

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

MARIJA MATULIONYTĖ

FOTOLIUMINESCUOJANČIŲ AUKSO NANOKLASTERIŲ  
STRUKTŪROS, SPEKTRINIŲ SAVYBIŲ BEI  
POVEIKIO VĖŽINĖMS LĄSTELĖMS TYRIMAI

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, fizika (02 P)

Vilnius, 2017

Disertacija rengta 2012 – 2016 m. Vilniaus universitete.

Eksperimentiniai darbai atlikti Nacionalinio vėžio instituto (buvusio Vilniaus universiteto Onkologijos instituto) Biomedicininės fizikos laboratorijoje.

Mokslinis vadovas:

Prof. habil. dr. Ričardas Rotomskis (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02 P).

## **Padėka**

Pirmiausiai norėčiau padėkoti savo mokslinio darbo vadovui, prof. Ričardui Rotomskiui, už žinias ir konstruktyvias diskusijas, padėjusias ugdyti kritinį mąstymą dar bakalauro studijų metais. Taip pat už paskatinimą siekti geriausių rezultatų bei už vertingas pastabas rengiant disertacijos darbą.

Dėkoju VU Fizikos fakulteto Kvantinės elektronikos katedros kolektyvui už pagalbą ir patarimus.

Dėkoju Dominykai Dapkutei, Gretai Jarockytei ir Laimai Budėnaitei už pagalbą atliekant eksperimentus su ląstelėmis.

Esu be galo dėkinga visam Biomedicininės fizikos laboratorijos kolektyvui už naudingas mokslines diskusijas, gyvenimiškus patarimus, nuoširdų palaikymą ir rūpestį bei nuotaikingą darbo atmosferą. Ypač esu dėkinga Viliui Poderiui už konsultacijas ir bendradarbiavimą.

Noriu labai padėkoti savo Tėvams už palaikymą ir supratimą ilgais studijų metais, visiems artimiesiems ir draugams už paramą ir kantrybę.

## Sutartiniai žymėjimai

- ADF – aktyvios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species (ROS)*)
- AJM – atomo jėgos mikroskopija
- Au NK – aukso nanoklasteris
- Au ND – aukso nanodalelė
- DHLR – dihidrolipoinė rūgštis
- DMEM – Dulbecco modifikuota ląstelių augimo terpė (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DMF – dimetilo formamidas
- DNR – deoksiribonukleorūgštis
- DPA – D-penicilaminas
- DPBS – Dulbecco fosfato buferinis druskos tirpalas (angl. *Dulbecco's phosphate buffered saline*)
- FL – fluorescencija/fotoluminescencija
- FR – folio rūgštis
- HOMO – aukščiausia užpildyta molekulinė orbitalė (angl. *highest occupied molecular orbital*)
- JSA – jaučio serumo albuminas
- KN – kvantinis našumas
- KT – kvantinis taškas
- LPPR – lokalizuotas paviršiaus plazmonų rezonansas
- LUMO – žemiausia neužpildyta molekulinė orbitalė (angl. *lowest unoccupied molecular orbital*)
- MES – 2-(N-morfolino) etansulfoninė rūgštis
- PAMAM dendrimerai – poli(amidamino) dendrimerai
- PBS – fosfato buferinis druskos tirpalas (angl. *phosphate buffered saline*)
- PPR – paviršiaus plazmonų rezonansas
- PEG – polietileno glikolis
- TBHP – *tetr*-butil hidroperoksidas
- UV/ Vis/ NIR – ultravioletinė/ regimoji/ artimoji infraraudonoji spinduliuotė



## Turinys

Padėka .....	3
Sutartiniai žymėjimai .....	4
1. ĮVADAS .....	8
1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai .....	9
1.2. Aktualumas ir naujumas.....	10
1.3. Ginamieji teiginiai.....	13
1.4. Autorės indėlis .....	14
1.5. Publikacijų sąrašas .....	15
2. LITERATŪROS APŽVALGA .....	18
2.1. Fotoluminescuojančių aukso nanoklasterių sintezės metodai .....	19
2.2. Optinės aukso nanodalelių savybės .....	24
2.2.1. Paviršiaus plazmonų rezonansas .....	25
2.2.2. Aukso nanoklasterių fotoluminescencija .....	27
2.3. Aukso nanoklasterių struktūra. Magiškieji skaičiai.....	34
2.4. Aukso nanoklasterių fotostabilumas .....	38
2.5. Aukso nanodalelių aktyvių deguonies formų generacija veikiant UV/Vis spinduliuote.....	41
2.6. Nanodarinių biologinis suderinamumas .....	43
2.6.1. Nanodalelių charakteristikos, lemiančios susikaupimą ląstelėse .....	44
2.6.2. Nanotoksiškumas.....	48
2.6.3. Nanodarinių įtaka aktyvių deguonies formų generacijai ląstelėse ....	50
3. METODAI IR MEDŽIAGOS .....	51
3.1. Aukso nanoklasterių sintezė.....	51
3.1.1. Au-JSA NK sintezė .....	51

3.1.2. Au-MES NK sintezė.....	52
3.2. Spektroskopiniai matavimai.....	53
3.3. Fotostabilumo matavimai.....	53
3.4. Aukso nanoklasterių dydžio matavimai.....	54
3.4.1. Hidrodinaminio dydžio matavimai.....	54
3.4.2. Atomo jėgos mikroskopijos matavimai.....	55
3.4.3. Elektronų pralaidumo mikroskopijos matavimai .....	55
3.5. Ląstelių kultivavimas .....	56
3.6. Ląstelių inkubavimas nanodalelėmis .....	56
3.7. Ląstelių vaizdinimas fluorescenciniu konfokaliniu mikroskopu .....	57
3.8. Ląstelių gyvybingumo tyrimai .....	57
3.9. Aukso nanoklasterių susikaupimo bei poveikio aktyvių deguonies formų generacijai ląstelėse tyrimai.....	58
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	60
4.1. Aukso nanoklasterių optinės savybės .....	60
4.1.1. Au-JSA NK optinės savybės .....	60
4.1.2. Au-MES NK optinės savybės.....	61
4.2. Aukso nanoklasterių dydžio matavimai.....	62
4.2.1. Au-JSA NK dydžio matavimai.....	62
4.2.2. Au-MES NK dydžio matavimai .....	65
4.3. Aukso nanoklasterių fotostabilumo tyrimai.....	66
4.3.1. Au-JSA NK fotostabilumas .....	66
4.3.2. Au-MES NK fotostabilumas .....	71
4.4. Aukso nanoklasterių susikaupimo ląstelėse tyrimai .....	76
4.4.1. Au-JSA NK susikaupimas ląstelėse .....	76

4.4.2. Au-MES NK susikaupimas ląstelėse.....	80
4.5. Aukso nanoklasterių poveikio ląstelių gyvybingumui tyrimai .....	82
4.6. Aktyvių deguonies formų generacija ląstelėse .....	83
5. IŠVADOS.....	86
6. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	87

## 1. ĮVADAS

Onkologiniai susirgimai – dažniausia mirties priežastis ekonomiškai išsivysčiusiose šalyse bei pasauliniu mastu. Pasaulinės sveikatos organizacijos (angl. *World Health Organization*) statistikos duomenimis, 2012 metais pasaulyje diagnozuota ~14 mln. naujų vėžinių susirgimų atvejų. Prognozuojama, kad per artimiausius dvidešimt metų šis skaičius išaugs dar 70 % – t.y. kasmet bus diagnozuojama ~25 mln. naujų atvejų [1]. Mažėjant vidutiniam onkologinių pacientų amžiui, stipriai išauga vėžinių susirgimų keliami ekonominė našta valstybėms. Siekiant padidinti pacientų išgyvenamumo rodiklius bei pagerinti jų gyvenimo kokybę būtina tobulinti ankstyvos diagnostikos metodus ir ieškoti efektyvesnių terapijos būdų.

Viena iš geriausiai vertinamų ateities biomedicinos technologijų, nanomedicina, pasitelkia itin mažo dydžio ir unikalių savybių nanodaleles ankstyvų stadijų onkologinių susirgimų diagnostikai bei terapijai. Mažo dydžio, biosuderinamos, fotostabilumu bei unikaliomis optinėmis ir magnetinėmis savybėmis pasižymintys nanodalelės yra potencialūs kontrastiniai žymenys, vaistų nešikliai bei terapinės medžiagos biomedicinoje [2, 3]. Pastaruoju metu dėl mažo toksiškumo bei palyginti lengvai modifikuojamo paviršiaus sudarant jungtis su antikūnais, biožymenimis bei funkcinėmis molekulėmis ypač daug dėmesio susilaukė tauriųjų metalų (aukso, sidabro) nanodalelės [4]. Aukso nanodalelės gali būti taikomos kaip rentgenografiniai žymenys diagnostikoje bei vaizdinime, kaip termopažaidas sukelti medžiagos onkologinių ligų termoterapijoje [2, 5].

Fotoluminescuojantys molekuliniai aukso ir sidabro nanoklasteriai – nauja klasė koloidinių fotoluminescuojančių nanodarinių [6], ypač patrauklių biomedicinei terapijai ir diagnostikai bei biologiniams tyrimams [7, 8].

Biomedicininės diagnostikos ir terapijos srityje ypač svarbios nanodalelių optinės bei erdvinės savybės, sąveika su gyvu organizmu – nuo to priklauso nanodalelių kaip diagnostinių ir terapinių medžiagų efektyvumas bei pritaikymo biomedicinoje praktikoje galimybės.

Visgi, nepaisant didelės pažangos Au nanodalelių sintezės srityje, molekulių fotoluminescuojančių Au nanoklasterių fotostabilumas bei sąveikos su ląstelėmis mechanizmai nėra išsamiai ištirti.

### **1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai**

#### Darbo tikslas:

Ištirti fotoluminescuojančių Au-MES bei Au-JSA nanoklasterių pritaikymo fluorescencinei vėžio diagnostikai galimybes.

#### Uždaviniai:

1. Ištirti Au-MES bei Au-JSA nanoklasterių struktūrą bei spektrines savybes.
2. Ištirti Au-MES bei Au-JSA nanoklasterių stabilumą švitinant UV/Vis spinduliuote.
3. Palyginti Au-MES bei Au-JSA nanoklasterių susikaupimą krūties vėžinėse ląstelėse.
4. Palyginti Au-MES bei Au-JSA nanoklasterių poveikį krūties vėžinių ląstelių gyvybingumui.
5. Palyginti Au-MES bei Au-JSA nanoklasterių poveikį krūties vėžinių ląstelių reaktyvių deguonies formų generacijai.

## 1.2. Aktualumas ir naujumas

Kasmet sparčiai augantis naujų onkologinių susirgimų skaičius tiek Lietuvoje, tiek visame pasaulyje skatina įvairių sričių mokslininkus susivienyti bendram tikslui: ieškoma naujų efektyvesnių ankstyvos onkologinių ligų diagnostikos priemonių.

Vis daugiau biomedicinos diagnostikos technologijų pasitelkia optinę diagnostiką. Optinės diagnostikos technologijos plačiai taikomos biomedicinoje atliekant tyrimus spektroskopiniais, tėkmės citometrijos, klinikinės chemijos, imunologiniais metodais bei naudojant įvairius biojutiklius, taip pat chirurgijoje [9-13]. Tokių technologijų pagrindas – fluorescenciniai žymenys.

Mažos molekulinės masės fluorescuojančios organinės molekulės buvo pirmieji ir plačiausiai fluorescencinėje diagnostikoje taikomi žymenys. Jie pasižymi dideliu kvantiniu našumu bei yra lengvai konjuguojami su specifinėmis molekulėmis, taip pat – pigūs [14]. Visgi, nors organiniai fluorescenciniai žymenys vis dar plačiai naudojami biomolekulėms vaizdinti, jų taikymą audinių vaizdinimui *in vivo* ir tolimesniuose klinikiniuose tyrimuose riboja prastas fotostabilumas [15, 16].

Fotostabilumas – vienas pagrindinių kokybinių fluorescencinių žymenų parametrų, kadangi UV/Vis spinduliuotė yra naudojama sužadinti žymenų fluorescencijai. Net ir mažo intensyvumo nuolatinė spinduliuotė gali turėti įtakos fluorescencijos blyškimui (angl. *photo-bleaching*) bei fluorescencinio žymens irimui (angl. *photo-degradation*), o pastarasis gali turėti lemiamos įtakos fluorescuojančių žymenų toksiškumui. Ieškant naujų, geresnėmis optinėmis savybėmis pasižyminčių fluorescencinių žymenų, mokslininkų ir medikų dėmesys nukrypo į pastarąjį dešimtmetį itin sparčiai besivystančias nanotechnologijas. Itin mažo dydžio ir unikaliomis savybėmis pasižyminčios nanodalelės skinasi kelią į biomediciną [2, 17]. Jau kurį laiką intensyviai tyrinėjamos fotoluminescuojančios puslaidininkinės nanodalelės – kvantiniai taškai – fotoluminescencijos kvantiniu našumu neatsilieka, o fotostabilumu ženkliai lenkia organinius fluo-

rescencinius žymenis [18], tačiau šios puslaidininkinės nanodalelės yra sudarytos iš toksinių cheminių elementų, o dėl stabilizuojančių sluoksnių bei sąveikos su kraujo plazmos baltymais išaugęs nanodalelių dydis apsunkina jų pasišalinimą iš organizmo per inkstų kanalus [19]. Todėl ankstyvaisiais 2000 metais susintetinus pirmuosius vandenyje tirpius fotoluminescuojančius tauriųjų metalų nanoklasterius [6], visų mokslininkų dėmesys nukrypo į juos.

Fotoluminescuojantys, į molekulių panašiomis savybėmis pasižymintys aukso ir sidabro nanoklasteriai yra nauja klasė koloidinių fotoluminescuojančių nanodarinių, ypač patrauklių medicininei terapijai ir diagnostikai bei biologiniams tyrimams [7, 8]. Efektyviam fotoluminescuojančių Au NK taikymui fluorescenciniam vaizdinimui labai svarbus jų optinių savybių stabilumas. Fotoluminescuojantys Au NK dažnai minimi kaip nanodariniai, pasižymintys dideliu stabilumu, tačiau duomenų apie Au NK fotostabilumą nėra daug [20-25]. Literatūroje yra parodyta, jog fotoluminescuojantys Au NK gali pasižymėti fotostabilumu, juos švitinant UV/Vis spinduliuote [20-22], tačiau yra duomenų ir apie Au NK, kurie, veikiami UV/Vis spinduliuote, blykšta [23-25]. Visgi dauguma autorių, pateikdami fotostabilumo tyrimų duomenys, pateikia tik FL intensyvumą, nenagrinėdami spektro formos pokyčių, taip išvengdami diskusijų dėl šviesos poveikio nanoklasterio paviršiaus dangalui ar net pačiam nanoklasterio dydžiui, taigi Au NK fotostabilumas bei galimi jo mechanizmai nėra išsamiai ištirti.

Nepaisant itin didelio susidomėjimo Au NK pritaikymu biomedicinoje, fotoluminescuojančių Au NK susikaupimas ląstelėse bei poveikis jų gyvybiniam procesams nėra išsamiai ištirtas. Tuo tarpu literatūros duomenys yra gana kontroversiški, rodantys, jog didelių aukso nanodalelių susikaupimas ir pasiskirstymas ląstelėse bei toksinis poveikis labai priklauso nuo nanodalelių dydžio, paviršiaus dangalo molekulių, krūvio ir t.t. [26, 27]. Todėl norint Au NK taikyti biomedicinoje labai svarbu įvertinti jų biosuderinamumą ir toksiškumą.

Šiame darbe pirmą kartą ištirtas fotoluminescuojančių jaučio serumo albumino baltyme susintetintų aukso nanoklasterių bei 2-(N-morfolino) etanesulfonine

rūgštimi dengtų fotoluminescuojančių aukso nanoklasterių fotostabilumas, palygintas šių fotoluminescuojančių aukso nanoklasterių susikaupimas dviejose skirtingo piktybiškumo bei invazyvumo krūties vėžio ląstelėse (MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių linijose), ištirtas jų poveikis šių ląstelių gyvybingumui bei aukso nanoklasterių indukuota aktyvių deguonies formų generacija ląstelėse.



### 1.3. Ginamieji teiginiai

1. Atlikus aukso nanoklasterių spektrinių charakteristikų bei erdvinių savybių matavimus bei pasitelkus laisvųjų elektronų dujų modelį nustatyta, kad fotoluminescuojančių jaučio serumo albumine (JSA) susintetintų aukso nanoklasterių skersmuo yra ne didesnis nei 1,3 nm, ir jį sudaro vidutiniškai 29 aukso atomai, tuo tarpu 2-(N-morfolino) etanesulfonine rūgštimi (MES) dengti fotoluminescuojantys aukso nanoklasteriai yra ne didesni nei 0,5 nm, ir sudaryti iš vidutiniškai 9 aukso atomų.
2. UV/mėlynos šviesos poveikyje keičiasi Au-JSA NK bei Au-MES NK spektrinės savybės, kurios rodo, kad šviesos poveikyje fotoluminescuojantys Au NK yra. Au-JSA NK irimas priklauso nuo švitinimo bangos ilgio: kai  $\lambda = 405$  nm, prarandami 1-2 aukso atomai, kai  $\lambda = 280$  nm – 3-4 atomai; veikiant  $\lambda = 402$  nm spinduliuote, Au-MES NK dydis sumažėja 1-2 atomais.
3. Fotoluminescuojantys Au-JSA NK ir Au-MES NK kaupiasi ląstelėse: mažesnio dydžio Au-MES NK vėžinėse ląstelėse pasiskirsto difuziškai citoplazmoje ir ląstelių branduoliuose, tuo tarpu Au-JSA NK lokalizuoti pūslelių tipo dariniuose ląstelių citoplazmoje ir nepatenka į branduolius.
4. 24 val. inkubacija Au-JSA NK neturi įtakos vėžinių ląstelių gyvybingumui, tuo tarpu Au-MES NK pasižymi nuo inkubacijos trukmės priklausomu toksiškumu vėžinėms ląstelėms.
5. Au-MES NK inkubuotose vėžinėse ląstelėse išauga aktyvių deguonies formų generacija, tuo tarpu Au-JSA NK nesukėlė aktyvių deguonies formų generacijos pokyčio MDA-MB-231 ląstelėse.

