

## ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МИКРО- И ОПТОЭЛЕКТРОНИКИ

УДК 53.06

### ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ КОМПЛЕКСОВ «СПАЗЕРЫ В ЛИПОСОМАХ» ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАНОСТИКЕ

© А. С. Кучьянов<sup>1</sup>, С. Л. Микерин<sup>1</sup>, С. В. Адищев<sup>1</sup>,  
А. Х. Ш. Алькаиси<sup>2</sup>, Ю. В. Зайцева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт автоматизации и электрометрии СО РАН,  
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Коптюга, 1

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет,  
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2  
E-mail: [aleks@iae.nsk.su](mailto:aleks@iae.nsk.su)

Экспериментально исследована возможность формирования комплекса спазеров внутри искусственно создаваемых замкнутых мембранных оболочек (липосом). Локализация комплексов внутри липосом подтверждена с помощью сканирующего конфокального микроскопа. Продемонстрировано, что при этом спазеры сохраняют свою работоспособность. Полученные результаты показывают перспективность инкапсулирования спазеров в липосомы как эффективных агентов тераностики.

*Ключевые слова:* плазмоника, наночастицы, спазер, доставка лекарств, липосомы, тераностика.

DOI: 10.15372/AUT20200312

**Введение.** Изучение спазеров как нового физического нанобъекта, впервые предложенного в [1], привело к работам по их практическому применению в качестве агента тераностики [2] (комплекса методов, реализующих как диагностику, так и терапию с помощью одного агента). Это связано, прежде всего, с их основным свойством — способностью создавать при спазерной генерации высокую напряжённость электрических когерентных полей в нанометровой области вблизи их поверхности (в ближней зоне). Кроме того, интенсивность в дальней зоне свечения спазеров намного (более 100 раз) превосходит интенсивность люминесцентных меток, применяемых в биомедицине. Спазеры потенциально повышают чувствительность методов диагностики. В [2] впервые продемонстрировано применение спазеров размером 22 нм как биосовместимых оптических зондов, обеспечивающих одновременно сверхъяркую эмиссию с высокой контрастностью изображения с одновременным разрушением раковых клеток молочной железы (MDA-MB-231).

Однако транспорт спазеров внутри биологической среды и доставка к повреждённым клеткам сдерживаются рядом трудностей.

Несмотря на то что кремнезём, входящий в состав спазеров, считается нетоксичным для биоорганизма, установлена опасность со стороны кремнезёма, введённого в организм, вызывать онкологические и другие заболевания [3, 4].

Применению спазеров для лечения *in vivo* препятствует ретикулоэндотелиальная система (система макрофагов) — система клеток, рассеянных в разных отделах организма, выполняющих барьерную и фагоцитарную функцию. Поэтому время пребывания спазеров в организме значительно ограничивается.

В клеточной биологии хорошо известен механизм транспорта внутри биологической среды чужеродных веществ, когда они заключены внутри мембранных оболочек. Этот принцип используется для доставки лекарств. Однако применение этого принципа для спазеров, насколько нам известно, ещё не изучалось.

С учётом этого в данной работе рассматривается возможность расширения применения спазеров в биомедицине с помощью таких средств доставки веществ, как липосомы. Экспериментально опробован данный подход с целью проверить возможность инкапсуляции и установить работоспособность спазеров в инкапсулированном состоянии.

**Спазер.** Спазер, применённый в [2] в качестве биосовместимого зонда, представляет собой наноразмерный аналог лазера как источника мощного когерентного излучения и состоит из золотого сферического ядра, покрытого кремнезёмной оболочкой, которая пропитана красителем уранином. Способ, позволяющий уменьшить источник излучения до субволновых размеров, связан с использованием металлической наночастицы. Упрощённо механизм работы такого источника можно описать следующим образом.

