиц, в первую очередь экзосом, в биологических жидкостях [13–15]. В режиме рассеяния в методе АНТ исследуемый образец, содержащий субмикронные частицы, освещается плоским лазерным лучом. Регистрация рассеянного излучения производится с помощью объектива и высокочувствительной видеокамеры, расположенных под прямым углом к плоскости луча. Фотоны, рассеянные на отдельных частицах, формируют пятна (уширенные за счет дифракции) на матрице камеры. Анализ смещений центров этих пятен за счет Броуновского движения частиц с использованием уравнения Стокса–Эйнштейна позволяет рассчитать размер каждой попавшей в область наблюдения частицы [16]. Данные о числе частиц (среднее значение, полученное в течение всего времени наблюдения) используются для измерения их счетной концентрации [16]. Во флуоресцентном режиме метода АТН между объективом и камерой вводится светофильтр, отсекающий излучение на длине волны лазера, но пропускающий длинноволновую флуоресцентную часть [16]. Таким образом, в этом режиме регистрируются только частицы, либо обладающие собственной флуоресценцией (рис. 1, а), либо флуоресцентно меченные с использованием конъюгатов антител с флуоресцентными красителями (рис. 1, б).

Принципиальная схема существующей методики селективного измерения экзосом методом АТН [13–15] включает следующие стадии: центрифугирование образца на малых скоростях для удаления клеток и крупных фрагментов; добавление конъюгата флуоресцентного красителя и антител к специфическим поверхностным маркерам экзосом (мембранным белкам) и измерение во флуоресцентном режиме АТН. Недостатком этой методики является необходимость в десятках копий маркера на поверхности каждой экзосомы для достаточной интенсивности флуоресцентного сигнала.

Для решения данной проблемы предлагается подход, связанный с введением в экзосомы большого числа слабо селективных и малоинтенсивных флуоресцентных меток с последующим усилением флуоресценции за счет связывания конъюгата плазмонной

частицы и антител к редкому, но высокоспецифичному маркеру (например, тетраспанины CD63, CD81) [1, 3–6] (рис. 1, в, з).

Экспериментальные данные свидетельствуют, что интенсивность флуоресценции вблизи сферической плазмонной частицы является немонотонной функцией как размера частицы, так и расстояния от нее до флуорофора, т.е. в зависимости от системы может наблюдаться как тушение, так и усиление флуоресценции [18–22]. Исследовали усиление флуоресценции на несферических антеннах [23], а кроме того, зависимость усиления флуоресценции от радиуса наночастицы [26], расстояния от флуорофора до наночастицы [19, 27], а также частотной расстройки между плазмонным резонансом и флуоресцентным пиком [28]. С учетом очевидной сложности постановки эксперимента на препаратах экзосом пред-

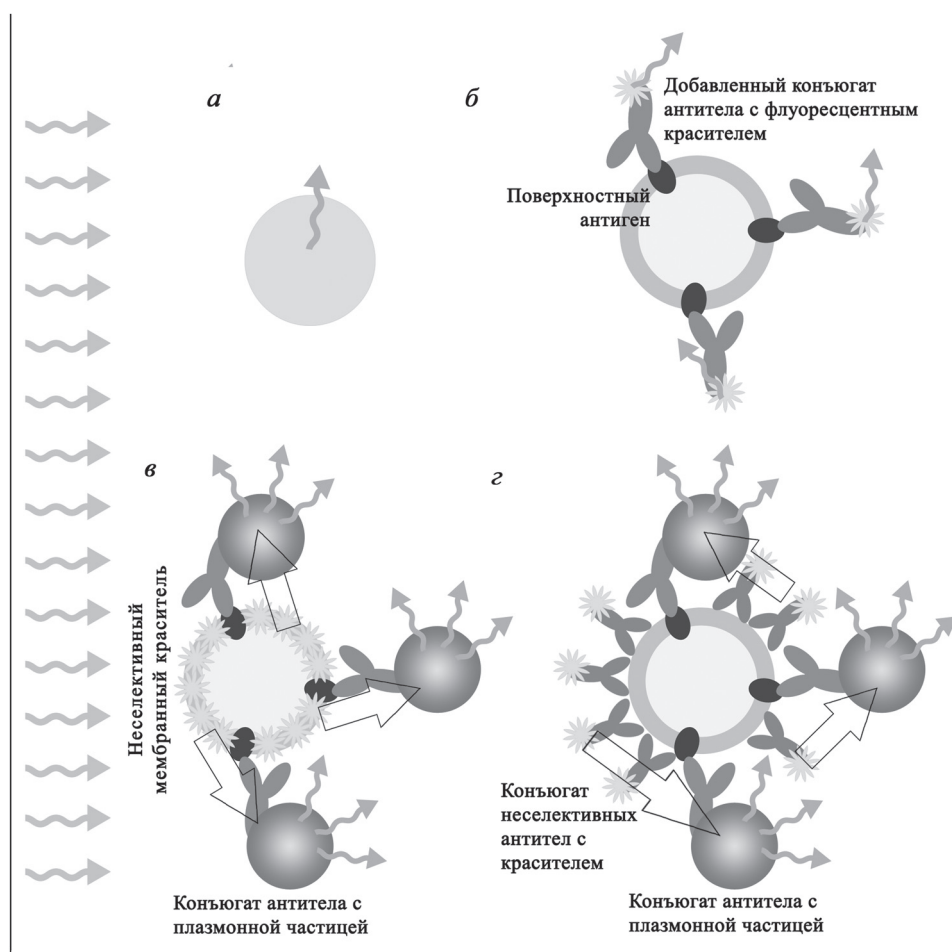


Рис. 1. Частица, обладающая собственной флуоресценцией (а) (например, квантовая точка); экзосома, меченная флуоресцентным красителем через антитела против специфического поверхностного антигена (б); экзосома, меченная неспецифическим мембранным красителем (например, BODIPY-Cer [17]), флуоресценция которого усиливается плазмонными частицами, связанными через специфические антитела (в); экзосома, меченная конъюгатом флуоресцентного красителя с антителами против неспецифического поверхностного антигена (например, ганглиозида GM3 [3]). Флуоресценция красителя усиливается плазмонными частицами, связанными через специфические антитела (з)

ставляется целесообразным на первом этапе провести теоретическое исследование процессов усиления и тушения флуоресценции вблизи плазмонной частицы для предлагаемой нами аналитической схемы (рис. 1, в, з).