#### 1.4. Autorės indėlis

Disertacijoje aprašyti eksperimentai atlikti Nacionalinio vėžio instituto (buvusio Vilniaus universiteto Onkologijos instituto) Biomedicininės fizikos laboratorijoje.

Darbo vadovas prof. habil. dr. Ričardas Rotomskis suformulavo eksperimentinių tyrimų kryptis, konsultavo interpretuojant rezultatus, dalyvavo rengiant mokslines publikacijas ir medžiagą konferencijoms.

Pagrindiniai publikacijų bendraautoriai yra prof. habil. dr. Ričardas Rotomskis, Vilius Poderys.

Studentė Raminta Marcinonytė dalyvavo atliekant Au-MES NK fotostabilumo tyrimus.

Vilius Poderys ir studentas Dainius Rupšys dalyvavo atliekant Au-JSA NK fotostabilumo tyrimus.

Studentės Greta Jarockytė, Laima Budėnaitė ir Dominyka Dapkutė dalyvavo atliekant Au NK susikaupimo ląstelėse, citotoksiškumo bei aktyvių deguonies formų generacijos tyrimus *in vitro*.

Elektronų pralaidumo mikroskopijos užsakomieji tyrimai atlikti Chemijos instituto Elektroninės mikroskopijos, Rentgeno spindulių difraktometrijos ir spektrometrijos atviros prieigos centre.

Autorė planavo tyrimus, atliko Au NK sintezę, spektroskopinius nanodalelių charakterizavimo bei fotostabilumo tyrimus, dalelių dydžio matavimus, susikaupimo ląstelėse mikroskopijos vaizdinimą, taip pat analizavo, apdorojo ir interpretavo visus gautus rezultatus, juos pristatė mokslinėse konferencijose bei jų pagrindu su bendraautoriais parengė publikacijas.

## 1.5. Publikacijų sąrašas

### Publikacijos disertacijos tema, įrašytos į Thomson Reuters Web of Science duomenų bazę:

1. M. Matulionyte, L. Budenaite, G. Jarockyte, D. Dapkute, R. Rotomskis. Photoluminescent gold nanoclusters in cancer cells: cellular uptake, toxicity and generation of reactive oxygen species. *International Journal of Molecular Sciences*. (Recenzuojamas)
2. V. Poderys, M. Matulionyte-Safine, D. Rupsys, R. Rotomskis. Protein stabilized Au nanoclusters: spectral properties and photostability. *Lithuanian Journal of Physics* **55**(1): 55-65 (2016).
3. M. Matulionyte, R. Marcinonyte, R. Rotomskis. Photoinduced spectral changes of photoluminescent gold nanoclusters. *Journal of Biomedical Optics* **20**(5): 051018 (2015).
4. V. Pašukoniene, A. Mlynska, S. Steponkiene, V. Poderys, M. Matulionyte, V. Karabanovas, U. Statkute, R. Purviniene, J. A. Krasko, A. Jagminas, M. Kurtinaitiene, M. Strioga, R. Rotomskis. Accumulation and biological effects of cobalt ferrite nanoparticles in human pancreatic and ovarian cancer cells, *Medicina-Lithuania* **50**(4): 237-244 (2014).
5. R. Marcinonyte, M. Matulionyte, R. Rotomskis. Stability and photostability of MES capped gold nanoparticles. *Proceedings of 10<sup>th</sup> International Conference and Workshop „Medical Physics in the Baltic states”* **10**: 62-66 (2012).

### Publikacijos ne disertacijos tema, įrašytos į Thomson Reuters Web of Science duomenų bazę:

1. M. Stasys, M. Matulionytė-Safine, J. Venius, R. Rotomskis. Dual imaging tracer Au-BSA-Tc99<sup>m</sup> biodistribution comparison with conventional BSA-Tc99<sup>m</sup> *in vivo*. *Proceedings of 12<sup>th</sup> International Conference and Workshop „Medical Physics in the Baltic states”* **12**: 61-65 (2015).

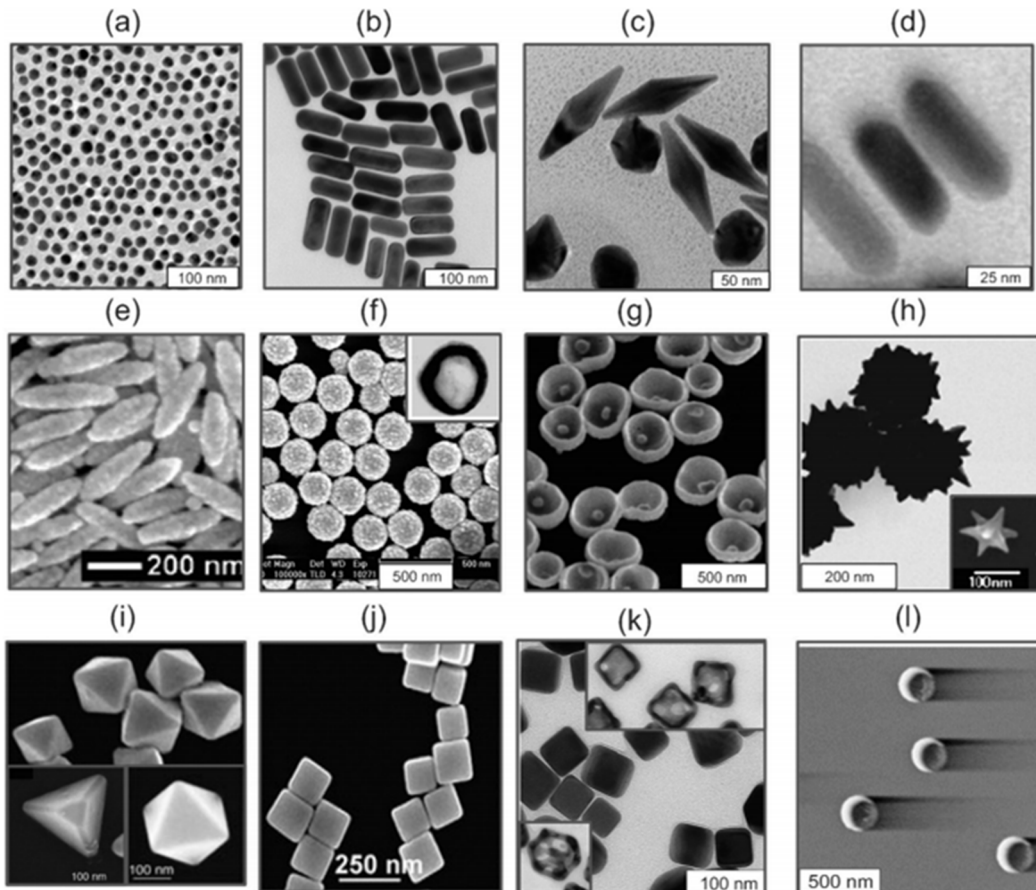
**Pranešimai tarptautinėse ir šalies konferencijose disertacijos tema:**

1. L. Budenaite, M. Matulionyte-Safine, D. Dapkute, R. Rotomskis. Cellular uptake and biological effect of MES- and BSA- coated photoluminescent gold nanoclusters *in vitro*. 59<sup>th</sup> International Conference for Students of Physics and Natural Sciences “Open Readings” 15-18 March, 2016, Vilnius, Lithuania. Abstract book p. 118.
2. L. Budenaite, M. Matulionyte-Safine, D. Dapkute, R. Rotomskis. Cellular uptake and biological effect of photoluminescent gold nanoclusters on cancer cells. International conference “Vita Scientia”, 4 January, 2016, Vilnius, Lithuania. Abstract book p. 30.
3. L. Budenaite, G. Jarockyte, M. Matulionyte-Safine, R. Rotomskis. Intracellular accumulation and cytotoxicity of photoluminescent gold nanoclusters in breast cancer cells. International conference “CTCT-2015: Current Trends in Cancer Theranostics”, 1-3 June, 2015, Jena, Germany. Abstract book p. 70.
4. L. Budenaite, M. Matulionyte-Safine, R. Rotomskis. Cellular uptake and cytotoxicity of photoluminescent Au-MES NCs in MCF-7 cancer cells. 58<sup>th</sup> International Conference for Students of Physics and Natural Sciences “Open Readings”, 24-27 March, 2015, Vilnius, Lithuania. Abstract book p. 257.
5. M. Matulionyte-Safine, G. Jarockyte, L. Budenaite, R. Rotomskis. Cellular uptake and cytotoxicity of photoluminescent BSA- and MES- coated gold nanoclusters. 6<sup>th</sup> International Congress “Nanotechnology in Medicine and Biology BioNanoMed”, 8-10 April, 2015, Graz, Austria. Abstract book p. P6.
6. M. Matulionyte, R. Marcinonyte, R. Rotomskis. Photoinduced spectral changes of photoluminescent gold nanoclusters in aqueous media and *in vitro*. International conference “Laser Application in Life Sciences”, 29 June – 2 July, 2014, Ulm, Germany. Abstract book p. 230.

7. M. Matulionyte, R. Marcinonyte. Photoinduced spectral changes of photoluminescent gold nanoclusters and their accumulation in cancer cells. International conference “Nanotechnology: Research and Development. 15-16 May, 2014, Vilnius, Lithuania. Abstract book p. 92.
8. G. Jarockyte, D. Rupsys, M. Matulionyte, V. Poderys. Photostability of BSA-Au nanoclusters in biological media. International conference “Nanotechnology: Research and Development”, 15-16 May, 2014, Vilnius, Lithuania. Abstract book p. 86.
9. M. Matulionyte, R. Marcinonyte, R. Rotomskis. Photoinduced spectral changes of MES-capped gold nanoparticles. European society for photobiology 2013 congress, 2-6 September, 2013, Liege, Belgium. Abstract book p. 128.
10. M. Matulionyte, R. Marcinonyte, R. Rotomskis. Accumulation of photoluminescent MES-capped gold nanoparticles in MiaPaCa-2 cancer cells. International conference “Biophotonics-Riga 2013”, 26-31 August, 2013, Riga, Latvia. Abstract book p. 38.
11. M. Matulionyte, R. Marcinonyte, R. Rotomskis. Spectral properties and stability of photoluminescent gold-MES nanoparticles. 40<sup>th</sup> Lithuanian National Conference of Physics, June 10-12, 2013, Vilnius Lithuania. Abstract book p. 181.
12. R. Marcinonyte, M. Matulionyte, R. Rotomskis. Dynamics of accumulation of MES capped gold nanoparticles in cancer cells. 56<sup>th</sup> International Conference for Students of Physics and Natural Sciences “Open Readings 2013”, March 20-23, 2013, Vilnius, Lithuania. Abstract book p. 44.
13. M. Matulionyte, R. Rotomskis. Investigation of photophysical properties of gold-protein nanoclusters. International Scientific Conference „The Vital Nature Sign 2012”, Kaunas, Lithuania. Abstract book p. 15.
14. R. Marcinonyte, M. Matulionyte, R. Rotomskis. Stability and photostability of MES capped gold nanoparticles. 10<sup>th</sup> International Conference “Medical Physics in the Baltic States 2012”, Kaunas, Lithuania. Abstract book p. 62-66.

## 2. LITERATŪROS APŽVALGA

Aukso nanodalelių cheminis stabilumas, santykinai didelis biosuderinamumas, nesudėtinga sintezės metodika, derinamos optinės savybės bei lengvai modifikuojamas paviršius sudarant jungtis su antikūnais, biožymenimis bei funkcinėmis molekulėmis leido išsiskleisti mokslininkų fantazijai ir sukurti platų spektrą daugiafunkcinių aukso nanodalelių.



1 pav. Aukso nanodalelių įvairovė. Sferinės aukso nanodalelės (a), aukso nanolazdelės (b), aukso bipiramidės (c), aukso nanolazdelės dengtos sidabro nanokiautu (d), aukso dengti  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  nanoryžiai (e),  $\text{SiO}_2/\text{Au}$  nanokiautai (f), nanodubenėliai (g), spygliuoti  $\text{SiO}_2/\text{Au}$  nanokiautai (h), aukso tetraedrai, oktaedrai ir kubooktaedrai (i), aukso nanokubai (j), sidabro nanokubai ir iš jų gauti aukso-sidabro nanonarveliai (intarpas) (k), aukso nanopjautuvai (l). Adaptuota iš [4].

Keičiant aukso nanodalelių dydį, formą, sudėtį ir struktūrą buvo sukurti nanoklasteriai, fotoluminescuojantys regimojoje bei artimojoje infraraudonojoje

spektrinėse srityse, taip pat plazmonine sugertimi pasižyminčios aukso nanodalelės, kurios gali efektyviai sugerti šviesą ir nespinduliniiais keliais energiją atiduoti aplinkai šilumos pavidalu. Pasirinkus tinkamą struktūrą, aukso nanodalelės gali būti panaudotos ne tik kaip medicininės diagnostikos ir vaizdinimo priemonė, bet ir kaip vaistų nešikliai [28], fototerminiai terapijai skirtos medžiagos [29, 30].

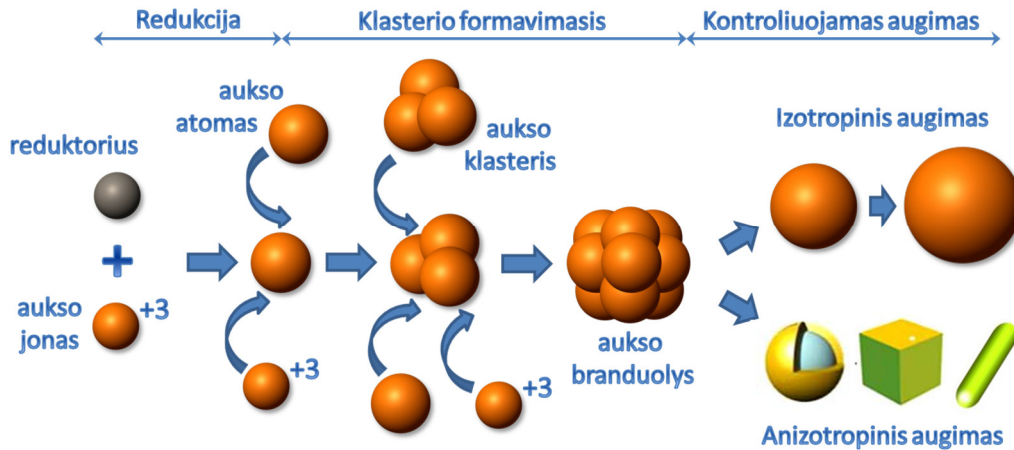
### **2.1. Fotoluminescuojančių aukso nanoklasterių sintezės metodai**

Dekoratyviniais tikslais aukso nanodalelės buvo naudojamos dar antikos laikais: į stiklą pridėjus metalo druskų, jis įgaudavo gražią purpurinę spalvą. Visgi moksliniai aukso nanodalelių tyrimai prasidėjo tik XIX a., kai 1857 m. M. Faradėjus, baltuoju fosforu redukavęs aukso druską, susintetino koloidinį aukso nanodalelių tirpalą. Dabar aukso nanodalelių sintezė – gerai išvystyta nanotechnologijų sritis, pasitelkianti ne tik tokias mokslo šakas kaip chemija ir fizika [31-33], bet ir biologija, kai nanodalelių sintezei naudojami mikroorganizmai, augalai, grybai (žalioji, bio- sintezė) [34-37]. Labiausiai išvystytos didesnių, 5-100 nm dydžio kristalinių aukso nanodalelių sintezės metodikos, o mažesnių nei 2-3 nm dydžio fotoluminescuojančių aukso nanoklasterių sintezė – palyginti nauja sritis, ir jos metodikos dar yra tobulinamos.

Aukso nanoklasteriai gali būti sintetinami naudojant „iš apačios į viršų“ (angl. *bottom up*) arba „iš viršaus žemyn“ (angl. *top down*) metodikas.

Naudojant „iš apačios į viršų“ metodiką, pirmiausia aukso prekursorius (pirmtakas) yra redukuojamas iki aukso atomų. Šiems susiduriant su aukso jonais bei aukso klasteriais, susiformuoja nanoklasterio branduolys, kuris po to yra auginamas (2 pav.). Nanodalelės dydis bei forma po branduolio susidarymo yra kontroliuojami parenkant tinkamas reagentų koncentracijas, sintezės trukmės laiką, temperatūrą, pH bei paviršiaus aktyvias molekules (ligandus). Auginant sferines, nesvarbu, kokio dydžio, nanodaleles, augimas turi būti izotropinis – t.y. vienodai vykti visomis kryptimis. Formuojant įvairių struktūrų nanodaleles, kai siekiama ne sferinės formos, augimas turi būti anizotropinis [35].