Свободные электроны в металлической наночастице из-за малых размеров могут совершать коллективные колебания (локализованные плазмонные колебания (ЛПК)). Собственная частота таких колебаний лежит в оптическом диапазоне (плазмонный резонанс). Наночастица окружена тонким слоем активной среды (краситель), который пространственно перекрывается с областью сильного электрического поля моды ЛПК. При этом спектральная линия излучения активной среды совпадает с плазмонным резонансом, что создает интенсивное резонансное её взаимодействие с наночастицей. С одной стороны, активная среда возбуждается за счет поглощения энергии от внешнего источника оптической накачки и резонансно передает ее в ЛПК, которые выступают в роли резонатора. С другой стороны, активная среда может возбуждаться от действия ЛПК и излучать свет в окружающее пространство — возникает механизм обратной связи. При интенсивных локальных полях ЛПК эта связь становится положительной, возникает режим генерации ЛПК и когерентное состояние спазерного излучения (спазерная генерация).

Однако аналогия спазера с лазером неполная, так как в наночастице могут возбуждаться ЛПК, не приводящие к излучению (неизлучающие тёмные моды). В общем случае и излучающие, и тёмные моды могут возбуждаться одновременно [5]. Излучающая мода имеет большое сечение и малую добротность, а тёмные моды всегда связаны с большой добротностью. Селекция тёмных мод теоретически описана в [6]. Тёмные моды идеального спазера не могут быть возбуждены или наблюдаемы из дальней зоны. При этом энергия, накопленная в квазистатическом электрическом поле поверхностного плазмона, может использоваться в нанотехнологических приложениях, например, для модификации, для зондирования и как ближнепольный нелинейно-оптический пробник.

Совместно с медицинским университетом Арканзаса, Арканзасским наномедицинским центром Института рака Рокфеллера нами была получена генерация спазеров, внедрённых в биологическую раковую клетку (рак предстательной железы, рак молочной железы). Экспериментально показано, что спазеры являются беспрецедентными тераностик-агентами для опухолевых клеток [2]. Спазеры, адресно доставленные с помощью присоединения к их поверхности фолиевой кислоты к раковым клеткам, захватываются ими в процессе эндоцитоза. После этого путём засветки лазером накачки локализуется свечение спазеров

как оптических меток. По необходимости при увеличении интенсивности накачки раковые клетки уничтожаются.

Дальнейшая работа в этом направлении связана с совершенствованием способов транспорта спазеров, а также с продвижением спектра спазерной генерации в инфракрасную область (0,9–1 мкм), где у биологических тканей находится окно прозрачности. В этом направлении нами были получены первые экспериментальные результаты по генерации спазеров на наноцилиндрах [7].

**Липосомы.** На протяжении последних 30 лет липосомы находят всё большее признание в мире как перспективные средства доставки лекарственных веществ. Так, согласно результатам многих клинических испытаний лекарства, вводимые в организм в составе липосом, более эффективны и менее токсичны, чем используемые в свободном виде. Наиболее широкое применение они получили в экспериментальной онкологии.

В середине 60-х годов XX века английский учёный А. Бэнгхем изучал структуру коллоидных дисперсий, образующихся при набухании фосфолипидов в избытке воды. На электронных микрофотографиях [8] были обнаружены слоистые частицы, очень похожие на мембранные структуры клетки, которые впоследствии были им названы липосомами. Липосомы представляют собой пузырьки воды, окружённые одним или несколькими слоями липидов. Свойства липосом и их поведение определяются прежде всего наличием у них замкнутой двойной оболочки, состоящей из таких же природных фосфолипидов, что и клеточные мембраны. Молекулы фосфолипидов имеют полярную «головку», обладающую высокой гидрофильностью (средство с водой), и липофильные фрагменты жирных кислот (липофильный «хвост»). Полярные головки молекул фосфолипидов направлены к водному раствору, в то время как липофильные хвосты направлены внутрь мембраны. Таким образом, формируется двойной слой молекул — бислоем. Фосфолипидный бислоем представляет собой термодинамически наиболее выгодную форму.

Несмотря на очень малую молекулярную толщину (около 4 нм), оболочка отличается исключительной механической прочностью и гибкостью.