Теоретические модели построены как для процесса излучения молекулы вблизи металлической наночастицы [29], так и для процесса флуоресценции в той же системе [30]. Тем не менее развитая в работе [30] модель требует данных о возбужденном состоянии флуорофора, экспериментальная оценка которого затруднена.

В данной работе предложена упрощенная модель, позволяющая корректно исключить такие параметры. Получено аналитическое решение для коэффициента усиления флуоресценции и проведен анализ механизмов, определяющих интенсивность флуоресценции. Данная задача актуальна, в частности, в связи с распространенным отождествлением усиления интенсивности флуоресценции с усилением локального поля [26].

На основе разработанной модели проведены расчеты усиления флуоресценции молекулы вблизи золотой или серебряной наночастицы с учетом реальной дисперсии диэлектрической проницаемости металлов. Дальнейшее усиление интенсивности флуоресценции возможно при использовании наночастиц несферической формы, создающих высокую локальную интенсивность поля, и наноплазмонных антенн, обеспечивающих высокую эффективность излучения [20, 23].

Модель флуоресценции вблизи металлической наночастицы

Флуоресценция представляет собой процесс поглощения фотона на некоторой частоте ω_0 с по-

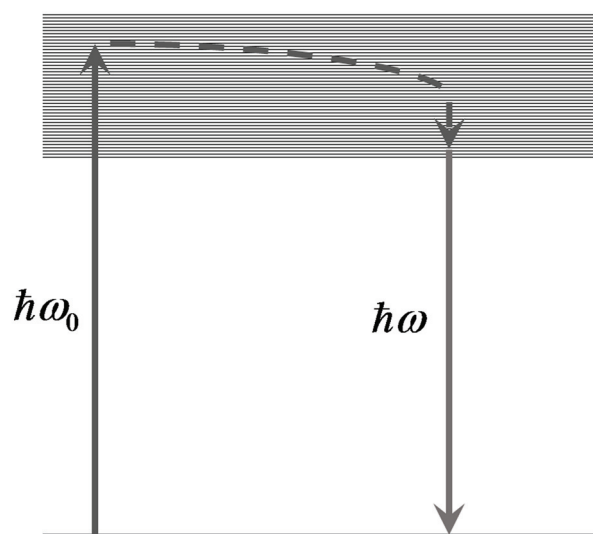


Рис. 2. Схема энергетических уровней системы, участвующей в процессе флуоресценции

следующим переизлучением на меньшей частоте ω (рис. 2). Переход между верхними состояниями осуществляется путем безызлучательной релаксации. При этом переходе теряются все свойства исходного перехода (фаза, частота ω_0), кроме поляризации [31]. Взаимодействие падающей волны с наночастицей и флуорофором и дальнейший процесс переизлучения схематично показан на рис. 3.

Поле E_0 , осциллирующее с частотой ω_0 , возбуждает в металлической наночастице и в частице флуорофора дипольные моменты d_{n0} и d_{f0} соответственно. При быстром нерадиационном переходе в частице флуорофора возникает дипольный момент d_f , осциллирующий на частоте ω . Он возбуждает на этой же частоте дипольный момент d_n наночастицы.

Для расчета взаимодействия наночастицы и флуорофора следует иметь в виду, что поле наночастицы

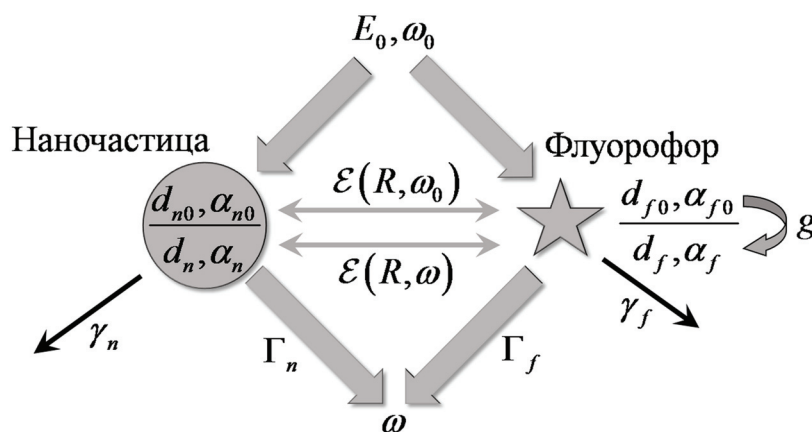


Рис. 3. Взаимодействия, учитываемые при моделировании флуоресценции вблизи металлической наночастицы (схема)

в месте нахождения частицы флуорофора пропорционально дипольному моменту наночастицы и равно $\varepsilon(R, \omega) d_n$, где поле единичного диполя должно быть записано с учетом дальних поле

$$E(R, \omega) = \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{R^3} - i \frac{\omega}{c} \frac{3\cos^2\theta - 1}{R^2} + \left(\frac{\omega}{c} \right)^2 \frac{\sin^2\theta}{R} \right) \times \exp(i\omega R / c),$$

где R – расстояние между молекулой флуорофора и центром наночастицы. На малых расстояниях $k_0 R \ll 1$

$$\varepsilon(R \rightarrow 0, \omega) \approx \frac{3\cos^2\theta - 1}{R^3} + \frac{2}{3} i \left(\frac{\omega}{c} \right)^3.$$

Таким образом, несмотря на расходимость поля вблизи точечного диполя, мнимая часть поля принимает конечное значение:

$$\varepsilon(0) \equiv \text{Im} \varepsilon(R \rightarrow 0, \omega) = \frac{2}{3} \left(\frac{\omega}{c} \right)^3. \quad (1)$$

Аналогично, поле частицы флуорофора в месте нахождения наночастицы равно $\varepsilon(R, \omega) d_f$.