Varijuojant sintezės parametrus, susintetinamos skirtingų dydžių ir formų nanodalelės, besiskiriančios sugerties ir fotoluminescencijos spektrų padėtimi, fotoluminescencijos kvantiniu našumu.

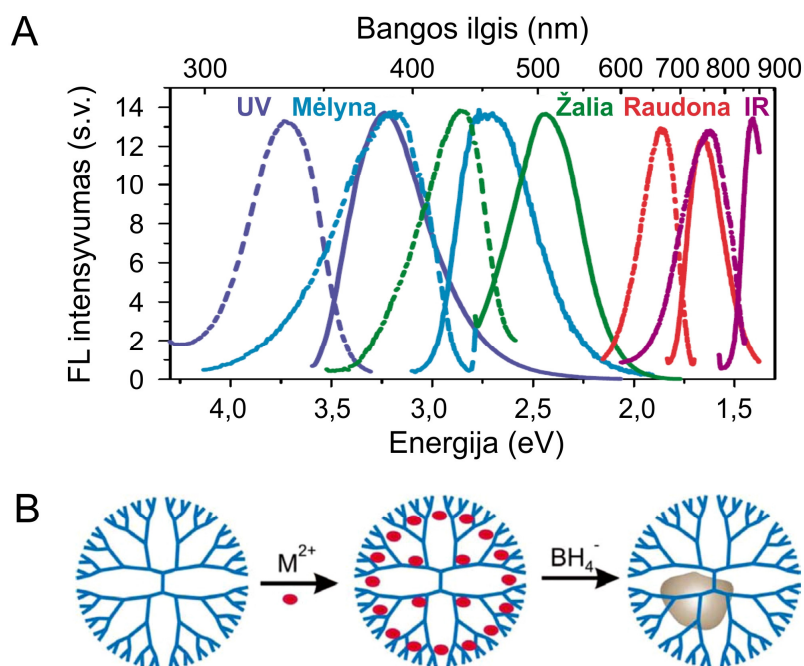


2 pav. Bendrinė nanodalelių sintezės redukcijos būdu schema. Adaptuota iš [35].

Pastarąjį dešimtmetį itin didelio susidomėjimo susilaukė tauriųjų metalų nanoklasterių sintezės struktūriniuose dariniuose (angl. *template-based synthesis*) metodas [38-40]. Naudojant šį metodą, tauriųjų metalų nanoklasteriai įterpiami į tokius struktūrinius darinius kaip polimerai [41, 42], dendrimerai [43], baltymai [44, 45] ar DNR [46]. Struktūriniai dariniai pasitarnauja ne tik kaip forma nanoklasteriui susiformuoti, bet ir stabilizuoja nanoklasterius. Struktūra ir forma besiskiriančių molekulių bei sintetinių darinių įvairovė leidžia sintetinti norimo dydžio ir formos fotoluminescuojančius nanoklasterius.

Pirmieji vandenyje tirpių fotoluminescuojančių tauriųjų metalų nanoklasterių sintezės struktūriniuose dariniuose pavyzdžiai pasirodė ankstyvaisiais 2000 metais, kai Dickman'o grupė paskelbė susintetinusi į poli(amidamino) (PAMAM) dendrimerus įterptus kelių nanometrų dydžio fotoluminescuojančius sidabro [43] ir aukso [47] nanoklasterius. Pastarieji pasižymėjo intensyvia fotoluminescencija mėlynoje spektrinėje srityje. Vėliau, keičiant aukso ir PAMAM dendrimerų molinį santykį bei naudojant skirtingos kartos dendrimerus, buvo susintetinti nanoklasteriai, pasižymintys fotoluminescencija ir kitose spektrinėse srityse (3 pav.) [6].





**3 pav. PAMAM dendrimeruose susintetintų skirtingo dydžio aukso nanoklasterių fotoluminescencijos (ištininė linija) bei FL žadinimo (punktyrinė linija) spektrai (A); dendrimeruose įterptų nanoklasterių sintezės schema (B). Adaptuota iš [6] (A) bei [48] (B).**

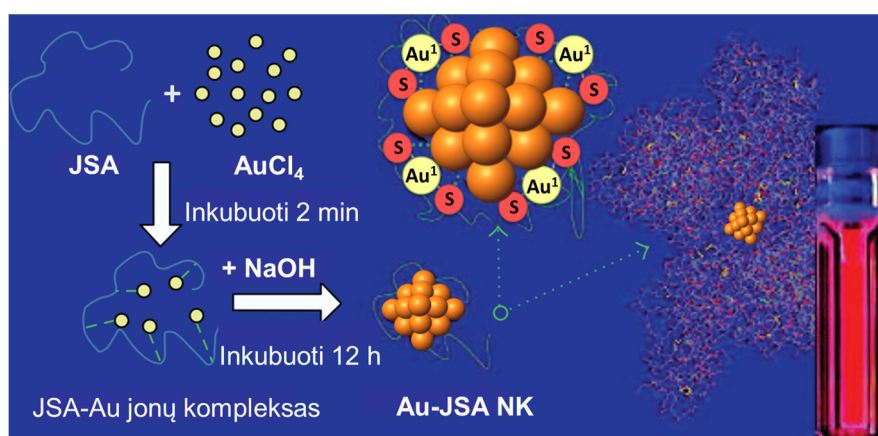
Dendrimeruose įterptų nanoklasterių sintezę sudaro du etapai: 1) norimo metalo jonai sumaišomi su dendrimerų tirpalu – metalo jonai įsiterpia dendrimero struktūroje; 2) – į tirpalą pridedama reduktoriaus, kuris inicijuoja kelių nanometrų dydžio nanoklasterių susiformavimą dendrimero struktūroje (3 pav. B) [48].

Polimerai – dar viena rūšis plačiai paplitusių makromolekulių, potencialių struktūrinių darinių įterpti aukso nanoklasteriams [49, 50]. Į polimerus įterptų aukso nanoklasterių dydis priklauso nuo polimero struktūros, funkcinių grupių ir aukso-polimero molinio santykio [41, 51].

Nanoklasterių sintezė struktūriniuose dariniuose pasirodė itin patraukli dėl lengvai kontroliuojamo nanoklasterių dydžio, todėl buvo ieškoma daugiau biomediciniam pritaikymui patrauklių tam tinkamų struktūrinių darinių.

Baltymai – tai makromolekulės, pasižyminčios tam tikra struktūra, kuri gali būti panaudota formuojant fotoluminescuojančius aukso nanoklasterius. Baltymas vaidina svarbų vaidmenį stabilizuojant ir surikiuojant aukso atomus į stabilų nanoklasterį, todėl aukso-baltymo nanoklasterio formavimasis, dydis ir struktūra

labai priklauso nuo baltymo konformacijos bei sąveikos su neorganiniais jonais [52, 53]. Paprastai aukso-baltymo nanoklasterių sintezė prasideda į baltymo molekulę įsiterpus aukso prekursoriams (Au jonams), kurie, esant šarminei aplinkai, yra redukuojami baltymo amino rūgščių, tokių kaip tirozinas [54] ir triptofanas [55], taip suformuojant aukso nanoklasterį baltymo molekulėje. Au NK formavimasis priklauso nuo aminorūgščių prieinamumo, t.y. nuo baltymo konformacijos, kurią reguliuojant (pvz. keičiant sintezės temperatūrą) yra kontroliuojama Au NK formavimosi kinetika. 2009 m. Xie su kolegomis pristatė naujos klasės „žalios“ sintezės metodą sintetinti aukso nanoklasterius baltymuose [54], pasitelkęs plačiai paplitusį ir komerciškai prieinamą baltymą – jaučio serumo albuminą (JSA). Šis kraujo plazmos baltymas ne tik yra plačiai paplitęs, bet ir pasižymi stabilumu bei yra sąlyginai pigus.

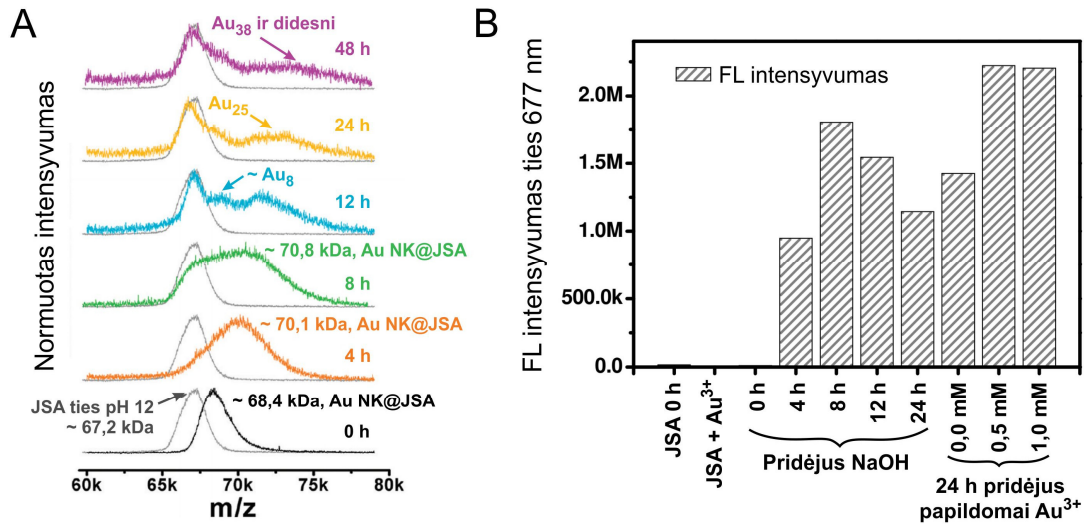


4 pav. Au-JSA nanoklasterių sintezės schema. Adaptuota iš [54].

Sintezės metu  $\text{Au}^{3+}$  jonai yra sumaišomi su JSA vandeniniu tirpalu ir Au jonaiprisijungia prie baltymo tiolio grupių (4 pav). JSA baltymas turi 35 cisteino molekules, manoma, kad prie jų sieros tilteliais prisijungia aukso atomai. Tuomet, pakeitus tirpalo pH iki  $\sim 12$  – į tirpalą įvedus reduktorių NaOH, baltymas susisuka į tretinę konformaciją ir aukso atomai suartėja suformuodami nanoklasterį. Susintetinti Au-JSA nanoklasteriai buvo sudaryti iš 25 aukso atomų ir pasižymėjo fotoluminescencija raudonoje spektrinėje srityje ( $\lambda_{em} = 640 \text{ nm}$ ).

Masės spektrometrijos metodu ištyrę Au NK formavimąsi JSA molekulėje Chaudhari su kolegomis nustatė, kad iš karto sumaišius JSA ir  $\text{HAuCl}_4$ , tirpale nėra laisvų JSA baltymų, tačiau po 8 h sintezės susiformavus 8 aukso atomų

nanoklasteriams tirpale atsiranda laisvų baltymo molekulių, kurios išlieka laisvos net ir po 48 h sintezės, susiformavus  $Au_{38}$  (5 pav. A) [38]. Autoriai taip pat parodė, jog po 24 h į sintezės tirpalą papildomai pridėjus Au jonų, išauga koloidinio tirpalo FL intensyvumas (5 pav. B).



5 pav. Au-JSA NK sintezės tyrimai masės spektrometrijos metodu (A), Au-JSA NK sintezės tirpalo FL intensyvumas ties 677 nm skirtingais laiko momentais (B). Adaptuota iš [38].

Xie darbas paskatino proveržį fotoluminescuojančių tauriųjų metalų nanoklasterių sintezės srityje, daugelis mokslininkų grupių ėmėsi „žaliosios“ sintezės metodikos panaudodami biologiškai aktyvius baltymus. Literatūroje pasirodė insulino [45, 56], lizocimo [57], žmogaus transferino [58], feritino [59], hemoglobino [60], tripsino [61], pepsino [62] baltymuose susintetinti fotoluminescuojantys aukso nanoklasteriai. Tokie fotoluminescuojantys nanoklasteriai iš karto po sintezės pasižymi biologiniu suderinamumu ir yra perspektyvūs fotoluminescenciniai žymenys. Visgi fotoluminescencinės baltymais stabilizuotų aukso nanoklasterių savybės nėra išsamiai ištirtos ir priklauso nuo paties baltymo struktūros, dydžio, jį sudarančių aminorūgščių, tokių kaip cisteinas ir triptofanas, bei aukso nanoklasterio vietos baltyme [53].

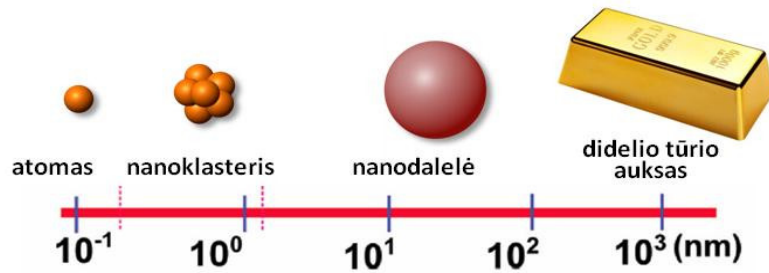
Dažniausiai aukso-baltymo nanoklasterių sintezė atliekama su komerciškai prieinamais globuliniais baltymais, kurių savybės nėra lengvai modifikuojamos, kas riboja jų pritaikomumą. Pastaruoju metu literatūroje pasirodė straipsnių apie

modulinius pakartotinius baltymus kaip struktūrinius darinius nanoklasteriams stabilizuoti [63]. Pakartotiniai baltymai yra sudaryti iš vienujų pasikartojančių baltymų vienetų, susijungusių į tandemą. Visgi kol kas tėra viena publikacija apie tokiuose baltymuose susintetintus mėlynoje spektrinėje srityje fotoluminescuojančius aukso nanoklasterius, ir kol kas nėra duomenų, kad keičiant šių baltymų struktūrą būtų sėkmingai keičiamas fotoluminescuojančių nanoklasterių dydis ir fotoluminescencijos bangos ilgis, nors kiti autoriai yra parodę, kad keičiant pakartotinių baltymų ilgį galima reguliuoti sintezės metu susiformuojančių plazmoninių aukso nanodalelių dydį [64].

Naudojant „iš viršaus žemyn“ metodiką, fotoluminescuojantys aukso nanoklasteriai yra gaunami ęsdinant didesnių aukso nanodalelių paviršių pasitelkus įvairias mažas molekules, kaip tioliai (gliutationas, dihidrolipoinė rūgštis, fenil-etiltiolis) [23, 65, 66], aminai, fosfinai ar polimerai. Tipinės procedūros metu paviršiuje stabilizuotos aukso nanodalelės sumaišomos su ęsdiklio (mažų molekulių ar polimerų) pertekliumi. Aukso nanodalelės paviršiaus ęsdinimas vyksta keičiant dalelės paviršiaus ligandus ęsdiklio molekulėmis (angl. *ligand exchange*), kol galiausiai susiformuoja ęsdiklio molekulėmis dengti aukso nanoklasteriai.

## 2.2. Optinės aukso nanodalelių savybės

Tauriųjų metalų optoelektroninės savybės labai stipriai priklauso nuo metalo matmenų. Kintant dydžiui, kinta ir nanodalelių elektroninė struktūra, dėl ko nano matmenų aukso dariniai pasižymi unikaliomis medžiagos savybėmis. Atsižvelgiant į dydį, aukso nanodariniai gali būti skirstomi į itin mažus ( $< 2$  nm) molekulinio tipo aukso nanoklasterius bei 2-100 nm dydžio plazmoninėmis savybėmis pasižyminčias aukso nanodaleles (6 pav.). Metalų nanodalelių fotofizikinėms savybėms aprašyti dažnai pasitelkiamas Drudės-Sommerfeldo laisvųjų elektronų dujų modelis. Šis modelis metalų elektrinio ir šiluminio laidumo savybes aprašo kinetinės dujų teorijos pagrindu.



6 pav. Aukso struktūrų klasifikacija nuo atomo iki kietojo kūno. Adaptuota iš [67].

Atsižvelgiant į stiprų elektroninio ekranavimo efektą bei atmetus elektronų-elektronų bei elektronų-jonų gardelės sąveikas, metalų valentiniai elektronai yra laikomi laisvais – yra delokalizuoti ir nepriklauso konkreitiems atomams [68, 69].