В зависимости от размера частиц и числа образующих их липидных слоёв различают следующие липосомы:

- 1) моноламеллярные, с одиночным липидным бислоем (диаметр 20–200 нм и выше);
- 2) мультиламеллярные, насчитывающие до нескольких десятков и даже сотен липидных бислоёв (диаметр до 5000–10000 нм).

Во внутренний объём липосомы можно включать водорастворимые лекарства. Жирорастворимые лекарства могут проникать между липидными слоями. Это создаёт возможность практического применения липосомы в качестве средства доставки разных веществ в определённые органы и ткани. По своему химическому составу липосомы имеют сходство с природными мембранами клеток, с чем связана их способность проникать в биоорганизм. Доставка лекарственного вещества в клетки происходит либо путём слияния липосом с их мембраной, либо за счёт эндоцитоза (проникновения в клетку). Важная особенность для практического применения — это пассивное нацеливание — процесс, при котором липосомы благодаря своим физическим свойствам взаимодействуют только с определёнными анатомическими структурами сосудов ткани-мишени. Например, из-за дефектности опухолевых сосудов загруженные препаратом липосомы избирательно накапливаются в опухоли [9]. Кроме того, модифицируя мембрану липосом молекулами, обеспечивающими «узнавание» клетки или органа-мишени, можно осуществлять направленную транспортировку лекарств.

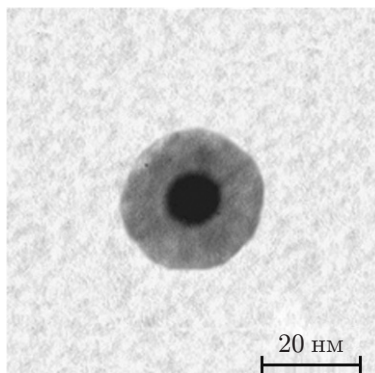


Рис. 1. Электронная микрофотография спазера

Тем не менее даже липосомы недостаточно стабильны в крови и тканях. Однако важность применения стимулировала поиск возможностей преодоления такой нестабильности. Проблема была решена с помощью ковалентно связанного синтетического полимера полиэтиленгликоля, который был настолько эффективным, что такие липосомы получили образное название «липосомы-невидимки» (stealth liposomes) [10]. Но, что более важно, такие липосомы постепенно накапливались в тех местах, где кровеносные сосуды были фенестрированы, т. е. обладали повышенной проницаемостью или вообще были плохо развиты, что обычно характерно для опухолей и окружающих их тканей, а также при инфекционных и воспалительных процессах.

**Приготовление липосом.** Липосомы (в нашем случае многослойные везикулы) были приготовлены по протоколу, близкому к описанному в [11, 12]. Изначально брался сухой порошок синтетических фосфолипидов DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, Avanti Polar Lipids, Inc.) и смешивался с предварительно приготовленным раствором спазеров и красителя в дистиллированной воде. Молярное соотношение липида и спазеров составляло приблизительно 40/1. Для формирования везикул к получившейся смеси добавляли небольшое количество воды, тщательно перемешивали её на миксере VORTEX и держали на водяной бане 5 ч при температуре 70 °С. Затем в целях очистки образца от спазеров, не зашедших внутрь сформированных везикул и красителя уранина, находящегося в растворе, провели несколько циклов промывки образца. Цикл состоял в добавлении воды в образец, взбалтывании его на VORTEX и отделении воды, содержащей не зашедшие внутрь везикул спазеры и краситель, с помощью центрифугирования.

**Результаты инкапсулирования.** Спазеры, физически представляющие собой комплекс металлического ядра, пористой оболочки и молекул красителя, были приготовлены способом, описанным в [2]. На рис. 1 приведена типичная электронная микрофотография комплекса. В центре находится золотое ядро, окружённое кремнезёмной оболочкой с внешним диаметром приблизительно 22 нм.