В системе присутствуют две частоты: ω_0 – частота возбуждающей волны, и ω – частота флуоресценции. Учитывая это, запишем уравнения:

$$\begin{cases} d_{f0} = \alpha_{f0} [E_0 + \varepsilon_0(R) d_{n0}] - g d_{f0}, \\ d_{n0} = \alpha_{n0} [E_0 + \varepsilon_0(R) d_{f0}], \\ d_f = \alpha_f \varepsilon(R) d_n + g d_{f0}, \\ d_n = \alpha_n \varepsilon(R) d_f. \end{cases} \quad (2)$$

Здесь индексы «0» обозначают величины, относящиеся к частоте ω_0 ; при отсутствии индекса величина относится к частоте ω . Кроме того, использованы обозначения α_f – поляризуемость флуорофора, α_n – поляризуемость наночастицы, E_0 – амплитуда внешнего электромагнитного поля. Указанная система уравнений описывает взаимодействие диполя и наночастицы.

Поляризуемость наночастицы с учетом радиационной поправки

В приближении малых размеров наночастицы ее поляризуемость имеет вид

$$\alpha(\omega) = \frac{\varepsilon_M(\omega) - \varepsilon_E}{\varepsilon_M(\omega) + 2\varepsilon_E} a^3,$$

где a – радиус наночастицы, $\varepsilon_M(\omega)$ – диэлектрическая проницаемость наночастицы, ε_E – диэлектрическая

проницаемость внешней среды. В нашем случае роль материала играет металл (серебро или золото). Мощность потерь наночастицы равна

$$P = \langle \mathbf{d} \cdot \mathbf{E} \rangle = \text{Re} \left[-i\omega (\mathbf{d} \cdot \mathbf{E}^*) \right] / 2 = \omega \text{Im} (\mathbf{d} \cdot \mathbf{E}^*) / 2.$$

Чтобы учесть потери на излучение, надо к внешнему полю добавить собственное поле диполя, которое, в свою очередь, равно $d\varepsilon(0)$, так что

$$P = \omega \text{Im} \left(\mathbf{d} \cdot (\mathbf{E} + d\varepsilon(0))^* \right) / 2 = \omega |\mathbf{d}|^2 \text{Im} \left[1 / \alpha^* + \varepsilon(0)^* \right] / 2,$$

или

$$P = -\frac{\omega}{2} |\mathbf{d}|^2 \text{Im} \left[\alpha^{-1} + \varepsilon(0) \right]. \quad (3)$$

Величина в квадратных скобках представляет собой обратную поляризуемость. Таким образом, необходимо использовать поляризуемость в виде

$$\alpha_n^{-1}(\omega) = \alpha^{-1} - i\varepsilon''(0) = \frac{\varepsilon_M + 2\varepsilon_E}{\varepsilon_M - \varepsilon_E} a^{-3} - \frac{2}{3} i \left(\frac{\omega}{c} \right)^3. \quad (4)$$

Поляризуемость частицы флуорофора

Начнем с написания временного уравнения колебаний дипольного момента двухуровневой квантовой системы, находящейся в поле E [32]:

$$\dot{d}_f + (\gamma_f + i\delta\omega_f) d_f = -i\hbar^{-1} |d_{12}|^2 n_0 E.$$

Здесь d_{12} – дипольный момент перехода, γ_f – скорость релаксации дипольного момента ($\gamma_f = 1/T_2$, где T_2 – время поперечной релаксации), обусловленная нерадиационными и радиационными процессами; ($n_0 = -1$) – инверсия населенностей, соответствующая нахождению большинства молекул флуорофора на нижнем уровне; ($\delta\omega_f = \omega_{0f} - \omega$) – отстройка частоты перехода флуорофора от частоты внешней волны. В соответствии с этим уравнением, в стационаре

$$d_f = \frac{|d_{12}|^2 (-n_0)}{\hbar (\delta\omega_f - i\gamma_f)} E, \quad \text{т.е.}$$

$$\alpha_f(\omega) = \frac{|d_{12}|^2 (-n_0)}{\hbar (\delta\omega_f - i\gamma_f)}, \quad (5)$$

где примем $\delta\omega_f = 0$.

Для численной оценки параметра α_f используем известное значение квантовой эффективности $\eta \approx 0,5$ (для красителя Alexa 405), которое также выражается через соотношение радиационной и не-

радиационной частей, составляющих вместе мнимую часть поляризуемости (аналогично формуле):

$$\text{Im} \alpha_f^{-1} = \text{Im} \alpha_{non-rad}^{-1} + \text{Im} \alpha_{rad}^{-1}.$$

Для нахождения радиационной части можно повторить вывод формулы, что позволяет найти

$$\text{Im} \alpha_{rad}^{-1} = \text{Im} [\varepsilon(R \rightarrow 0, \omega)].$$

Соответственно, поляризуемость флуорофора равна

$$\alpha_f^{-1} = -i\varepsilon''(0) / \eta. \quad (6)$$

Заметим, что выбор нулевой отстройки частоты для флуорофора связан с тем, что на частоте накачки всегда присутствуют уровни энергии флуорофора.

Решение основных уравнений

Решение системы имеет вид

$$\left\{ \begin{array}{l} d_{f0} = \frac{1 + \alpha_{n0} \varepsilon_0(R)}{1 + g - \alpha_{f0} \alpha_{n0} \varepsilon_0^2(R)} \alpha_{f0} E_0 \\ d_{n0} = \alpha_{n0} E_0 + \frac{1 + \alpha_{n0} \varepsilon_0(R)}{1 + g - \alpha_{f0} \alpha_{n0} \varepsilon_0^2(R)} \alpha_{f0} \alpha_{n0} \varepsilon_0(R) E_0 \\ d_f = \frac{g d_{f0}}{1 - \alpha_f \alpha_n \varepsilon^2(R)} \\ d_n = \frac{\alpha_n \varepsilon(R) g d_{f0}}{1 - \alpha_f \alpha_n \varepsilon^2(R)} \end{array} \right. \quad (7)$$