### 2.2.1. Paviršiaus plazmonų rezonansas

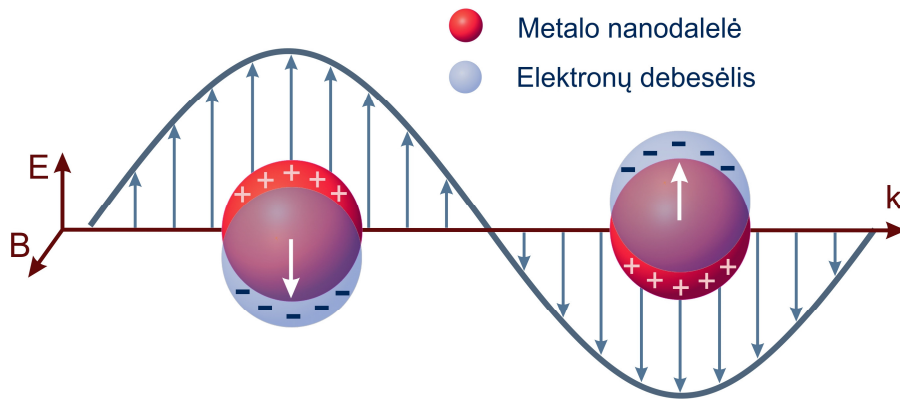
Kaip jau minėta, kokybiškai laisvieji elektronai elgiasi kaip laisvųjų krūvininkų dujos (plazma), kuriose gali būti sužadintas išilginis kolektyvinis krūvio tankio svyravimas, dar vadinamas plazmonais. Sunkūs statiški teigiami jonai elektrostatiškai traukia lengvus neigiamą krūvį turinčius elektronus – vyksta svyravimai, kurių metu elektrono energija kinta iš potencinės energijos (atsirandančios dėl elektrostatinės traukos) į kinetinę energiją, ir atvirkščiai. Plazmonai sužadinami tokiuose metaluose kaip auksas, sidabras, aliuminis ir varis – medžiagose, kurių realioji dielektrinės funkcijos dalis yra neigiama ir absoliučiąja verte didesnė už teigiamą menamąją dalį. Skiriami trys plazmonų tipai: (1) tūriniai, (2) paviršiniai (pasireiškia plazmos ir dielektriko sandūroje), bei (3) vietiniai (lokalizuotieji) plazmonai – erdvėje apriboti elektronų svyravimai metalų nanodalelėse [70]. Begalinio tūrio plazmos svyravimų dažnis  $\omega_p$ :

$$\omega_p = (Ne^2/\epsilon_0 m)^{1/2}, \quad (1)$$

kur  $N$  yra laisvųjų krūvininkų (metalų atvejų, elektronų) tankis,  $e$  – laisvųjų krūvininkų krūvis,  $m$  – laisvųjų krūvininkų masė, o  $\epsilon_0$  – vakuomo dielektrinė skvarba [71].

Aukso dalelės dydžiui esant artimam elektrono vidutiniam laisvajam lėkiui (auksui ir sidabru tai yra  $\sim 50$  nm), metalo dielektrinė funkcija ir lūžio rodiklis tampa

stipriai priklausomi nuo dalelės dydžio. Kai dalelės matmenys yra žymiai mažesni už elektromagnetinės spinduliuotės bangos ilgį  $d \ll \lambda$ , elektrinio lauko stiprio fazė visame dalelės tūryje yra praktiškai vienoda. Išorinis elektrinis laukas dalelėje indukuoja elektrinį dipolį (sudėtingesnėms dalelėms bei dalelių sandrupoms reikia nagrinėti ir aukštesnius narius, pvz. kvadrupolius) (7 pav.). Elektronų apribojimas mažame tūryje lemia, kad, esant išoriniam kintančiam elektromagnetiniam laukui, paviršiniai krūvio tankio padidėjimai sudaro grąžinančią jėgą – indukuojami kolektyviniai laisvųjų elektronų svyravimai. Mažo skersmens metalo dalelės atveju tai reiškia, kad susidaro dideli krūvio tankio gradientai ir stiprūs elektromagnetiniai laukai tiek dalelės viduje, tiek dielektrike riboje su paviršiumi.



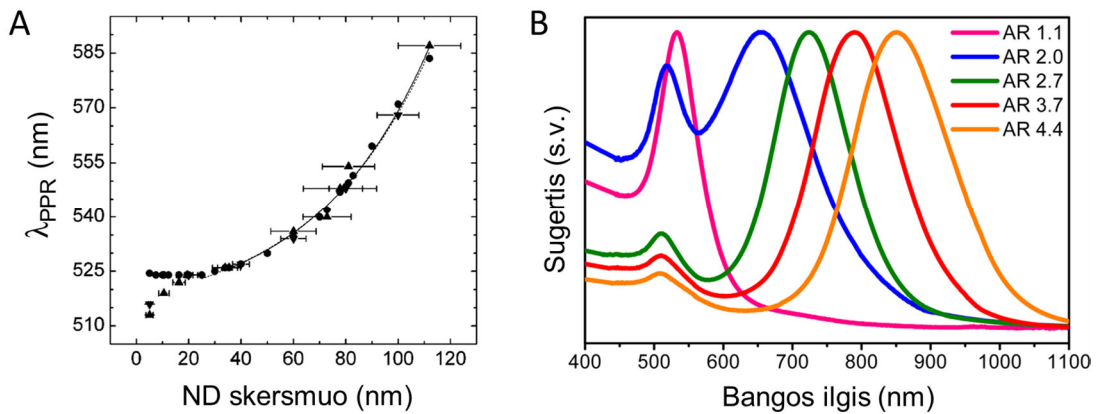
7 pav. Plazmonų rezonansas tauriųjų metalų nanodalelėse. Adaptuota iš [72].

Lokalizotų paviršiaus plazmonų rezonanso (LPPR) dažnis priklauso nuo nanodalelių dydžio, geometrijos ir aplinkos dielektrinės skvarbos, bet labiausiai – nuo laisvųjų krūvininkų tankio  $N$ , kuris tauriesiems metalams, auksui, sidabru ir varui yra  $10^{22}$ - $10^{23}$   $\text{cm}^{-3}$ , bei nuo dielektrinės konstantos vertės aukštų dažnių srityje  $\epsilon_\infty$  [73]:

$$\omega_{lppr} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{Ne^2}{\epsilon_0 m_e (\epsilon_\infty + 2\epsilon_m)}}, \quad (2)$$

kur  $e$  – laisvųjų krūvininkų krūvis,  $m$  laisvųjų krūvininkų masė, o  $\epsilon_0$  – vakuomo dielektrinė skvarba,  $\epsilon_m$  – aplinkos dielektrinė skvarba.

Sferinės nanodalelės pasižymi viena lokalizuoto paviršiaus plazmonų rezonanso moda – sugerties spektras pasižymi viena smaile, smailės padėtis bei plotis priklauso nuo metalo bei dielektriško (nanodalelės šerdies ir apvalkalo) dielektrinių funkcijų bei nuo dalelių dydžio ir formos (8 pav.) [74, 75]. LPPR pasižymi didesnės nei 3 nm dydžio aukso nanodalelės. Tokių nanodalelių LPPR sugerties spektro smailės padėtis yra ties 510 nm. Visgi tokių mažų nanodalelių plazmoninė sugertis yra mažesnio intensyvumo dėl sutrumpėjusio elektronų laisvojo lėkio [75]. Didesnių nanodalelių LPPR smailė slenkasi į ilgujų bangų spektrinę sritį (8 pav. A). Nanolazdelėse kolektyviniai elektronų svyravimai vyksta dviem modomis [76], todėl jų LPPR sugerties spektrai pasižymi dviem smailėmis [77]. Atstumas tarp dviejų smailių priklauso nuo nanolazdelės skersmens ir ilgio santykio (8 pav. B) [78].



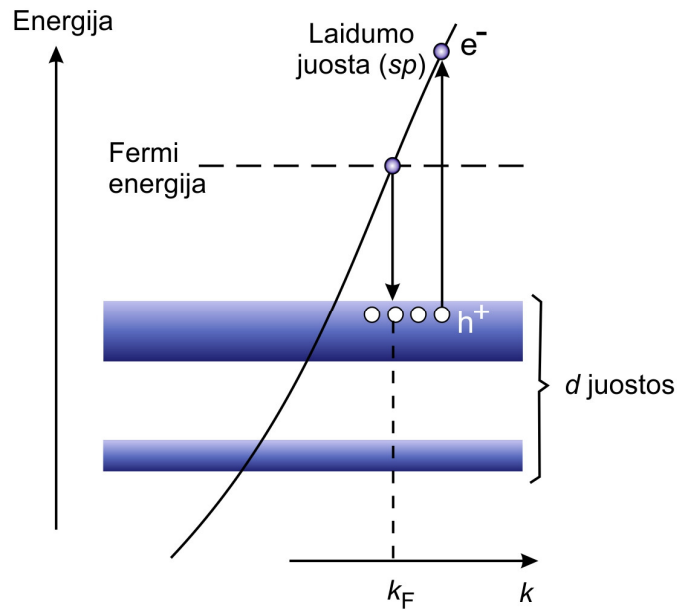
8 pav. Sferinių Au ND LPPR spektro smailės padėties priklausomybė nuo ND dydžio (A); LPPR sugerties spektro formos priklausomybė nuo aukso nanolazdelių ilgio ir pločio santykio AR (B). Adaptuota iš [75] (A) ir [78] (B).

### 2.2.2. Aukso nanoklasterių fotoluminescencija

Paviršiaus plazmonų rezonansas ilgą laiką buvo pagrindinė mokslininkų susidomėjimo aukso nanodalelėmis priežastis, tačiau 1969 m. Mooradian su kolegomis užfiksavo aukso plėvelės liuminescenciją ties 564 nm, atsirado susidomėjimas liuminescencinėmis aukso savybėmis [79]. Aukso plėvelių bei begalinio tūrio aukso atveju laidumo juosta (*sp*) bei valentinė (*d*) juostos yra ištisinės (9 pav.).



Aukščiausias užpildytas lygmuo atitinka didžiausią elektrono energiją tam metalui, dar vadinamą Fermi energija ( $E_f$ ). Plėvelėse stebėta liuminescencija buvo priskirta tarpjuostinam  $sp \rightarrow d$  elektronų šuoliui. Sugėręs fotoną, elektronas iš siauros  $d$  juostos peršoka į neužpildytą  $sp$  juostos sritį, t.y. kur  $sp$  juostos energija yra didesnė už Fermi lygmens energiją. Iš ten elektronas relaksuoja iki Fermi lygmens. Rekombinuojant Fermi lygmens elektronams bei  $d$  juostos skylėms išspinduliuojamas fotonas.

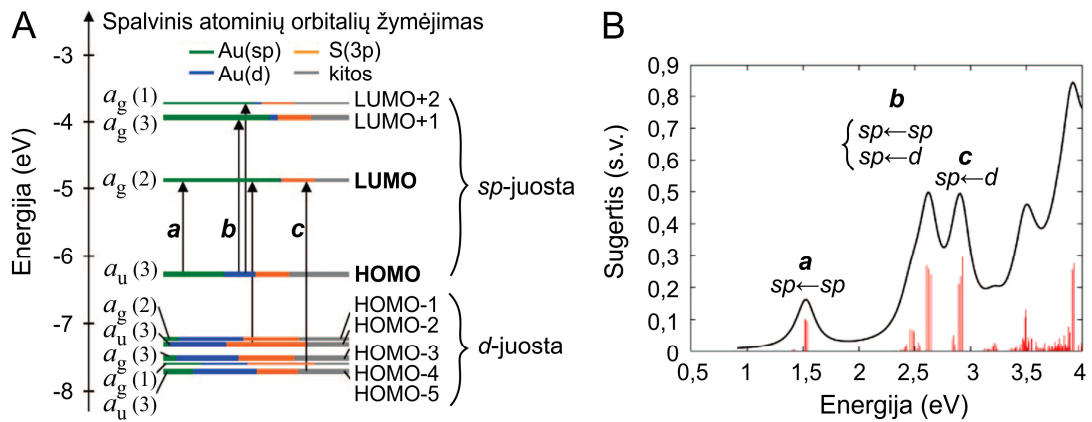


9 pav. Aukso plėvelės energijos juostų diagrama. Liuminescencijos juosta priskiriama spindulinei tarpjuostinei rekombinacijai tarp  $sp$  ir  $d$  juostų. Adaptuota iš [80].

Dalelės dydžiui esant artimam elektrono Fermi bangos ilgiui (auksui tai yra  $\sim 0,5$  nm) [81-83], ištisiniai energijos lygmenys, būdingi metalams, suskyla į diskrečius energijos lygmenis. Atstumai tarp gretimų lygmenų yra  $E_f/N$  eilės, kur  $E_f$  yra begalinio tūrio metalo Fermi energija elektronvoltais, o  $N$  – nanoklasteri sudarančių atomų skaičius [84]. Gretimų lygmenų energijų skirtumo bei šiluminės energijos palyginimas – esminis kriterijus vertinant metališkasias ir nemetališkasias medžiagos savybes. Gretimų lygmenų energijų skirtumui esant mažesniui nei  $k_B T$ , kur  $k_B$  – Bolcmano konstanta, o  $T$  – absoliutinė šiluma Kelvinais, šiluminė energija gali sukurti elektrono ir skylės porą, sudarydama sąlygas tekėti elektros srovei. Jei energijų skirtumas tarp gretimų lygmenų yra didesnis nei galima šiluminė energija, laisvieji elektronai metalo nanoklasteryje



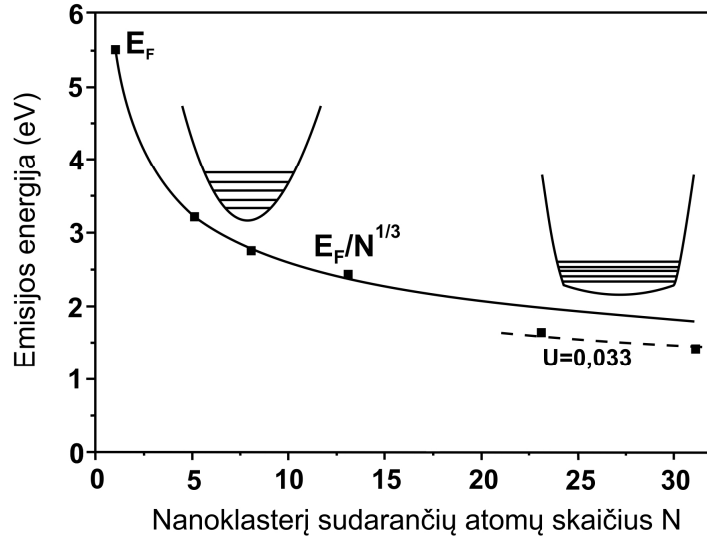
yra apriboti diskretiniuose energijos lygmenyse. Dėl to metalo nanoklasteriai dažniausiai yra laikomi nepasižyminčiais metališkosiomis savybėmis.



**10 pav.** Kohn-Sham orbitalių energijų diagrama  $\text{Au}_{25}(\text{SH})_{18}$  nanoklasterio modeliui (A). Kiekviena Kohn-Sham orbitalė nubrėžta atsižvelgiant į atominių orbitalių įtaką, kurią perteikia skirtingų ilgių ir spalvų linijos: Au (6sp) atitinka žalią spalvą, Au (5d) – mėlyną, S (3p) – geltoną, kitos (kiekvienos jų įtaka < 1 %) – pilką. Kairėje orbitalių energijų diagramos pusėje nurodyta orbitalių simetrija (g, u) ir išsigimimas (skliaustuose). Dešinėje pusėje nurodytos HOMO ir LUMO orbitalių grupės. Teorinis  $\text{Au}_{25}(\text{SH})_{18}$  nanoklasterių sugerties spektras (B). Smailė a atitinka 1,8 eV, smailė b atitinka 2,75 eV, smailė c atitinka 3,1 eV. Adaptuota iš [85].

Siekdami paaiškinti nanoklasterių daugiajuostę sugertį, Zhu su kolegomis kaip modelį pasirinko  $\text{Au}_{25}(\text{SR})_{18}$  nanoklasterį ir, pasitelkę tankio funkcionalo teoriją, matematinės simuliacijos būdu nustatė jų sugerties spektrą bei molekulinės Kohn-Sham orbitales (10 pav.). Aukščiausia užpildyta molekulinė orbitalė (angl. *highest occupied molecular orbital* - HOMO) ir trys žemiausios neužpildytos molekulinės orbitalės (angl. *lowest unoccupied molecular orbitals* - LUMOs) pagrinde yra susiformavusios iš 6sp aukso atominių orbitalių ir sudaro sp juostą. HOMO-1 - HOMO-5 orbitalės yra sudarytos iš 5d aukso atominių orbitalių ir sudaro d juostą. Reikia paminėti, kad s3p orbitalės turi įtakos abiem HOMO ir LUMO orbitalių grupėms. Daugiajuostis sugerties spektras reiškia ir daugiajuostę emisiją – platų fotoluminescencijos spektrą. Platus sugerties spektras yra siejamas su vidujuostiniais (sp) HOMO → LUMO elektronų šuoliais, tarpjuostiniais d → sp šuoliais, arba mišriais sp → sp vidujuostiniais ir d → sp tarpjuostiniais šuoliais [85]. Kiti autoriai, nagrinėdami panašaus dydžio

Au NK sugerties bei fotoluminescencijos spektrus taip pat yra išreiškę nuomonę apie abiejų – ir vidujuostinių  $sp \rightarrow sp$ , ir tarpjuostinių  $d \rightarrow sp$  šuolių įtaką fotoluminescencijos spektrui [80].



11 pav. Nanoklasterį sudarančių atomų skaičiaus  $N$  koreliacija su nanoklasterio fotoluminescencijos energija. Didėjant nanoklasterį sudarančių atomų skaičiui, FL energija mažėja. FL energijos priklausomybė nuo atomų skaičiaus  $N$  kiekybiškai atitinka  $E_F/N^{1/3}$  sąryšį, kaip numatė ir sferinis želė modelis. Didesnių,  $Au_{23}$  bei  $Au_{31}$ , nanoklasterių FL energijos šiek tiek nukrypsta nuo  $E_F/N^{1/3}$  priklausomybės – laisvuosius elektronus apribojanti potencinė duobė suplokštėja pagal iškraipymo/anharmoniškumo parametą  $U = 0,033$ . Adaptuota iš [6].