Кремнезёмная оболочка насыщается раствором флуоресцирующего красителя уранина с концентрацией  $10^{-2}$  моль/л, который играет роль активной среды спазера. Уранин является аналогом широко распространённого красителя флуоресцеина, но в отличие от последнего хорошо растворим в воде и не цитотоксичен.

На рис. 2, а показана микрофотография приготовленной суспензии липосом в растворе красителя без спазеров, которая помещалась между двумя покровными стёклами в микроскоп Carl Zeiss LSM 710 в режиме «тёмного поля» (т. е. изображение формировалось только светом, рассеянным от объекта). Образец освещался линией G ртутного источника (436 нм) или лазером (488 нм), а изображения в микроскопическом и конфокальном

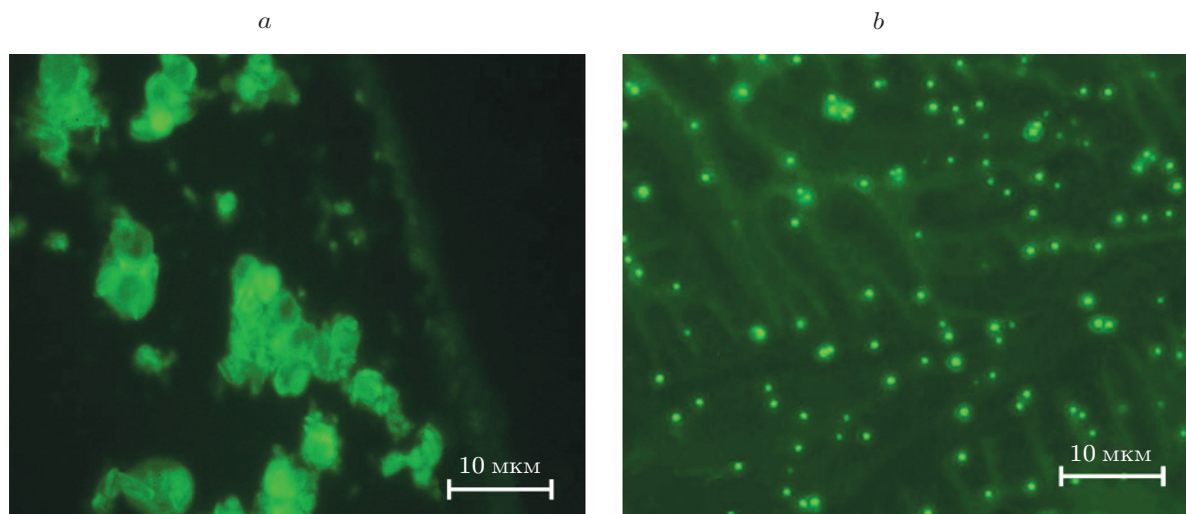


Рис. 2. Микрофотографии изучаемых объектов: липосомы (*a*) и эмиссия спазеров до инкапсулирования (*b*)

режимах фиксировались на длине волны люминесценции красителя (500–540 нм). Для наших модельных экспериментов не требовалось проводить селекцию липосом по размерам путём фильтрации и другими методами.

На рис. 2, *b* приведена эмиссия спазеров до инкапсулирования в липосомы. Накачка осуществлялась параметрическим генератором Solar LP601 на длине волны 488 нм.

Спазеры инкапсулировались в липосомы описанным методом пассивной загрузки в процессе приготовления липосом.

Для подтверждения локализации спазеров внутри замкнутого объёма липосом использовалось высокое пространственное разрешение конфокального микроскопа. В режиме конфокального сканирования микроскоп Carl Zeiss LSM 710 отображает объекты, находящиеся на одном пространственном уровне в слое толщиной 200–300 нм. На рис. 3 показано одно из изображений сканирования липосом с инкапсулированными спазерами. На микрофотографии видно, что содержимое липосом находится в плоскости поперечного сечения оболочки липосом. На изображениях других сечений стенки липосом видны, а спазеры отсутствуют. Таким образом, применение конфокального микроскопа позволило убедиться, что спазеры находились внутри липосом.