Считая нерадиационный переход в сплошном спектре частицы флуорофора очень быстрым, найдем предел $g \rightarrow \infty$. Тогда из первого уравнения системы получим

$$g d_{f0} = \alpha_{f0} [1 + \alpha_{n0} \varepsilon_0(R)] E_0.$$

Это приближение означает, что дипольный момент d_{f0} становится очень малым при $g \rightarrow \infty$ и перестает влиять на дипольный момент наночастицы. В результате локальное поле на частоте ω_0 определяется простым выражением

$$[1 + \alpha_{n0} \varepsilon_0(R)] E_0.$$

Дипольные моменты находятся подстановкой величины $g d_{f0}$:

$$d_f = \frac{1 + \alpha_{n0} \varepsilon_0(R)}{1 - \alpha_f \alpha_n \varepsilon^2(R)} \alpha_{f0} E_0, \quad (8)$$

$$d_n = \frac{1 + \alpha_{n0} \varepsilon_0(R)}{1 - \alpha_f \alpha_n \varepsilon^2(R)} \alpha_{f0} \alpha_n \varepsilon(R) E_0. \quad (9)$$

Уравнение баланса энергий

Получим выражение для излучаемой энергии. Для этого интерпретируем слагаемое $g d_{f0}$, индуцирующее колебания дипольного момента флуорофора на частоте ω , как эффективное поле, действующее на дипольный момент флуорофора:

$$a_f E_{eff} = g d_{f0}.$$

Тогда, записывая уравнения на дипольные моменты из системы (2),

$$d_f = \alpha_f \varepsilon(R) d_n + a_f E_{eff}, \quad (10)$$

$$d_n = \alpha_n \varepsilon(R) d_f, \quad (11)$$

получим уравнение баланса энергий. Для этого проведем с уравнениями (10), (11) операцию вида

$$\begin{aligned} & (\alpha_f^{-1}(10) \cdot d_f^* - (\alpha_f^{-1})^*(10)^* \cdot d_f) + \\ & + (\alpha_n^{-1}(11) \cdot d_n^* - (\alpha_n^{-1})^*(11)^* \cdot d_n) = \\ & (\alpha_f^{-1} d_f d_f^* - (\alpha_f^{-1})^* d_f^* d_f) + (\alpha_n^{-1} d_n d_n^* - (\alpha_n^{-1})^* d_n^* d_n) = \\ & = E_{eff} d_f^* - E_{eff}^* d_f + \varepsilon(R) d_f^* d_n - \varepsilon^*(R) d_f d_n^* + \\ & + \varepsilon(R) d_f d_n^* - \varepsilon^*(R) d_f^* d_n. \end{aligned}$$

В последних четырех слагаемых исчезают действительные части ε , что соответствует компенсации потоков энергии внутри системы:

$$\begin{aligned} & \text{Im} \alpha_f^{-1} |d_f|^2 + \text{Im} \alpha_n^{-1} |d_n|^2 = \\ & = \text{Im} E_{eff} d_f^* + 2\varepsilon''(R) \text{Re} [d_f d_n^*]. \end{aligned}$$

Далее, разделим обратные поляризуемости на излучательный и безызлучательный вклады, причем излучательный вклад равен

$$\text{Im} \alpha_{f,rad}^{-1} = \text{Im} \alpha_{n,rad}^{-1} = \text{Im} [\varepsilon(R \rightarrow 0, \omega)]:$$

$$\begin{aligned} \text{Im} E_{eff} d_f^* & = -\text{Im} \alpha_{f,non-rad}^{-1} |d_f|^2 - \text{Im} \alpha_{n,non-rad}^{-1} |d_n|^2 + \\ & + \varepsilon''(0) |d_f|^2 + \varepsilon''(0) |d_n|^2 + 2\varepsilon''(R) \text{Re} [d_f d_n^*]. \end{aligned} \quad (12)$$

В соответствии с выражением (3), величина

$$P = -\frac{\omega}{2} \text{Im} [\alpha^{-1}] |d|^2$$

имеет смысл мощности, получаемой или теряемой системой. Тогда слагаемое в левой части уравнения соответствует источнику энергии, первые два слагаемых в правой части соответствуют нерадиационным потерям, последние три слагаемых – радиационным потерям. В результате мощность излучения равна

$$P_{rad} = \frac{\omega}{2} \left(\varepsilon''(0) |d_f|^2 + \varepsilon''(0) |d_n|^2 + 2\varepsilon''(R) \operatorname{Re}[d_f d_n^*] \right). \quad (13)$$

Подставляя сюда решения (8), (9), получим для излучаемой мощности

$$P_{rad} = \frac{\omega}{2} |\alpha_{f0}|^2 \frac{|1 + \alpha_{n0} \varepsilon_0(R)|^2}{|1 - \alpha_f \alpha_n \varepsilon^2(R)|^2} \times \left(\varepsilon''(0) + \varepsilon''(0) |\alpha_n \varepsilon(R)|^2 + 2\varepsilon''(R) \operatorname{Re}[\alpha_n \varepsilon(R)] \right) |E_0|^2,$$

или для сечения флуоресценции

$$\sigma = P_{rad} / \left(\frac{c}{8\pi} |E_0|^2 \right) \left(1 + \alpha_f \alpha_n \varepsilon^2(R) \right)^2.$$

системы флуорофор + наночастица

$$\sigma = \frac{4\pi\omega}{c} |\alpha_{f0}|^2 |1 + \alpha_{n0} \varepsilon_0(R)|^2 \times \frac{\varepsilon''(0) + \varepsilon''(0) |\alpha_n \varepsilon(R)|^2 + 2\varepsilon''(R) \operatorname{Re}[\alpha_n \varepsilon(R)]}{|1 - \alpha_f \alpha_n \varepsilon^2(R)|^2}, \quad (14)$$

где поляризуемость определяется выражениями (4), (6). Здесь множитель $|1 + \alpha_{n0} \varepsilon_0(R)|^2$ описывает усиление локальной интенсивности поля наночастицей на частоте ω_0 . Знаменатель в выражении при отсутствии отстройки, когда поляризуемости являются чисто мнимыми числами, принимает вид