Laisvųjų elektronų dujų modelio atveju, laisvųjų elektronų tankis arba Fermi energija yra laikomi konstanta nepriklausomai nuo nanoklasterio dydžio, o kelių atomų nanoklasterio fotoluminescencijos energija tiesiogiai siejama su nanoklasterį sudarančių atomų skaičiumi  $N$  [6]:

$$\Delta E_{emisijos} = \frac{E_f}{N^{1/3}}, \quad (3)$$

kur  $E_f$  – begalinio tūrio aukso Fermi energija elektronvoltais (5,53 eV) [6]. Visgi didesniems nanoklasteriams emisijos energija šiek tiek nukrypsta nuo idealaus laisvųjų elektronų modelio dėl elektronų ekranavimo efekto ir potencinės

duobės harmoninio išsikraipymo. Tokiu atveju didesnių aukso nanoklasterių emisijos energija aprašoma kaip:

$$\Delta E_{emisijos} = \frac{E_f}{N^{1/3}} \left[ 1 - U \left( l_e^2 - l_g^2 - \frac{n+2}{3} \right) \right] \quad (4)$$

kur  $l_e$  ir  $l_g$  yra sužadintos ir pagrindinės būsenų kampiniai momentai,  $n$  – orbitinės numeris, o  $U$  – iškraipymo parametras [86].

Kvantinis našumas – vienas esminių fotoluminescencija pasižyminčių medžiagų parametru, parodančių fotoluminescencijos efektyvumą – išspinduliuotų ir sugertų fotonų santykį. Mooradian pirmą kartą išmatuotos aukso plėvelės fotoluminescencijos kvantinis našumas tesiekė  $10^{-10}$  [79]. 1998 m. Wilcoxon išmatavo mažesnių nei 5 nm aukso nanodalelių fotoluminescenciją ties 440 nm [87]. Fotoluminescencijos kvantinis našumas siekė  $10^{-5}$ . Šių mažų nanodalelių fotoluminescencija buvo paaiškinta tarpjuostine rekombinacija, susitvirta paviršiaus plazmonų. Aukso nanostruktūrų kvantinio našumo išaugimą aiškinant lokaliu elektromagnetinio lauko stiprinimu, atsirado straipsnių, rodančių, jog paviršiaus plazmonai nėra būtini siekiant padidinti aukso nanodalelių fotoluminescencijos kvantinį našumą. Literatūroje pasirodė publikacijų apie fotoluminescencuojančius (< 2 nm) aukso nanoklasterius, kurių FL kvantinis našumas siekė  $10^{-3}$  [80, 88]. Kadangi tokie maži nanoklasteriai pasižymi molekulinėmis savybėmis, bet ne paviršiaus plazmonų rezonansu, buvo nuspręsta, kad molekulinų aukso nanoklasterių fotoluminescencijos kvantiniam našumui lokalus elektromagnetinės spinduliuotės stiprinimas įtakos neturi.

Nanoklasterių fotoluminescencijos kvantinis našumas labai priklauso nuo nanoklasterio dydžio, paviršiaus dangos, tirpiklio (cheminės sudėties, pH) [39]. Tioliais dengti aukso nanoklasteriai yra ypač stabilūs dėl sulfo grupės afiniškumo su aukso atomais. Visgi „minkštais“ ligandais dengti aukso nanoklasteriai ilgą laiką pasižymėjo mažu kvantiniu našumu (KN = 0,001 - 0,1%) lyginant su kietuose struktūriniuose dariniuose, tokiuose kaip dendrimerai, įterptais aukso nanoklasteriais, kurių kvantinis našumas gali siekti 10-70 % (1 lentelė). Balty-

muose ar jų fragmentuose, peptiduose, įterptų Au NK kvantinis našumas paprastai siekia 5-12 %, ir nusileidžia dendrimeruose susintetintiems Au NK, tačiau literatūroje yra publikacijų, rodančių, jog baltymuose įterpti Au NK gali pasižymėti ir 56 % kvantiniu našumu, tačiau reikia pastebėti, kad pastaraisiais metais mokslininkai ištobulino ir toliais dengtų Au NK sintezės metodikas ir pasiekė 13-15 % kvantinį našumą [89, 90].

**1 lentelė**

Au NK		FL KN	Dydis (šerdies)	$\lambda_{em}$	Lit. šaltinis
Sintezė struktūriniuose dariniuose					
PAMAM dendrimeruose	Poli(amidamino) (PAMAM) dendrimeruose įterpti Au NK	~ 41 %	Au <sub>8</sub>	450 nm	[47]
	Poli(amidamino) (PAMAM) dendrimeruose įterpti Au NK	70 %	Au <sub>5</sub>	385 nm	[6]
		42 %	Au <sub>8</sub>	455 nm	
		25 %	Au <sub>13</sub>	510 nm	
		15 %	Au <sub>23</sub>	760 nm	
10 %	Au <sub>31</sub>	866 nm			
Baltymuose	Jaučio serumo albumine įterpti Au NK	~ 6 %	Au <sub>25</sub>	640 nm	[54]
	Jaučio kasos ribonukleazėje-A įterpti Au NK	~ 12 %	~ 1,61 nm	682 nm	[21]
	Lizocimu stabilizuoti Au NK	~ 56 %	Au <sub>8</sub>	455 nm	[91]
	Lizocimu stabilizuoti Au NK	~ 5,6 %	~1 nm	657 nm	[57]
	Insuline įterpti Au NK	~ 7 %	~ 0,92 nm	670 nm	[45]
	Žmogaus transferine įterpti Au NK	~7,7 %	Au <sub>28</sub>	710 nm	[58]
	Hemoglobine įterpti Au NK	2,8 %	Au <sub>8</sub>	450 nm	[60]

	Triptofane įterpti Au NK	6,5 %	Au <sub>25</sub>	690 nm	[61]
	Pepsine įterpti Au NK	3,7 %	Au <sub>5</sub> ir	402 nm	[62]
		5 %	Au <sub>8</sub>	510 nm	
		3,5 %	Au <sub>13</sub>	670 nm	
			Au <sub>25</sub>		
Ligandų monosluoksniu dengti Au NK					
	Gliutationo monosluoksniu dengti Au NK	~ 0,35 %	Au <sub>28</sub>	725 nm	[80]
	Gliutationu dengti Au NK (Au <sub>29-43</sub> (SG) <sub>27-37</sub> )	15 %	Au <sub>29-43</sub>	610 nm	[90]
	Dihidrolipoinė rūgštis (DHLR) dengti Au NK	~ 1,83 %	~ 1,56 nm	630 nm	[23]
	11-merkaptoundekano rūgštis (MUR) dengti Au NK	3,1 %	~ 2,0 nm	520 nm	[92]
	11-merkaptoundekano rūgštis (MUR) dengti Au NK	13 %	1,9 nm	607 nm	[93]
	D-penicilaminu (DPA) dengti Au NK	1,3 %	~ 1,8 nm	610 nm	[94]
	Polietileno glikoliu (PEG) dengti Au NK, kaip modulines grupes prijungus lipoinės rūgšties ligandus	14 %	~ 1,2 nm	750 nm	[89]

Mažesni, mėlynoje spektrinėje srityje fotoluminescuojantys Au NK paprastai pasižymi gerokai didesniu kvantiniu našumu, nei to paties paviršiaus dengimo didesni, raudonoje spektrinėje srityje fotoluminescuojantys Au NK [6]. Taip yra dėl to, kad esant mažesnėms energijoms išauga nespindulinės relaksacijos tikimybė [95].

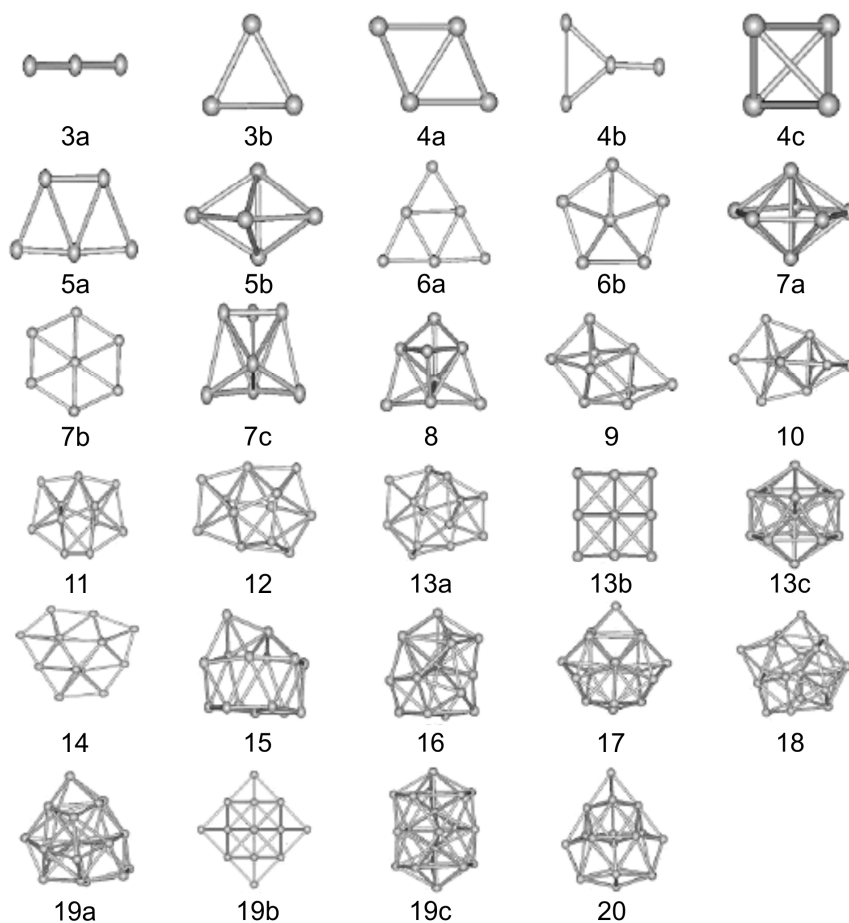
Visgi fotoluminescuojantys aukso nanoklasteriai kvantiniu našumu stipriai atsilieka nuo fotoluminescuojančių puslaidininkinių nanodalelių – kvantinių taškų. Pastarųjų FL kvantinis našumas vandeninėje terpėje gali siekti iki ~ 88 %,

tačiau paprastai būna iki 40 % [96-99]. Puslaidininkiniai kvantiniai taškai paprastai pasižymi sudėtinga šerdies/kiauto/paviršiaus dangos struktūra, kuri užtikrina didelį kvantinį našumą ir optinių savybių stabilumą, tačiau dėl to stipriai išauga nanodalelių dydis (iki 20-30 nm), kuris turi didelės įtakos norint fluorescencinius žymenis panaudoti biologiniams objektams vaizdinti *in vitro* ir *in vivo*. Dėl to komercinėje pramonėje kol kas populiariausi vis dar išlieka organiniai fluorescenciniai žymenys. Naujos kartos fluorescuojančių organinių žymenų kvantinis našumas siekia 60-90 % [14], o fotostabilumu jie gerokai lenkia pirmosios kartos organinius fluorescencinius žymenis [15, 16].

### **2.3. Aukso nanoklasterių struktūra. Magiškieji skaičiai**

Didelių tauriųjų metalų nanodalelių ( $> 2$  nm) kristalinė struktūra, kaip ir begalinio tūrio auksas, pasižymi paviršiaus centruota kubine (angl. *face-centered cubic*) gardele ir lokalizuotu paviršiaus plazmonų rezonansu [100]. Tuo tarpu mažesni nei 2 nm fotoluminescuojantys aukso nanoklasteriai laikomi molekulinio tipo nanodariniiais ir jų, kaip molekulių, struktūra yra griežtai apibrėžtos geometrijos. Nanoklasterių atomai paprastai suformuoja trimates struktūras, kuriose atomų išsidėstymas dažniausiai neatitinka centruotos kubinės gardelės ir priklauso nuo nanoklasterių sudarančių atomų skaičiaus bei atitinka nanoklasterio absoliučios energijos minimumą [101].

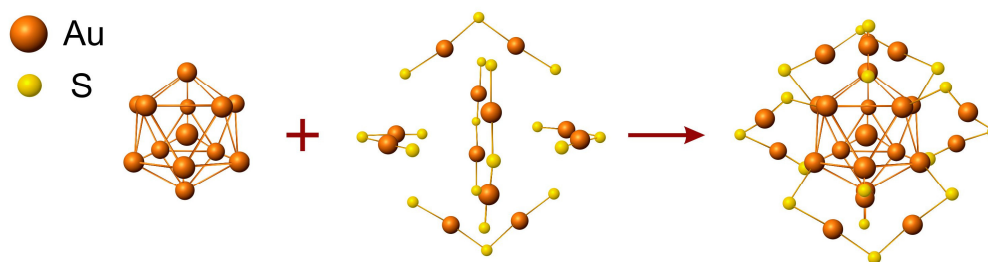
Vienas plačiausiai taikomų aukso nanoklasterių struktūros modeliavimo metodų – tankio funkcionalo teorija. Tankio funkcionalo teorija remiasi nanoklasterio aprašymu kaip fermionų (nanoklasterių atveju – elektronų) sistemos per jos tankio, o ne daugelio kūnų banginę funkciją. Ištyrus  $Au_n$  ( $n = 2-20$ ) nanoklasterių mažiausios energijos būsenas ir naudojant tankio funkcionalų teoriją ir jos aproksimacijas, nustatyta, jog maži, iš 6 ir mažiau aukso atomų sudaryti nanoklasteriai suformuoja plokščias struktūras. Didesni, 7-14 atomų nanoklasteriai jau formuoja trimates narvo formos struktūras. Dar didesnių ( $n > 15$ ) nanoklasterių struktūra panašėja į sferinę formą (11 pav.) [101].



**11 pav. Stabiliausios 3-20 aukso atomų nanoklasterių kristalinės struktūros, nustatytos pasitelkus tankio funkcionalo teoriją bei genetinio algoritmo simuliacijas. Adaptuota iš [101].**

Atomų išsidėstymas bei atitinkamas ligandų prisijungimas lemia nanoklasterių optines savybes [85, 102, 103]. Vienas dažniausiai naudojamų metodų metalo nanoklasterių kristalinei struktūrai nustatyti yra Rentgeno spindulių kristalografija [104-107], tačiau itin mažas metalo nanoklasterių dydis sudaro galimybes nustatyti galimas kristalines struktūras ir matematinio modeliavimo meto-  
dais [103, 108]. Nustatyta, jog tioliais dengtų  $Au_n(SR)_m$  NK pasižymi „alkūnių“ tipo struktūrinėm monomerinėm ( $-S-Au(I)-S-$ ) bei dimerinėm ( $-S-Au(I)-S-Au(I)-S-$ ) atšakom/jungtim [109]. Tioliais dengtą  $Au_{25}$  NK sudaro ikosaedro (20 sienų briaunainis) formos branduolys, kurio centre esantį  $Au(0)$  atomą supa 12  $Au(0)$  atomų išsidėsčiusių ikosaedro viršūnėse (12 pav.).

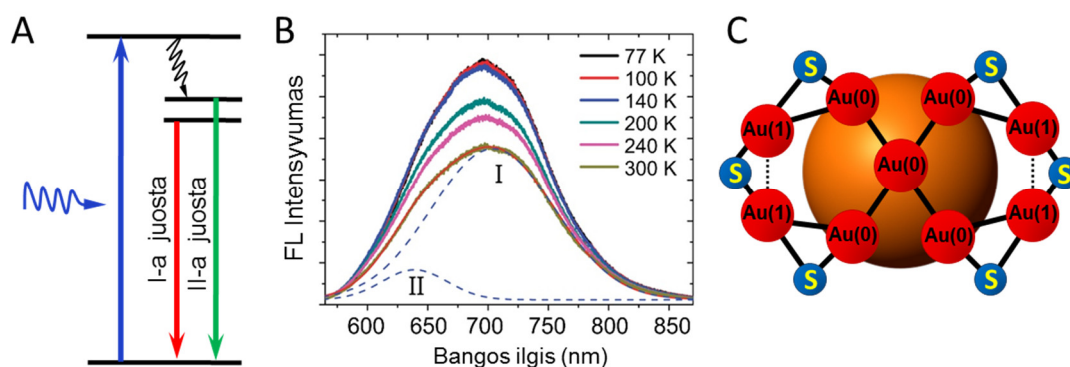
Branduolio išorėje yra susiformavę šeši dimeriniai puslankiai –S–Au(I)–S–Au(I)–S– [110, 111].



12 pav. Au<sub>25</sub>(SR)<sub>18</sub> nanoklasterių struktūra. Adaptuota iš [110].

Rentgeno fotoelektronų spektroskopijos (angl. *X-ray photoelectron spectroscopy* - XPS) metodu buvo patvirtinta, jog JSA-Au<sub>25</sub> nanoklasterius sudaro ~10-17 % Au(I), bei ~83-90 % Au(0) [54, 112], kur Au(I) atitinka aukso atomus nanoklasterio paviršiuje.

Wen su kolegomis išanalizavo, kad pagal Xie sintezės protokolą susintetintų Au-JSA NK FL juosta ties 690 nm yra sudaryta iš dviejų komponentų: I-os juostos ties 710 nm bei II-os juostos ties 640 nm bangos ilgiu. Pirmos juostos spektriniai pokyčiai keičiantis temperatūrai atitiko puslaidininkiams būdingus pokyčius – kylant temperatūrai, dėl elektronų-fononų bei elektronų-defektų/paviršiaus sklaidos FL juosta slinkosi į ilgujų bangų spektrinę sritį, išaugo juostos plotis.