На рис. 4 представлена микрофотография липосомы с находящимся внутри неё эмитирующим спазером (яркое пятно круглой формы). При повышении мощности излучения осветителя интенсивность эмиссии спазеров перекрывала свечение липосом, вызванное люминесценцией остаточного свободного красителя, что показывало работоспособность спазеров.

Следует отметить, что в случаях когда эмитирующий спазер попадал в начало сканируемой картины, его свечение было еще более интенсивным, чем на рис. 4, по сравнению с люминесценцией остаточного красителя в липосомах. Но свечение быстро, за время, сравнимое с длительностью сканирования кадра, ослаблялось. Это обусловлено деструкцией (выгоранием) красителя в условиях непрерывного освещения излучением повышенной интенсивности (излучение подсветки сфокусировано). Для ускоренной регистрации эмиссии спазеров представляют интерес быстродействующие многоканальные конфокальные микроскопы, использующие при сканировании образца матрицу освещающих пучков [13].

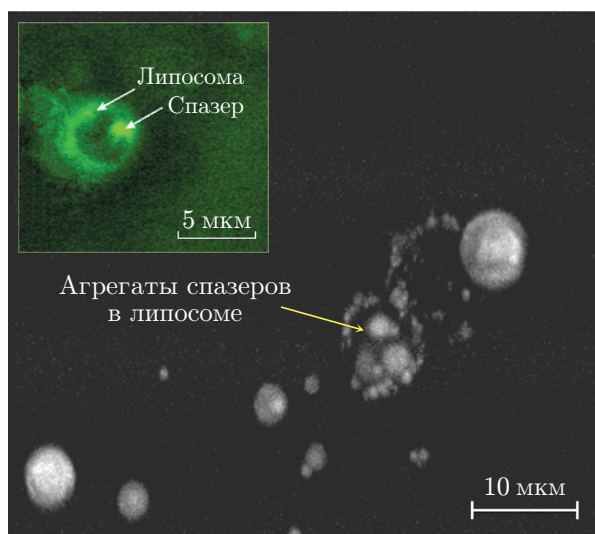


Рис. 3. Конфокальная микроскопия липосом (окружности — стенки липосом) с инкапсулированными спазерами (светлые пятна). На вставке приведена микрофотография, полученная на люминесцентном микроскопе