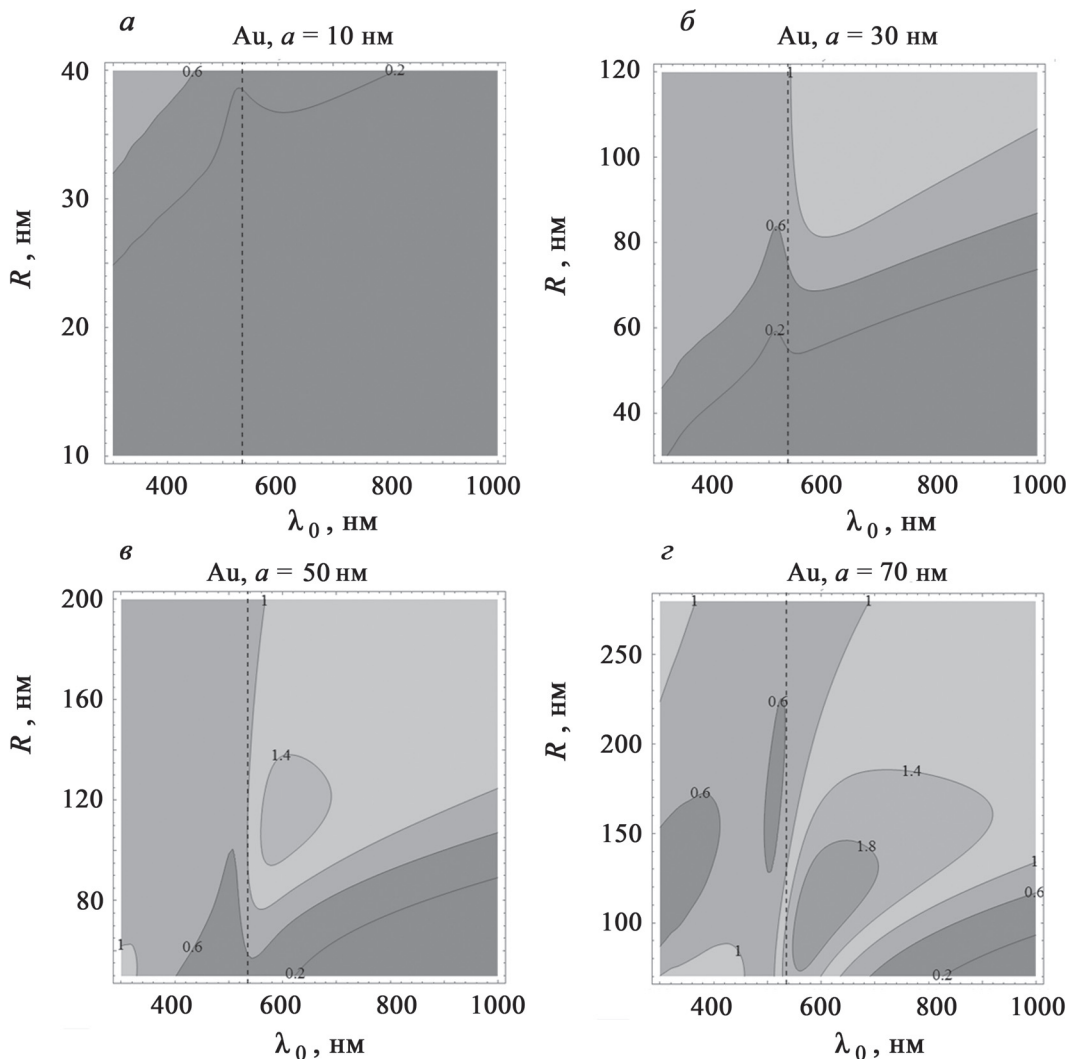


Рис. 4. Коэффициент усиления флуоресценции ξ золотой наночастицей (радиус, нм: *a* – 10, *б* – 30, *в* – 50, *з* – 70) в зависимости от длины волны $\lambda_0 = 2\pi c/\omega_0 = 2\pi c/\omega$ и расстояния R между центром наночастицы и частицей флуорофора. Вертикальной штриховой линией отмечена длина волны, соответствующая плазмонному резонансу наночастицы