13 pav. Au-JSA NK energijos lygmenų diagrama (A), Au-JSA NK fotoluminescencijos spektro kitimas keičiantis tirpalo temperatūrai (B), galima JSA-Au<sub>25</sub> NK erdvinė struktūra (C). Adaptuota iš [113].

Priešingai, kylant temperatūrai antra juosta slinkosi į trumpųjų bangų spektrinę sritį. Autoriai pirmą juostą sieja su ikosaedro formos nanoklasterio branduolio



fotoluminescencija, o antrąją – su dimerinių puslankių (–S–Au–S–Au–S–) fotoluminescencija [113].

Nors pasitelkus matematinį modeliavimą galima apskaičiuoti stabiliausias tam tikro atomų skaičiaus nanoklasterių kristalines struktūras, tam tikro dydžio nanoklasteriai būna stabilesni nei kiti. Tyrinėjami natrio (Na) klasterių masės spektrometrijos rezultatus Knight su bendradarbiais pastebėjo intensyvumu išsiskiriančias iš 2, 8, 18, 20, 40, bei 58 atomų sudarytų klasterių masės spektrometrijos smailes [114]. Nustatyta, jog iš tiek atomų sudaryti nanoklasteriai pasižymi didesniu stabilumu, nei kiti, tad šie skaičiai buvo pavadinti magiškaisiais. Dabartinis tauriųjų metalų nanodalelių elektroninės struktūros suvokimas stipriai remiasi „superatomo“ modeliu. Kaip jau minėta anksčiau, nagrinėjant optines aukso savybes, atsižvelgiant į stiprų elektroninio ekranavimo efektą brangiųjų metalų valentiniai elektronai yra laikomi laisvais. „Superatomo“ modelis metalų nanoklasterius interpretuoja kaip „superatomus“, kur valentiniai nanoklasterių sudarančių atomų elektronai tvarkingai išsidėsto užpildydami delokalizuotas „superatomines“ orbitales  $1S^2 | 1P^6 | 1D^{10} | 2S^2 | 1F^{14} | 2P^6 | 1G^{18} | 2D^{10} | 3S^2 | 1H^{22}$ , kur S-P-D-F-G-H- atitinka kampinio momento būseną. Pagal šį modelį „magiškieji“, dideliu stabilumu pasižymintys Au nanoklasteriai yra sudaryti iš 2, 8, 18, 34, 58, 92, 138 aukso atomų, kurie pilnai užpildo „superatomines“ orbitales. Tačiau nanoklasterių stabilumas priklauso ne tik nuo „superatominių“ orbitalių užpildymo, bet ir nuo nanoklasterio geometrijos [115]. Dideliu cheminiu stabilumu pasižymėjusių  $Au_{55}$  nanoklasterių stabilumas siejamas su beveik idealia šių nanoklasterių kubo-octaedrine struktūra [116].  $Au_{13}$  bei  $Au_{147}$  nanoklasteriai taip pat minimi kaip labai stabilūs dėl pilnai užpildytų cheminių orbitalių bei ikosaedro geometrijos [117].

Visgi „superatominių“ orbitalių užpildymas ir nanoklasterio geometrija nėra vieninteliai parametrai, nusakantys nanoklasterio stabilumą. Iš gliutationu dengtų Au nanoklasterių didžiausiu stabilumu pasižymėjo nanoklasteriai, sudaryti iš 18, 21, 25, 28, 32 ir 39 atomų [118]. Šie skaičiai tik iš dalies sutampa su „magiškaisiais“ skaičiais pagal „superatomo“ modelį. Literatūroje yra duomenų, kad

ligandų orientacija gali turėti įtakos nanoklasterio elektroninei struktūrai bei optinėms savybėms. Akola su kolegomis parodė, jog keičiantis ligandų ilgiui gali būti iškreipiama oktaedrinė  $Au_{25}$  nanoklasterio geometrija [119]. Román-Velázquez ir jo kolegų matematinio modeliavimo darbai parodė, jog ir  $Au_{28}(SCH_3)_{16}$  bei  $Au_{38}(SCH_3)_{24}$  nanoklasterių šerdies struktūra deformuojasi nanoklasterius stabilizavus tiolines chemines grupes turinčiom molekulėm [120]. Tuo tarpu kitų autorių duomenimis, keičiant Au NK paviršiaus ligandus, gali kisti ne tik nanoklasterių stabilumas, bet ir dydis [121].

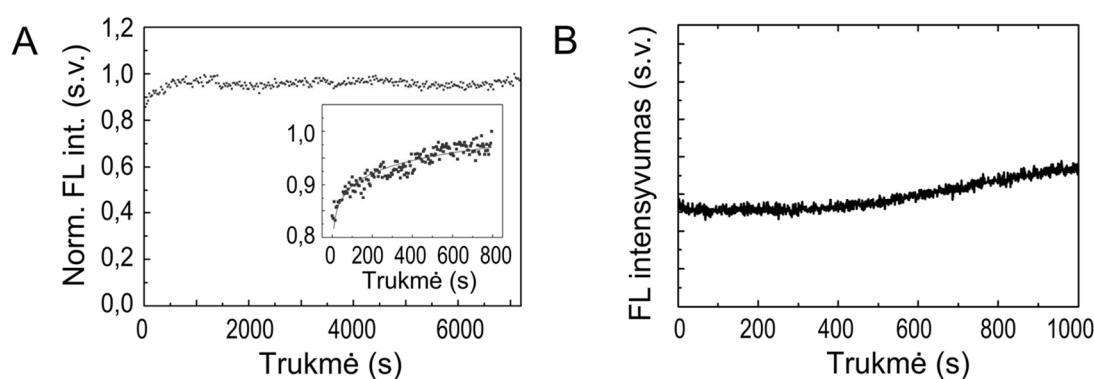
#### 2.4. Aukso nanoklasterių fotostabilumas

Fotostabilumas – tai fotoluminescencinėmis savybėmis pasižyminčių junginių spektrinių savybių stabilumas, juos veikiant išorine UV/Vis spinduliuote. Tai viena esminių fluorescencinių žymenų charakteristikų, kadangi UV/Vis spinduliuotė yra naudojama sužadinti žymenų fluorescencijai, tačiau net ir mažo intensyvumo nuolatinė spinduliuotė gali turėti įtakos fluorescencijos blyškimui (angl. *photo-bleaching*) bei fluorescencinio žymens irimui (angl. *photo-degradation*). Pastarasis gali turėti lemiamos įtakos fluorescuojančių žymenų toksiškumui. Dėl šios priežasties itin svarbu iširti fluorescuojančių žymenų fotostabilumą prieš taikant juos biologiniams objektams vaizdinti.

Fotoluminescuojantys Au NK dažnai minimi kaip nanodariniai, pasižymintys dideliu fotostabilumu [20-22]. Merkaptio undekano rūgštimi (MUR) dengtų  $1,8 \pm 0,4$  nm dydžio Au NK ( $\lambda_{em}=608$  nm) FL kvantinis našumas per 2 h švitinimo 285 nm bangos ilgio spinduliuote, atitinkančia FL žadinimo spektro smailę, nukrito mažiau nei 10 % [22].

Vieni iš fotostabiliausių buvo į ribonukleazę-A įterpti ties 682 nm fotoluminescuojantys apie 1,61 nm dydžio aukso nanoklasteriai [21]. Juos 2 h švitinus 365 nm bangos ilgio spinduliuote, pirmas 800 s buvo stebimas fotoluminescencijos intensyvumo stiprinimas (14 pav. A). Yuan ir jo kolegų tirti fotoluminescuojantys ( $\lambda_{em} = 640$  nm)  $1,5 \pm 0,3$  nm dydžio aukso nanoklasteriai, dengti dihidrolipoine rūgštimi (DHLR), juos švitinant impulsiniu 460 nm bangos ilgio diodiniu lazeriu, taip pat pasižymėjo fotoluminescencijos stiprinimu

(14 pav. B) [20]. Duomenų apie fotoluminescencijos juostos padėties pokyčius nepateikta. Fotoluminescencijos stiprinimo reiškinys Au NK yra pastebimas rečiau, ir jo priežastys kol kas nėra išsamiai paaiškintos. Tuo tarpu puslaidininkinių KT atveju šis procesas yra gerai žinomas ir daugelio autorių yra siejamas su KT paviršiaus pasyvacija – veikiant KT UV/Vis spinduliuote vyksta dujų molekulių (H<sub>2</sub>O ir kt.) fotoadsorbcija [122], sumažėja paviršiaus defektų [123], tvarkingai išsidėsto KT paviršiaus ligandai [124], pašalinami rekombinacijos centrai [125]. Paprastai šis procesas yra grįžtamasis [126].

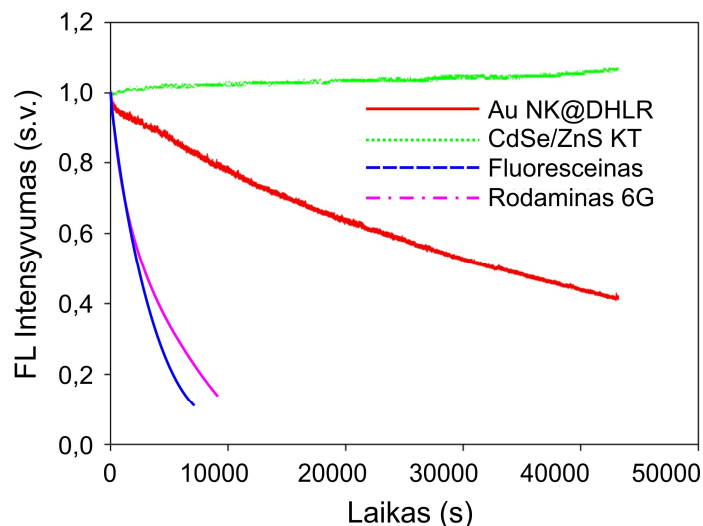


**14 pav. Fotoluminescencijos merkaptato undekano rūgštimi (MUR) dengtų Au NK FL intensyvumas švitinant UV spinduliuote ( $\lambda=285$  nm) (A) bei dihidrolipoine rūgštimi (DHLR) dengtų Au NK fotostabilumas švitinant diodiniu lazeriu ( $\lambda=460$  nm) (B). Adaptuota iš [22] (A) ir [20] (B).**

Visgi literatūroje yra duomenų ir apie Au NK, kurie, švitinant mažo intensyvumo UV/Vis spinduliuote, blyšksta [23-25]. Tripsinu stabilizuotų Au NK ( $\lambda_{em} = 640$  nm) fotoluminescencijos juosta blyško, švitinant 356 nm, 2 mW/cm<sup>2</sup> [23, 25]. Autoriai FL blyškimą aiškina negrįžtamu fotoluminescencijos nanodarinių suardymu.

Viename iš nedaugelio skirtingo tipo fluorescencinių žymenų fotostabilumo palyginamųjų straipsnių Lin su kolegomis palygino dihidrolipoine rūgštimi (DHLR) dengtų Au NK fotostabilumą su puslaidininkinių CdSe/ZnS kvantinių taškų bei organinių fluoroforų, tokių kaip fluoresceinas bei rodaminas 6G, fotostabilumu, tiriamuosius tirpalus švitinant 480 nm bangos ilgio spinduliuote (Xe lempa) [23]. Organiniai fluorescenciniai žymenys pasižymėjo greitu blyškimu, tuo tarpu Au-DHLR NK buvo gerokai stabilesni už organinius žymenis.

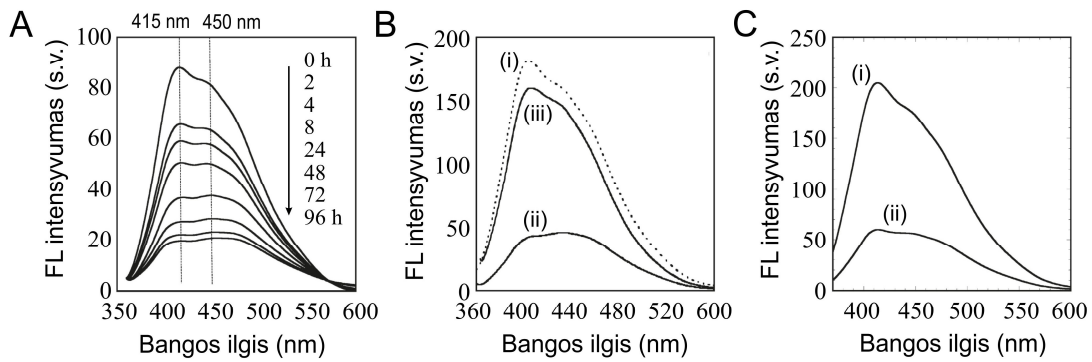
Visgi po 40000 s (~11 val.) švitinimo Au NK FL intensyvumas nukrito daugiau nei 50 %, ir fotostabilumu jie nusileido KT, kurie ne tik kad neblyško, bet dar ir pasižymėjo fotoluminescencijos stiprinimu (15 pav.).



**15 pav. Dihidrolipoine rūgštimi (DHLR) dengtų fotoluminescuojančių Au NK, fluoresceino, rodamino 6G ir polimeru dengtų CdSe/ZnS kvantinių taškų fotostabilumas tiriamuosius tirpalus švitinant 480 nm bangos ilgio spinduliuote. Adaptuota iš [23].**

Kawasaki su kolegomis atlikti dimetilformamidu (DMF) dengtų Au<sub>10</sub>-Au<sub>15</sub> NK fotostabilumo tyrimai atskleidė, jog nanoklasterių fotoluminescencija ir suger-tis blykšta jų tirpalą švitinant 365 nm bangos ilgio 1,3 mW/cm<sup>2</sup> spindu-liuote [24]. Po 8 val. švitinimo FL intensyvumas nukrito daugiau nei 50 % (16 pav. A). Tai, kad švitinimo poveikį pavyko iš dalies atstatyti į švitintą Au-DMF nanoklasterių tirpalą pridėjus reduktoriaus (0.5 M NaBH<sub>4</sub>) (16 pav. B) rodo, jog švitinimo metu Au NK tirpale vyksta fotooksidaciniai procesai. Panašus oksidacinis poveikis Au-DMF nanoklasterių fotoluminescencijai buvo su-keltas ir nanoklasterius dispergavus 30 % peroksido tirpale – FL intensyvumas nukrito iki 30 % (16 pav. C).

Prieštaringi skirtingų autorių rezultatai Au NK fotostabilumo tema leidžia daryti prielaidą, jog fotoluminescuojančių aukso nanoklasterių fotostabilumas, juos ilgą laiką veikiant mažo intensyvumo UV/Vis spinduliuote stipriai priklauso nuo apvalkalo/dangalo molekulių.



**16 pav. dimetilformamidu (DMF) dengtų Au<sub>10</sub>-Au<sub>15</sub> NK fotostabilumas švitinant 365 nm bangos ilgio 1,3 mW/cm<sup>2</sup> spinduliuote (A). Au-DMF nanoklasterių fotoluminescencija prieš švitinimą (i), po švitinimo (ii), bei į švitintą tirpalą pridėjus reduktoriaus (0.5 M NaBH<sub>4</sub>) (iii) (B). FL intensyvumo palyginimas Au-DMF nanoklasterius dispergavus vandenyje (i) bei 30 % peroksido tirpale (ii) (C). Adaptuota iš [24].**

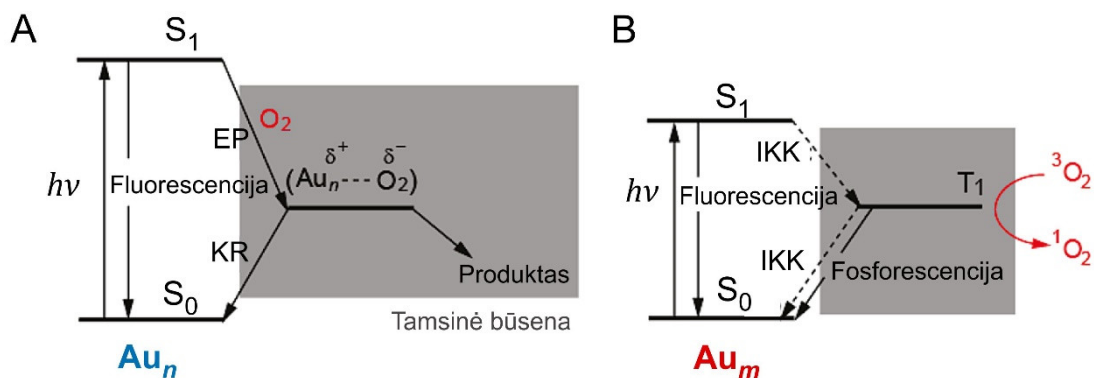
## 2.5. Aukso nanodalelių aktyvių deguonies formų generacija veikiant UV/Vis spinduliuote

Singuletinio deguonies generacija – fotosensibilizuotos navikų terapijos pagrindas. Veikiami UV/Vis spinduliuotės singuletinį deguonį generuoja ir puslaidininkiniai KT [127], cinko oksido (ZnO) [128], titano oksido (TiO<sub>2</sub>) [128], bei metalo nanodalelės [129]. Visgi puslaidininkiniai kadmio (Cd) pagrindu susintetinti KT bei ZnO ND, juos veikiant UV/Vis spinduliuote, į aplinką atpalaiduoja toksiškus jonus, be to, KT bei ZnO ND pasižymi žemu singuletinio deguonies generavimo efektyvumu (~ 5%) [130, 131], o TiO<sub>2</sub> ND pasižymi maža sugertimi Vis/NIR spektrinėje srityje. Tuo tarpu metalo nanodalelės kaip fotosensibilizatoriai yra pranašūs tuo, jog: 1) jų ekstinkcijos koeficientas yra 3-5 eilėm aukštesnis nei daugumos organinių molekulių bei neorganinių nanodalelių, 2) metalo nanodalelės, ypač aukso, yra mažai toksiškos, ir 3) keičiant nanodalelių dydį, galima „paslinkti“ sugerties spektrą į artimąją infraraudonąją spektrinę sritį, tokiu būdu sudarant galimybes fotosensibilizuotai navikų terapijai gilesniuose audinių sluoksniuose dėl audinių optinio skaidrumo lango [132].