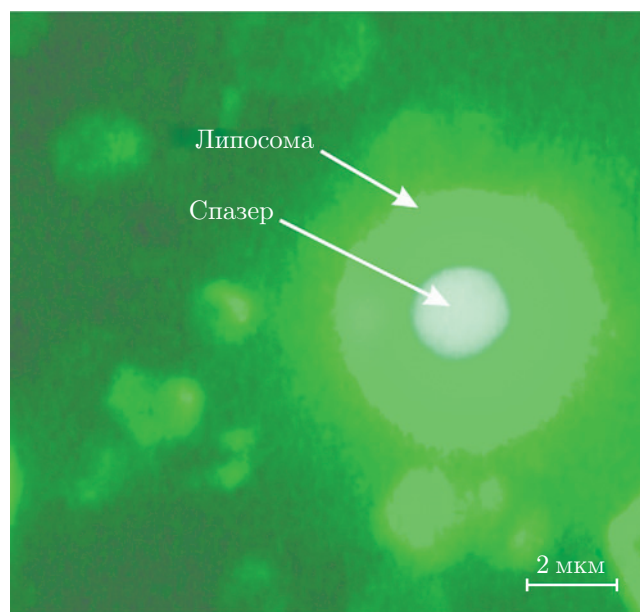


Рис. 4. Микрофотография липосомы с инкапсулированным эмитирующим спазером

**Заключение.** Таким образом, спазеры диаметром 22 нм, изготовленные согласно методу, описанному в [2], были инкапсулированы в липосомы методом пассивной загрузки. Нахождение спазеров внутри липосом было подтверждено с помощью конфокальной микроскопии. При этом спазеры сохраняли свою работоспособность внутри липосом. Проведённый модельный эксперимент по созданию комплекса, включающего в себя спазер и средство его доставки (липосома) внутрь биологических клеток, позволит реализовать все преимущества спазеров как агентов терапии.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность В. В. Вилейко и А. А. Школдиной за помощь в проведении измерений на конфокальном микроскопе. При выполнении работы использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Высокоразрешающая спектроскопия газов и конденсированных сред» в Институте автоматизации и электрометрии СО РАН.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект П.10.2.1, государственная регистрация № АААА-А17-117060810014-9; проект П.10.2.3, государственная регистрация № АААА-А17-117052410033-9).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Bergman D. J., Stockman M. I.** Surface plasmon amplification by stimulated emission of radiation: quantum generation of coherent surface plasmons in nanosystems // *Phys. Rev. Lett.* **90**, N 2. P. 027402-1–027402-4. DOI: 10.1103/PhysRevLett.90.027402.
2. **Galanzha E. I., Weingold R., Nedosekin D. A. et al.** Spaser as a biological probe // *Nature Commun.* 2017. **8**. 1552. DOI: 10.1038/ncomms15528.
3. **Lepeshkin S., Baturin V., Tikhonov E. et al.** Super-oxidation of silicon nanoclusters: magnetism and reactive oxygen species at the surface // *Nanoscale.* 2016. **8**, N 44. P. 18616–18620.
4. **Юкина Г. Ю., Журавский С. Г., Паневин А. А. и др.** Взаимодействие тканевых макрофагов и тучных клеток как начало органного ремоделирования в рамках хронической токсичности наночастиц кремнезёма // *Трансляционная медицина.* 2016. **3**, № 2. С. 70–79.
5. **Stockman M. I., Faleev S. V., Bergman D. J.** Localization versus delocalization of surface plasmons in nanosystems: can one state have both characteristics // *Phys. Rev. Lett.* 2001. **87**, N 16. P. 167401.
6. **Li D. B., Ning C. Z.** Interplay of various loss mechanisms and ultimate size limit of a surface plasmon polariton semiconductor nanolaser // *Opt. Express.* 2012. **20**, N 15. P. 16348–16357.
7. **Plekhanov A. I.** Spaser as novel versatile biomedical tool // *Technical Digest of the VII Intern. Symposium “Modern Problems of Laser Physics” (MPLP 2016).* Novosibirsk, Russia, Aug. 22–28, 2016. P. 71.
8. **Bangham A. D.** Liposomes: realizing their promise // *Hospital Practice.* 1992. **27**, N 12. P. 51–62.
9. **Aizik G., Waiskopf N., Agbaria M. et al.** Liposomes of quantum dots configured for passive and active delivery to tumor tissue // *Nano Lett.* 2019. **19**, N 9. P. 5844–5852.
10. **Sahil K., Premjeet S., Ajay B. et al.** Stealth liposomes: a review // *IJRAP.* 2011. **2**, N 5. P. 1534–1538.
11. **Surovtsev N. V., Salnikov E. S., Malinovsky V. K. et al.** On the low-temperature onset of molecular flexibility in lipid bilayers seen by Raman scattering // *Journ. Phys. Chem. B.* 2008. **112**, N 39. P. 12361–12365. DOI: 10.1021/jp801575d.

12. **Adichtchev S. V., Surovtsev N. V.** Raman spectroscopy for quantification of water-to lipid ratio in phospholipid suspensions // *Vibrational Spectroscopy*. 2018. **97**, N 102. P. 102–105. DOI: 10.1016/j.vibspec.2018.06.004.
13. **Бессмельцев В. П., Максимов М. В., Вилейко В. В. и др.** Многоканальный конфокальный микроскоп на основе дифракционного фокусирующего мультипликатора с автосинхронизацией развёртки // *Автометрия*. 2018. **54**, № 6. С. 3–11. DOI: 10.15372/AUT20180601.

*Поступила в редакцию 16.10.2019*

*После доработки 19.12.2019*

*Принята к публикации 10.01.2020*

---