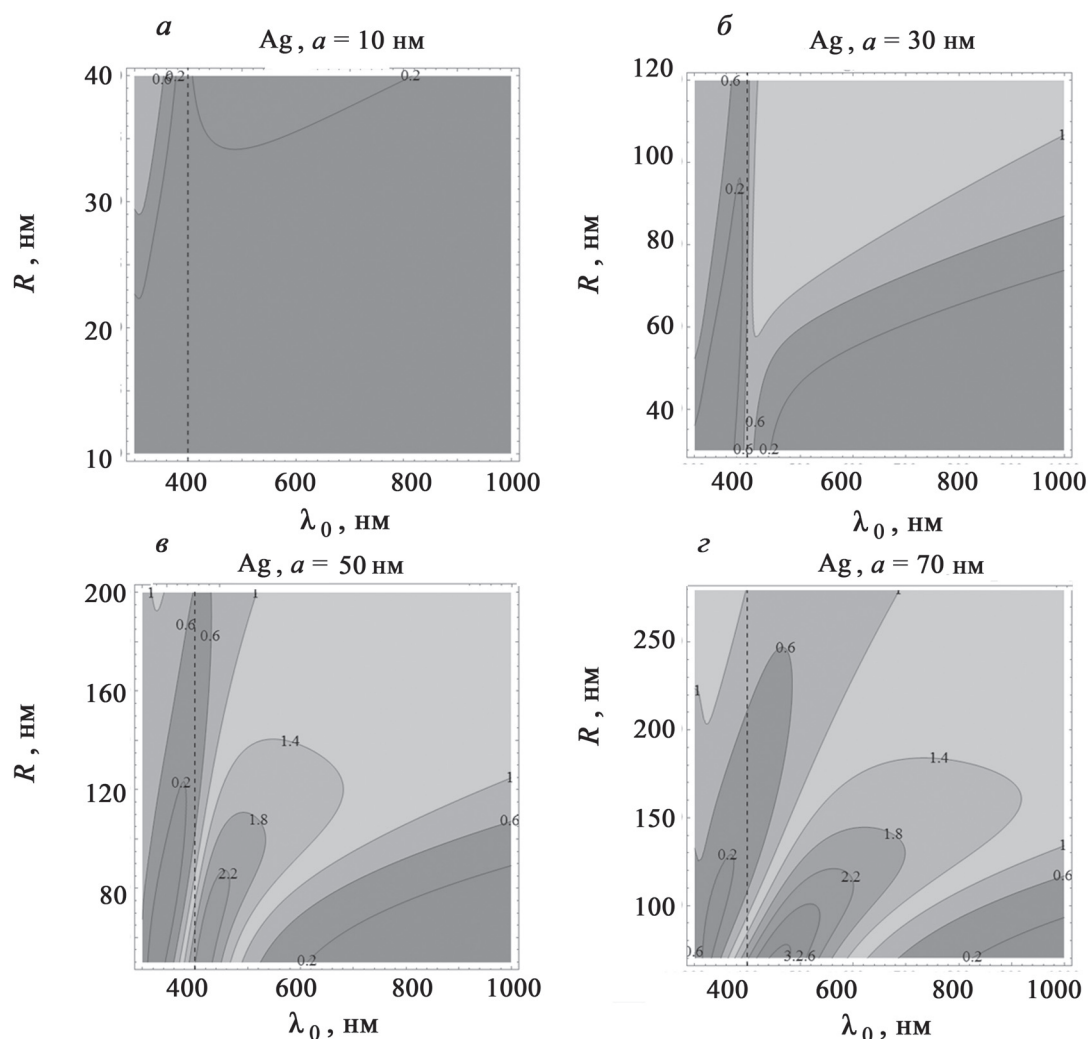


Рис. 5. Коэффициент усиления флуоресценции ξ серебряной наночастицей (радиус, нм: *a* - 10, *b* - 30, *v* - 50, *z* - 70) в зависимости от длины волны $\lambda_0 = 2\pi c/\omega_0 = 2\pi c/\omega$ и расстояния R между центром наночастицы и частицей флуорофора. Вертикальной штриховой линией отмечена длина волны, соответствующая плазмонному резонансу наночастицы

Отсюда ясно, что знаменатель описывает ослабление колебаний диполей вследствие потерь на поглощение и излучение. Три слагаемых в числителе в выражении описывают соответственно излучение флуорофора, излучение наночастицы и интерференционный вклад в излучение (в частности, сверхизлучение).

Коэффициент усиления флуоресценции

Коэффициент усиления флуоресценции определим как отношение сечения флуоресценции σ системы флуорофор + наночастица к той же величине для флуорофора в отсутствие наночастицы σ_0 . Сечение флуоресценции флуорофора в отсутствие наночастицы получается из при $\alpha_{n0} = \alpha_n = 0$:

$$\sigma_0 = 4\pi \frac{\omega}{c} |\alpha_{f0}|^2 \varepsilon''(0).$$

Таким образом, коэффициент усиления флуоресценции имеет вид

$$\xi = \left| 1 + \alpha_{n0} \varepsilon_0(R) \right|^2 \times \frac{1 + |\alpha_n \varepsilon(R)|^2 + 2 \operatorname{Re} \left[(\alpha_n \varepsilon(R))^* \right] \varepsilon''(R) / \varepsilon''(0)}{\left| 1 - \alpha_f \alpha_n \varepsilon^2(R) \right|^2}. \quad (15)$$

Результаты расчетов

Полученный результат позволяет провести расчет коэффициента усиления флуоресценции в зависимости от расстояния между флуорофором и наночастицей. Рассмотрены случаи золотой (рис. 4) и серебряной (рис. 5) наночастиц. При расчете использовали реальную дисперсию металлов [33, 34]. Максимальный коэффициент усиления при использовании золотых и серебряных наночастиц радиусом не более