Aukso nanodalelių švitinimas UV/Vis spinduliuote gali sukelti fotocheminę arba fototerminę aktyvių deguonies formų (ADF), tokių kaip hidroksilo radikalai (•OH), singuletinis deguonis (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) bei superoksido radikalai (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) generaciją

[133-135], kuri gali turėti lemiamos įtakos nanodalelių fotostabilumui. Trumpu lazeriniu impulsu sužadinus kristalines, lokalizuotu paviršiaus plazmonų rezonansu pasižyminčias aukso nanodaleles į jų LPPR sugerties smailę, nanodalelių laidumo juostos elektronai įgija itin didelę energiją, kuri atitinka 2000-3000°C temperatūrą. Tokie elektronai dar vadinami „karštaisiais elektronais“. Yra parodyta, kad karštieji elektronai gali sukelti aukso-tiolio jungčių aukso nanodalelių paviršiuje disociaciją [136] bei singuletinio deguonies generaciją [129], nanodaleles sužadinus nanosekundžių (ns) trukmės lazeriniais impulsais. Karštieji elektronai relaksuoja atiduodami energiją kristalinei gardelei dėl elektronų-fononų sąveikos. Įkaitusi nanodalelė galiausiai ima šildyti aplinką – tirpiklį. Tai fototerminės aktyvių deguonies formų generacijos pavyzdys.

Tuo tarpu molekulinio tipo aukso nanoklasteriuose, nepasižyminčiuose plazmonine sugertimi, singuletinio deguonies generacija, manoma, vyksta dėl fotocheminių procesų. Sakamoto su kolegomis yra pademonstravę, jog singuletinis deguonis gali būti generuojamas dėl interkombinacinės konversijos, vykstančios nanoklasterius švitinant lazerine spinduliuote [137]. Švitinant  $Au_n$  ( $n < 12$  arba 17) 405 nm bangos ilgio spinduliuote, elektronai yra sužadunami į  $S_1$  energijos lygmenį, ir, aplinkoje esant  $O_2$ ,  $Au_n$  NK yra gesinami dėl elektronų pernašos (EP). Dalis  $Au_n$  NK grįžta į pradinę būseną dėl krūvio rekombinacijos (KR) (17 pav. A). Eksperimentiškai nustatyta, kad didėjant  $O_2$  koncentracijai aplinkoje  $Au_n$  NK fotoluminescencija yra gesinama. Tuo tarpu  $Au_m$  ( $m, 19$  arba  $21$ ) NK, sužadinti į  $S_1$  lygmenį, yra inertiški  $O_2$ . Grįžimas iš sužadintos  $S_1$  būsenos į pagrindinę ( $S_0$ ) vyksta spinduliniiais ir nespinduliniiais keliais. Dalis relaksacijos vyksta dėl fotoluminescencijos, o dalis – dėl elektronų šuolių į tripletinį lygmenį keičiantis elektrono sukiniui (interkombinacinė konversija, IKK). Tripletiniame lygmenyje esančio elektrono energija perduodama deguoniui, taip sumažinant  $T_1$  lygmens užpildą (17 pav. B).



17 pav. Aukso nanoklasterių singuletinio deguonies generavimo schema  $Au_n$  ( $n < 12$  arba 17) bei  $Au_m$  ( $m, 19, 21$ ) nanoklasteriams, juos švitinant 405 nm bangos ilgio nuolatine lazerine spinduliuote. Pilka sritis atspindi tamsinę būseną. Adaptuota iš [137].

$^1O_2$  generacijos mechanizmai priklauso nuo nanoklasterių dydžio, kadangi esant didesniai draustinės juostos tarpui, išauga elektronų pernašos proceso tikimybė. Aukso nanoklasterių singuletinio deguonies generaciją per tripletinį lygmenį, kaip vieną iš labiausiai tikėtinų procesų, mini ir kiti autoriai, remdamiesi tuo, jog fotoluminescuojantys Au NK pasižymi itin ilgomis ( $\mu s$  eilės) FL relaksacijos trukmėmis [138], tuo tarpu organinių molekulių fluorescencija vyksta  $10^{-9}$ - $10^{-7}$  s [139].

Taigi, nepaisant inertiškos aukso prigimties ir santykinai gero fotostabilumo, ilgalaikis žadinimas UV/mėlynos šviesos spinduliuote gali inicijuoti aktyvių deguonies formų generaciją aukso nanoklasterių paviršiuje [135, 140-143] ir lemti išaugusį nanodalelių toksiškumą.

## 2.6. Nanodarinių biologinis suderinamumas

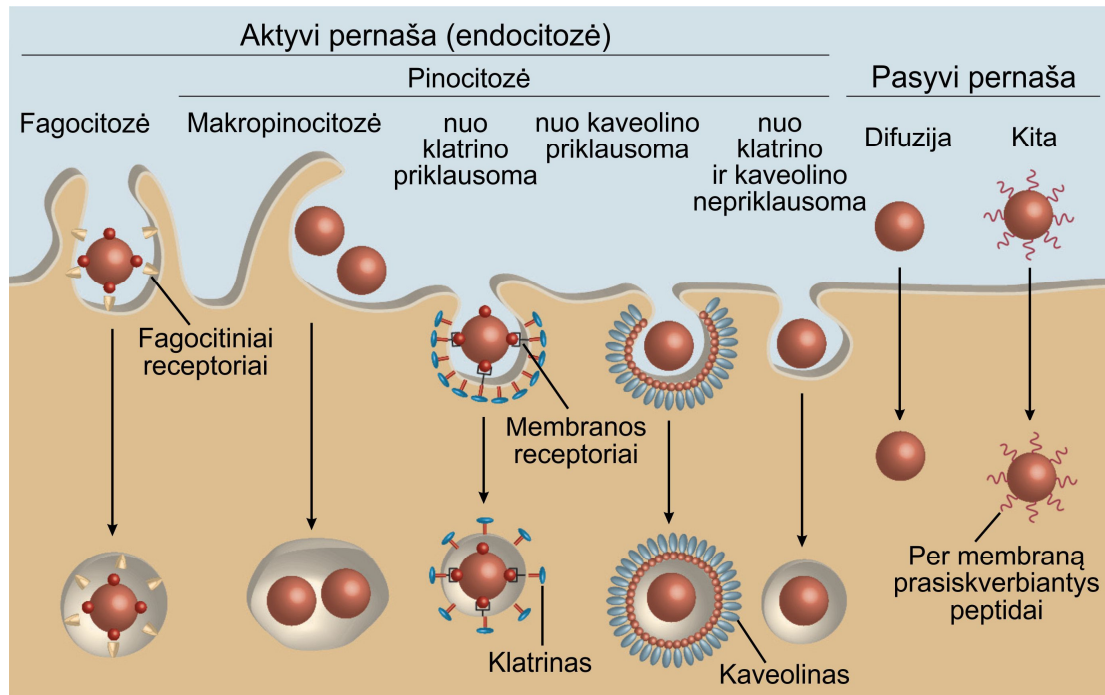
Tobulėjant bionanotechnologijoms vis daugiau nanotechnologinių sprendimų randa pritaikymą biomedicininės diagnostikos bei terapijos srityse [2]. Aukso nanoklasterių taikymas biomedicininiam tyrimams patrauklus ne tik dėl jų mažo dydžio ir unikalių optinių savybių. Kaip jau minėta, aukso nanodalelės ir aukso nanoklasteriai pasižymi palyginti lengvai modifikuojamu paviršiumi sudarant jungtis su antikūnais, biožymenimis bei funkcinėmis molekulėmis. Specifiškai funkcionalizavus nanodalelių paviršių jas galima panaudoti taikinių te-

rapijai, kai yra selektyviai veikiamos vėžinės ląstelės. Taip pat dėl aukso cheminio inertiškumo aukso nanodalelės *a priori* yra laikomos netoksiškomis. Visgi prieš diegiant naujausias bionanotechnologijas į praktiką yra labai svarbu iširti nanodarinių sąveiką su ląstelėmis, audiniais ir organizmais, įvertinti potencialias rizikas, susijusias su nanotoksiškumu.

### **2.6.1. Nanodalelių charakteristikos, lemiančios susikaupimą ląstelėse**

Pirmiausia, kad patektų į ląsteles, nanodalelės turi įveikti ląstelės plazminės membranos barjerą. Ląstelių plazminė membrana yra pusiau pralaidi struktūra, skirianti ląstelės citozolį nuo išorinės aplinkos ir palaikanti dinaminę pusiausvyrą, reguliuodama įvairių molekulių transportą į ir iš ląstelės. Mažos molekulės, tokios kaip cukrūs, aminorūgštys bei jonai per plazminę membraną patenka per intergralinių membranos baltymų pompas ir kanalus difuzijos būdu. Tuo tarpu makromolekulės, tokios kaip baltymai, lipoproteinai ar jų agregatai į ląstelę paprastai patenka endocitozės būdu, iš plazminės membranos susiformavus endocitinei pūslelei. Bendru atveju endocitozė yra skirstoma į fagocitozę – kietųjų dalelių pasisavinimą, bei pinocitozę – skysčių pasisavinimą. Fagocitozė pasižymi tik tam tikros žinduolių ląstelės: makrofagai, neutrofilai ir monocitai [144, 145], tuo tarpu pinocitozė yra būdinga visoms ląstelėms. Yra skiriami keturi pagrindiniai pinocitozės mechanizmai: makropinocitozė, nuo klatrino priklausoma endocitozė, nuo kaveolino priklausoma endocitozė bei nuo klatrino ir kaveolino nepriklausoma endocitozė [146]. Nanodalelių pasisavinimas ląstelėse paprasta vyksta adsorbcijos ant membranos paviršiaus ir internalizacijos endocitozės būdu, tačiau tam tikrais atvejais gali vykti ir kitais, pasyvios pernašos būdais (18 pav.) [147].





**18 pav. Nanodalelių susikaupimo ląstelėse mechanizmai. Nanodalelės į ląstelę gali patekti aktyvios (receptorių-reguliuojamos) pernašos arba pasyvios pernašos per ląstelės membraną būdais. Adaptuota iš [147].**

Aukso, kaip ir kitų medžiagų nanodalelių susikaupimo ląstelėse efektyvumas, kinetika, pasisavinimo mechanizmas bei viduląstelinis pasiskirstymas labai priklauso nuo tokių nanodalelių fizikocheminių savybių, tokių kaip dydis [148, 149], forma, paviršiaus danga/ligandai [150] bei paviršiaus krūvis [26, 148].

Nanodalelių dydis – vienas esminių parametrų, nuo dydžio priklausomas nanodalelių susikaupimas ląstelėse nustatytas ne tik aukso nanodalelių atveju [148, 151, 152], bet ir porėto silicio [153], bei geležies oksido dalelių [154]. Pastebėta, jog endocitozės būdu efektyviausiai kaupiasi nanodalelės, kurių šerdies skersmuo yra 30-50 nm dydžio [27]. Tam, kad būtų inicijuota endocitozė, ir su ląstelės receptoriais sąveikaujanti nanodalelė patektų į endocitinę pūslelę, reikalingas tam tikras ND-receptorių sąveikų skaičius. Matematinio modeliavimo metodais buvo nustatyta, jog efektyviai receptorinei endocitozei vykti yra būtinas tam tikras nanodalelės paviršiaus ligandų bei ląstelės paviršiuje išsidėsčiusių receptorių tankis [155]. Termodinamiškai skaičiuojant, būtent 25-30 nm skersmens nanodalelės yra pakankamo dydžio aktyvinti tokį skaičių receptorių, kad inicijuotų

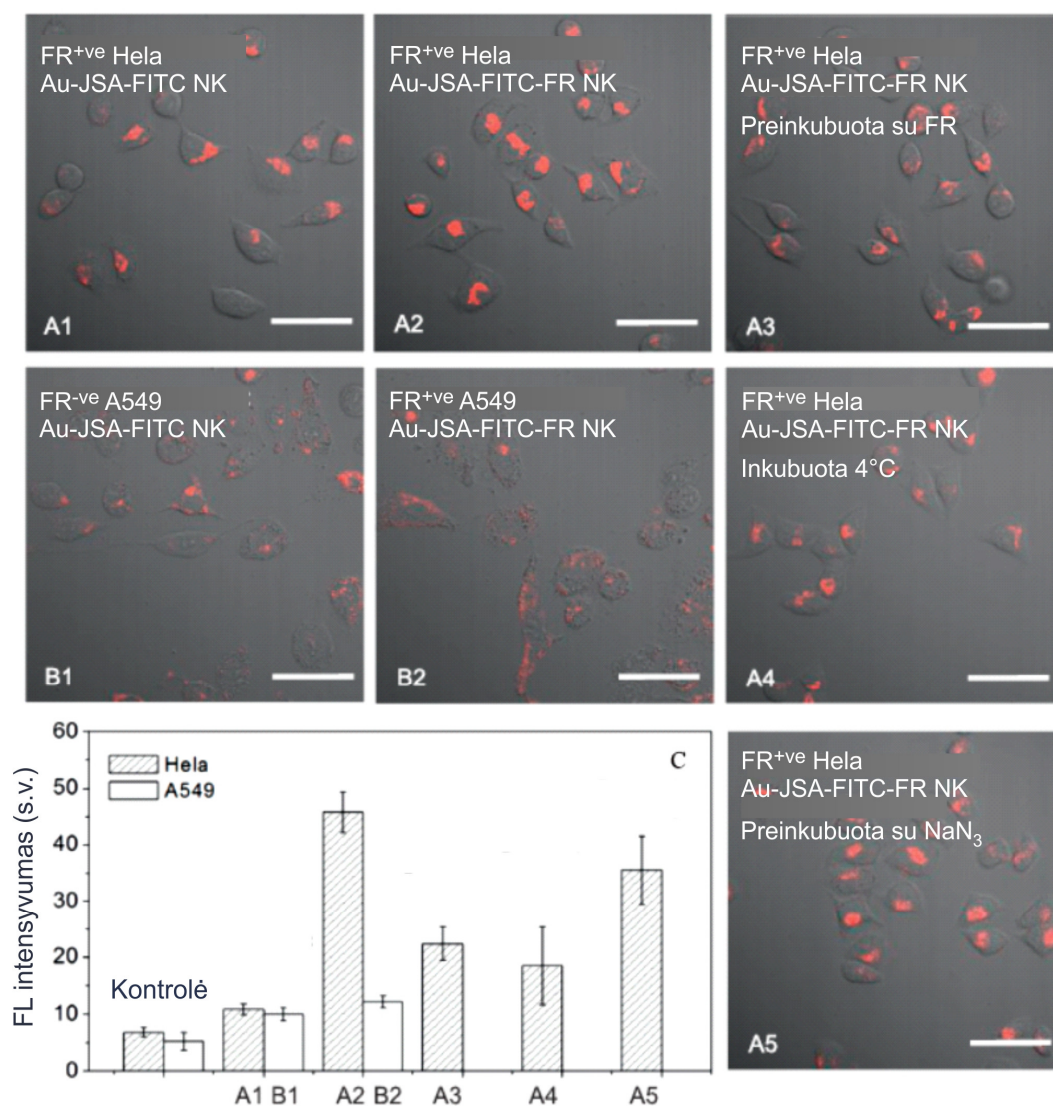
endocitozės mechanizmą. Svarbų vaidmenį vaidina ir receptorių-ligandų sąveikos jėga. Nesant pakankamai stipriai sąveikai, net ir 80 % paviršiaus ligandais dengtos 5,7 nm dydžio nanodalelės nebus endocituojamos [156].

Mažesnės nei 3-5 nm dydžio nanodalelės į ląsteles patenka difuzijos būdu [27]. Priklausomai nuo nanodalelės dydžio bei paviršiaus krūvio, į ląstelę ji gali patekti paprastosios difuzijos būdu, prasiskverbdoma per ląstelės membraną, arba palengvintos difuzijos būdu – per membranos baltymų kanalus. Matematinio modeliavimo metodais buvo nustatyta, kad 1,2 nm nanodalelės per membraną prasiskverbia jos nesuardžiusios, tuo tarpu didesnės 1,2-22 nm skersmens dalelės membranoje formuoja kanalus [147]. Tuo tarpu net ir didesnės specifiniais peptidais dengtos nanodalelės gali prasiskverbti per ląstelės plazminę membraną ir tiesiogiai [157, 158]. Difuzijos būdu į ląstelę patekusios nanodalelės nėra „uždarytos“ endocitinėse pūslelėse bei gali laisvai judėti citoplazmoje, o kai kuriais atvejais gali patekti ir į ląstelės branduolį. Mažesnės nei 3-5 nm dalelės per branduolio porų kompleksą praeina palengvintos difuzijos būdu, tuo tarpu didesni baltymai per branduolio membraną yra pernešami specifinių branduolio baltymų, tokių kaip importinai [159, 160]. Pasitelkęs molekulinę teoriją, Tagliazucchi su kolegomis nustatė, jog aminorūgščių išsidėstymas lemia teigiamą aplinkos krūvį išilgai branduolio poros ašies. Dėl šios priežasties neigiamą krūvį turinčios dalelės pasižymi efektyvesne difuzija per branduolio porų kompleksą [161].