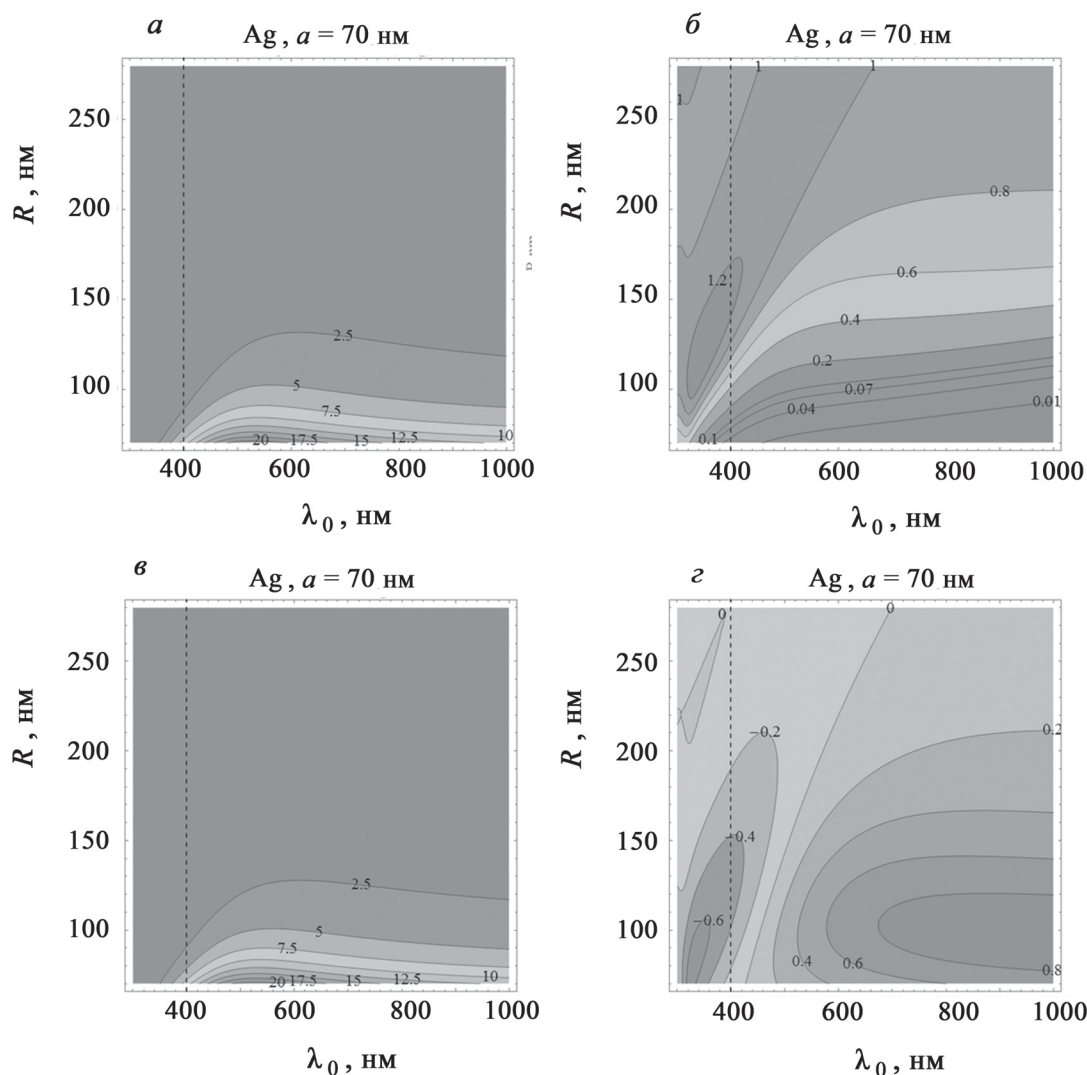


Рис. 6. Различные вклады в коэффициент усиления ξ флуоресценции серебряной наночастицей радиуса 70 нм: усиления интенсивности локального поля (*а*), подавления флуоресценции из-за поглощения (*б*), излучения наночастицы (*в*), а также относительный вклад сверх- (суб-)излучения в общее излучение (*г*)

70 нм равен соответственно 2 и 3. Результаты представлены для случая $\omega = \omega_0$, так как уменьшение ω по сравнению с ω_0 не улучшает результата.

Представленная картина демонстрирует нетривиальную комбинацию эффектов гашения флуоресценции за счет поглощения в наночастице и ее усиления за счет двух эффектов: усиления локального электрического поля наночастицей и усиления излучения парой диполей флуорофор + наночастица по сравнению с одиночным флуорофором. При малых размерах наночастиц во всей рассматриваемой области наблюдается гашение, которое особенно велико вблизи условия плазмонного резонанса. При увеличении размеров наночастицы вокруг резонансной длины волны возникают две области: слева по

оси длин волн – область подавления флуоресценции ($\xi < 1$), справа – область ее усиления ($\xi > 1$). В случае золотых наночастиц (рис. 4) существует некоторое оптимальное расстояние между наночастицей и частицей флуорофора, когда усиление флуоресценции максимально. В случае серебряных наночастиц флуорофор лучше располагать непосредственно на поверхности наночастицы.

Чтобы разобраться в механизмах усиления/ослабления флуоресценции, рассмотрим отдельные вклады в коэффициент усиления (рис. 6) для случая наиболее выраженного эффекта, соответствующего рис. 5, *г*. Коэффициент усиления интенсивности локального поля $|1 + \alpha_{n0}\epsilon_0(R)|^2$ из уравнения показан на рис. 6, *а*. Он достигает своего максимального значения

~20 именно там, где общий коэффициент усиления ξ максимален. В этой области велико подавление флуоресценции, связанное с уменьшением амплитуды колебаний дипольных моментов в результате потерь. Этот эффект описывается множителем $|1 - \alpha_j \alpha_n \varepsilon^2(R)|^{-2}$ в уравнении . Данный множитель достигает значений ~0,01 (рис. 6, б). Именно из-за этого множителя не удастся получить усиление малыми плазмонными частицами. Однако в случае большого размера наночастицы возникает дополнительное усиление, связанное с «антенным эффектом», т.е. со способностью наночастицы излучать. Этот эффект описывается числителем в уравнении и достигает в рассматриваемой области величины ~20 (рис. 6, в). Схожесть рис. 6, а и б, в связана с тем, что радиационный вклад отличается лишь добавкой, связанной со сверхизлучением (третье слагаемое в числителе уравнения) от коэффициента усиления интенсивности локального поля, а вклад сверхизлучения относительно невелик. Последнее видно из рис. 6, г, где показана относительная доля сверхизлучения в общем излучении и видны

области как положительного, так и отрицательного («субизлучение») вкладов.

Заключение

Таким образом, проведено теоретическое исследование процесса флуоресценции вблизи плазмонной частицы. Показано, что при малом размере наночастицы усиление флуоресценции определяется усилением локального поля наночастицей $\sim |E_{loc}|^2$, и в этом случае подавление в результате поглощения доминирует. Общий эффект заключается в гашении флуоресценции. При большем размере наночастицы (радиус более 50 нм) появляется дополнительный механизм усиления флуоресценции, связанный с усиленным излучением наночастицей. В результате общий коэффициент усиления становится $\sim |E_{loc}|^4$ и начинает превосходить коэффициент гашения флуоресценции поглощением. Полученные результаты, соответствующие трехкратному усилению флуоресценции, могут быть улучшены на путем использования систем (агрегатов) наночастиц или вариации их формы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Théry C., Zitvogel L., Amigorena S.* // Nat. Rev. Immunol. 2002. Vol. 2. P. 569.
2. *Vlassov A.V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R.* // Biochimica et Biophysica Acta. 2012. Vol. 1820. N 7. P. 940.
3. *Colombo M., Raposo G., Théry C.* // Cell and Developmental Biology. 2014. Vol. 30. P. 255.
4. *Simons M., Raposo G.* // Current Opinion in Cell Biology. 2009. Vol. 21. P. 575.
5. *Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J.* // J. of Proteomics. 2010. Vol. 73. P. 1907.
6. *Ludwig A.-K., Giebel B.* // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2012. Vol. 44. P. 11.
7. *Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O.* // Nature Cell Biology. 2007. Vol. 9. N 6. P. 654.
8. *Thakur B.K., Zhang H. et al.* // Cell Research, 2014. Vol. 24. P. 766.
9. *Knepper M.A. et al.* // Nephrology. 2005. Vol. 10. P. 283.
10. *Simpson R.J., Lim J.W., Moritz R.L., Mathivanan S.* // Expert Review of Proteomics. 2009. Vol. 6. N 3. P. 267.
11. *Keller S., Ridinger J., Rupp A.-K., Janssen J.W.G., Altevogt P.* // J. of Translational Medicine. 2011. Vol. 9. N 86. P. 1.
12. *Jia S., Kuo W.P. et al.* // Expert Review of Molecular Diagnostics, 2014. Vol. 14. N 3. P. 307.
13. *Dragovic R.A., Sargent I.L. et al.* // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2011. Vol. 7. P. 780.
14. *Gercel-Taylor C., Atay S., Tullis R.H., Kesimer M., Taylor D.D.* // Analytical Biochemistry. 2012. Vol. 428. P. 44.
15. *Gardiner C., Ferreira Y.J., Dragovic R.A., Redman C.W.G., Sargent I.L.* // J. of Extracellular Vesicles. 2013. Vol. 2. P. 10.
16. ASTM Standard E2834, 2012. ASTM International. West Conshohocken, PA, 2012.
17. *Laulagniera K., Vincent-Schneider H., Hamdia S., Subraa C., Lankarb D., Recorda M.* // Blood Cells, Molecules, and Diseases. 2005. Vol. 35. P. 116.
18. *Anger P., Bharadwaj P., Novotny L.* // Phys. rev. lett. 2006. Vol. 96. P. 113002.
19. *Kühn S. et al.* // Phys. rev. lett. 2006. Vol. 97. N 1. P. 017402.
20. *Muskens O. et al.* // Nano lett. 2007. Vol. 7. N 9. P. 2871.
21. *Dulkeith E. et al.* // Nano lett. 2005. Vol. 5. N 4. P. 585.
22. *Eghlidi H. et al.* // Nano lett. 2009. Vol. 9. N 12. P. 4007.
23. *Giannini V., Sánchez-Gil J.A.* // Optics lett. 2008. Vol. 33. N 9. P. 899.
24. *Sokolov K., Chumanov G., Cotton T.M.* // Analytical Chemistry. 1998. Vol. 70. N 18. P. 3898.
25. *Bardhan R. et al.* // Acs Nano. 2009. Vol. 3. N 3. P. 744.
26. *Stranik O. et al.* // Plasmonics. 2007. Vol. 2. N 1. P. 15.
27. *Azoulay J. et al.* // Europhys. Lett. 2000. Vol. 51. N 4. P. 374.
28. *Chen Y., Munechika K., Ginger D.S.* // Nano lett. 2007. Vol. 7. N 3. P. 690.
29. *Rupp R.* // J. Chem. Phys. 1982. Vol. 76. N 4. P. 1681.
30. *Das P.C. et al.* // Phys. Rev. B. 2002. Vol. 65. N 15. P. 155416.
31. *Valeur B., Berberan-Santos M.N.* Molecular fluorescence: principles and applications. N.Y., 2012.
32. *Ханин Я.* Основы динамики лазеров. М., 1999.
33. *Palik E.D.* Handbook of optical constants of solids. Vol. 3. N.Y., 1998.
34. *Rakic A.D. et al.* // Applied optics. 1998. Vol. 37. N 22. P. 5271.

**SIGNAL ENHANCEMENT FROM FLUORESCENTLY LABELED EXOSOMES:
THEORETICAL ANALYSIS OF FLUORESCENCE IN THE VICINITY
OF PLASMONIC NANOPARTICLE**

**I.A. Nechepurenko^{1,2}, A.V. Dorofeenko^{1,2,3}, A.P. Vinogradov^{1,2,3}, E.G. Evtushenko⁴,
I.N. Kurochkin⁴**

(¹The Federal State Unitary Enterprise All-Russia Research Institute of Automatics, Moscow, Russia; ²Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow Region, Dolgoprudny, Russia; ³Institute for Theoretical and Applied Electromagnetics RAS, Moscow, Russia; ⁴M.V. Lomonosov Moscow State University: e-mail: adorofeenko@yandex.ru)

An approach for measurement of exosomes concentration in biofluids based on non-specific labeling by fluorescent dye followed by specific fluorescence enhancement by plasmonic particle is proposed. Theoretical evaluation of proposed scheme is performed. A model of the interaction of the incident wave, the fluorophore and the plasmonic nanoparticles is developed. Calculations of the amplification of molecule fluorescence near a gold or silver nanoparticles are performed with the account of actual dispersion of the metal dielectric permittivity. Physical mechanisms of the fluorescence enhancement are described. These are change of the local field intensity by the nanoparticle, difference in the radiation efficiency of the fluorophore and the nanoparticles, as well as superradiance.

Key words: exosomes, fluorescence enhancement, plasmons, metallic nanoparticles.

Сведения об авторах: *Нечепуренко Игорь Александрович* – науч. сотр. лаборатории разработки оптических устройств нового поколения Всероссийского научно-исследовательского института автоматики им. Н.Л. Духова (i-nechepurenko@mail.ru); *Дорофеенко Александр Викторович* – вед. науч. сотр. Института теоретической и прикладной электродинамики РАН, канд. физ.-матем. наук (adorofeenko@yandex.ru); *Виноградов Алексей Петрович* – глав. науч. сотр. Института теоретической и прикладной электродинамики РАН, докт. физ.-матем. наук (a-vinogr@yandex.ru); *Евтушенко Евгений Геннадиевич* – ассистент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (evtushenko@enzyme.chem.msu.ru); *Курочкин Илья Николаевич* – зав. лаб. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (ikur@genebee.msu.su).