Kitas svarbus nanodalelių susikaupimo ląstelėse faktorius – tai nanodalelių forma. Nutatyta, jog sferinių aukso nanodalelių (74 nm ir 14 nm skersmens) endocitozės greitis yra didesnis nei to paties dydžio aukso nanolazdelių [162]. Palyginus skirtingo skersmens/ilgio santykio Au nanolazdelių endocitozės greičius nustatyta, jog nanolazdelės, kurių skersmens/ilgio santykis 1:3, greičiau pateko į ląsteles nei nanolazdelės, kurių skersmens/ilgio santykis 1:5.

Nanodalelių paviršiaus krūvis taip pat turi lemiamos įtakos nanodalelių susikaupimui ląstelėse. Ląstelių plazminė membrana pasižymi neigiamu paviršiaus krūviu, todėl dėl elektrostatinių ir hidrofobinių sąveikų teigiamą krūvį turinčios nanodalelės efektyviau kaupiasi ląstelėse nei neutralios ar neigiamą krūvį turinčios

nanodalelės [26]. Visgi būtina paminėti, kad nanodalelės paviršius stipriai keičiasi jai patekusi į biologinę aplinką – nanodalelės sąveikauja su įvairiomis biologinėmis molekulėmis, tokiomis kaip baltymai, cukrūs ir lipidai. Šios molekulės dėl elektrostatinės sąveikos adsorbuojasi ant nanodalelių paviršiaus ir suformuoja „baltymų vainiką“ [163-165]. Šis gali pakeisti ne tik nanodalelių susikauptimo efektyvumą, bet ir sukauptų nanodalelių lokalizaciją ląstelėje [166-168]. Kai kurios nanodalelės dėl šios sąveikos biologinėje aplinkoje praranda funkcionalumą [169].



19 pav. Au-JSA-FITC NK susikaupimas folio rūgšties receptorių ekspresuojančiose HeLa ląstelėse bei šių receptorių neturinčiose plaučių epitelio A549 ląstelėse. Au-JSA-FITC NK modifikavus folio rūgštimi (FR), jų susikaupimas HeLa ląstelėse išaugo, tuo tarpu A549 ląstelėse – nepasikeitė. Adaptuota iš [170].

Literatūroje minima, kad JSA į ląsteles patenka nuo klatrino priklausomos endocitozės ir/arba makropinocitozės būdu [171-173]. Tuo tarpu Au-JSA NK susikaupimo mechanizmas nėra išsamiai ištirtas, ir keleto autorių parodytas kaip nelabai efektyvus. Visgi Au-JSA NK konjugavus su folio rūgštimi, susikaupimo efektyvumas folio receptorių turinčiose gimdos kaklelio vėžio ląstelėse HeLa (19 pav.) bei žmogaus endotelio ląstelėse HUVEC ženkliai išauga [170, 174].

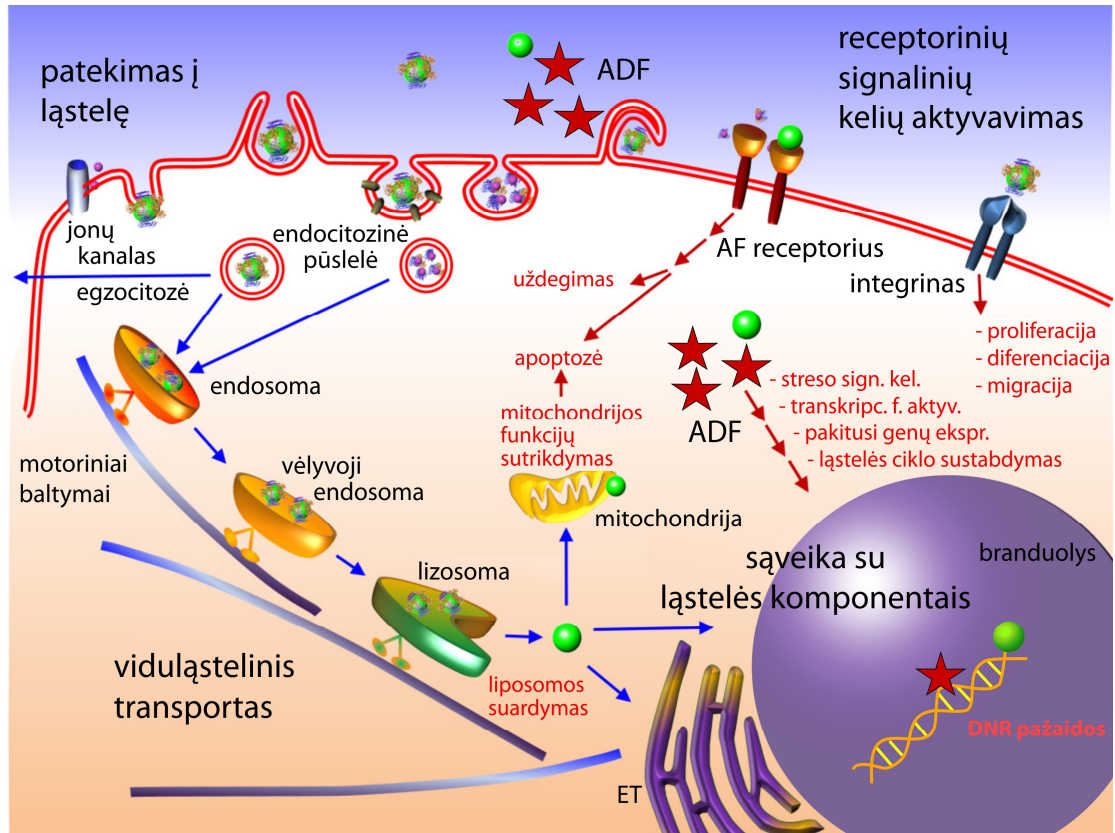
### **2.6.2. Nanotoksiškumas**

Nepaisant augančio nanotechnologijų populiarumo, jų taikymas biomedicinoje yra stipriai ribojamas dar išsamiai neištirto nanodalelių sukeliama toksiškumo ir antrinių ilgalaikių šalutinių poveikių. Nanodalelių toksiškumas priklauso ne tik nuo nanodalelių susikaupimo efektyvumo ir lokalizacijos, bet ir nuo nanodalelių fizikocheminių savybių. Mažas dydis, didelis paviršiaus ploto/tūrio santykis bei lanksti cheminė kompozicija – fizikocheminiai parametrai, kurie daro nanodaleles tokias patrauklias nanomedicinai, turi lemiamos įtakos ir nanodalelių toksiškumui. Ypač didelį vaidmenį vaidina nanodalelių dydis – mažėjant nanodalelėms, santykinai išauga jų chemiškai aktyvaus paviršiaus plotas, o kartu ir toksiškumas [175-177]. Taip pat verta prisiminti, jog itin mažos nanodalelės ląstelėse kaupiasi difuzijos būdu, ir, patekusios į ląstelės citoplazmą ir/ar branduolį, gali sąveikauti su gyvybiškai svarbiomis ląstelės biomolekulėmis, ir taip sutrikdyti ląstelės ciklą. Visgi negalima dydžio vertinti kaip atskiro nanodalelių toksiškumo parametro, kadangi kai kuriais atvejais, esant stabiliai paviršiaus dangai, nanodalelių dydis neturi įtakos nanodalelių toksiškumui, o poveikį lemia bendras nanodalelių paviršiaus plotas [178].

Nanotoksiškumui įtakos turi ir nanodalelių forma. Nustatyta, jog nanodalelės, kurių forma nutolusi nuo sferinės (pvz. nanolazdelės, nanovamzdeliai) pasižymi didesniu toksiškumu nei to paties skersmens sferinės nanodalelės.

Kitas ne mažiau svarbus nanodalelių parametras – tai jų cheminė kompozicija bei stabilumas. Esant nestabiliai nanodalelių struktūrai, į aplinką gali būti paleidžiami nanodaleles sudarančių medžiagų jonai, kurie gali sukelti toksinį poveikį

ląstelėms. Nors auksas yra chemiškai inertiškas, tačiau molekuliniai Au junginiai, tokie kaip  $AuCl_4^-$  jonai gali būti toksiški ląstelėms.



20 pav. Nanodalelių citotoksinio poveikio mechanizmai. Biologinėje aplinkoje ND gali sukelti aktyvių deguonies formų generaciją. Pakilęs aktyvių deguonies formų lygis gali lemti (i) ląstelės streso sukeltų signalinių kelių aktyvaciją, (ii) tiesioginę žalą ląstelių organelėms, tokioms kaip mitochondrijos ir (iii) DNR fragmentaciją branduolyje, dėl kurios gali sustoti ląstelių ciklas, prasidėti apoptozė ir uždegiminis atsakas. ND taip pat gali sąveikauti su ląstelės plazminės membranos receptoriais, pavyzdžiui, augimo faktorių receptoriais ir integrinais, indukuojant ląstelių proliferaciją, apoptozę, diferenciaciją ir migraciją. Ląstelėms pasisavinus ND endocitozės būdu, ND motorinių baltymų ir citoskeleto pagalba yra pernešamos pūslelėse endolizosominiu tinklu. Kad pasiektų taikinius branduolyje ar citoplazmoje, ND turi ištrūkti iš endolizosominio tinklo ir pereiti tankiai užpildytą citoplazmą. Adaptuota iš [27].

Literatūroje yra daug prieštaringų publikacijų aukso nanodalelių citotoksiškumo bei poveikio ląstelių proliferacijai tema. Pan et al. paskelbė, jog itin maži (1,4 nm) aukso nanoklasteriai pasižymėjo stipriai padidėjusiu citotoksiškumu

lyginant su kitomis 0,8-15 nm dydžio aukso nanodalelėmis [175]. Tuo tarpu mažoms aukso nanodalelėms agreguojant susiformavusios plokštelės buvo ne tik netoksiškos ląstelėms, bet dar paskatino ląstelių augimą [179]. Ląsteles inkubavus 70 nm dydžio silicio ND, dengtomis auksu, dalelės nesikaupė ląstelėse, tačiau paskatino ląstelių augimą [180]. Panašūs rezultatai stebėti ir ląsteles pasėjus ant paviršiaus, padengto 24 nm dydžio aukso nanodalelėmis [181].

Viena iš pirminių nanomedžiagų toksiškumo priežasčių yra aktyvios deguonies formos (20 pav.) [182-185].

### ***2.6.3. Nanodarinių įtaka aktyvių deguonies formų generacijai ląstelėse***

Chemiškai aktyvios molekulės, tokios kaip hidroksilo radikalai ( $\cdot\text{OH}$ ), superoksido anijonai ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) bei vandenilio peroksidas ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) yra nuolatos generuojamos aerobinio ląstelių metabolizmo metu [186, 187]. Šios molekulės vaidina svarbų vaidmenį kaip signalinės molekulės reguliuojant fundamentinius biologinius procesus, tokius kaip ląstelių gyvybingumas, proliferacija, migracija ir diferenciacija [188, 189]. Visgi išaugusi aktyvių deguonies formų (ADF) generacija ląstelėse gali sukelti ląstelei oksidacinį stresą ir sutrikdyti pagrindines ląstelės funkcijas, kas lemtų DNR pažeidimas, sutrikusį ląstelės signalinį mechanizmą, pakitusį ląstelės judrumą, citotoksiškumą ir apoptozę [185, 190].

Pan su kolegomis nustatė, jog 1,4 nm dydžio Au NK, dengti trifenilfosfino monosulfatu (TFFMS), sukelia ląstelėms oksidacinį stresą ir indukuoja nekrozę – po 48 val. inkubacijos Au-TFFMS NK, HeLa ląstelių gyvybingumas nukrito 96 % [191]. Siekiant išsiaiškinti, ar oksidacinį stresą lėmė tiesiogiai Au NK generuojamos ADF, ar tai buvo ląstelių reakcija į susikaupusius Au NK, ląstelės buvo preinkubuotos antioksidantais: N-acetilcisteinu (NAC), gliutationu bei trifenilfosfino monosulfatu (TFFMS). Nustatyta, kad preinkubacija minėtais reduktoriais lėmė iki 15 % atsistačiusį ląstelių gyvybingumą. Tuo tarpu koinkubacija su Au NK bei reduktoriais lėmė 65-93 % ląstelių gyvybingumo atsistatymą. Rezultatai rodo, jog Au NK toksiškumas kyla iš nuolatinės ADF generacijos, nulemtos Au NK paviršiaus nestabilumo, nes koinkubacija su tiolinėm grupėm pasižyminčiais reduktoriais pastebimai sumažino Au NK toksiškumą.

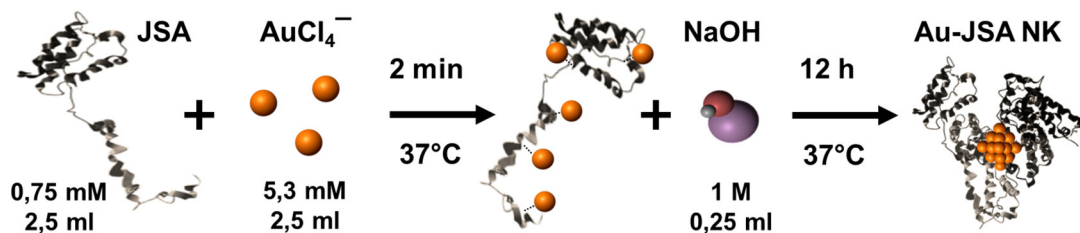


### 3. METODAI IR MEDŽIAGOS

#### 3.1. Aukso nanoklasterių sintezė

##### 3.1.1. Au-JSA NK sintezė

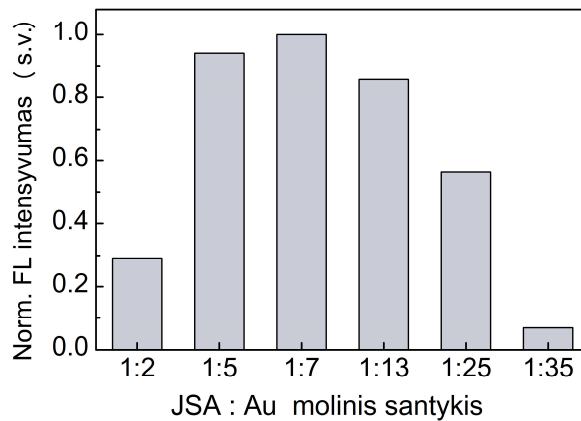
Fotoluminescuojantys aukso nanoklasteriai, įsiterpę į jaučio serumo albumino (JSA) molekules (Au-JSA NK) buvo sintetunami pagal Xie ir jo kolegų pasiūlytą sintezės metodiką [54], šiek tiek ją modifikavus [192]. Paprastai, vandenilio tetrachloraurato ( $\text{HAuCl}_4$ ) vandeninis tirpalas (5 ml,  $37^\circ\text{C}$ ,  $c = 5,27 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) sumaišomas su jaučio serumo albumino vandeniniu tirpalu (5 ml,  $37^\circ\text{C}$ ,  $c = 7,53 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) intensyviai maišant. Po dviejų minučių į tirpalą įpilama natrio hidroksido (NaOH) tirpalo (0,5 ml,  $c = 1,0 \text{ M}$ ) ir reakcija paliekama vykti 12 valandų, palaikant  $37^\circ\text{C}$  temperatūrą ir tirpalą intensyviai maišant. Po 12 valandų susintetinamas skaidrus skaisčiai raudonos spalvos tirpalas.



21 pav. Au-JSA nanoklasterių sintezės schema. Adaptuota iš [54].

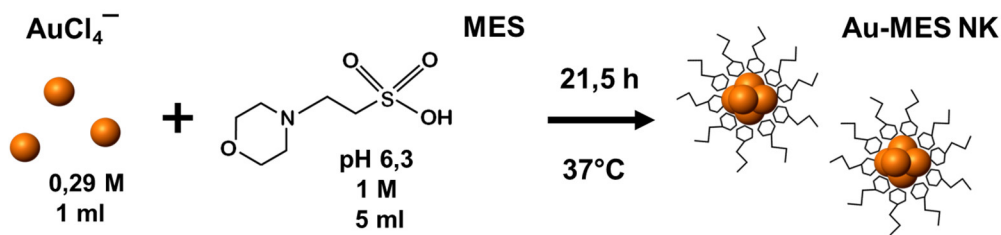
JSA baltymas turi 35 cisteino molekules, manoma, kad per jas sieros tilteliais prisikabina aukso atomai (21 pav.). Į  $\text{HAuCl}_4$  ir JSA tirpalą įvedus reduktorių (NaOH), baltymas susisuka į tretinę konformaciją ir aukso atomai suartėja suformuodami nanoklasterį.

Siekiant rasti optimalias sąlygas fotoluminescuojančių aukso-baltymo nanoklasterių sintezei, buvo pasirinkti keli skirtingi JSA ir aukso moliniai santykiai (1:3, 1:5, 1:7, 1:13, 1:25, 1:35). Buvo nustatyta, jog didžiausiu fotoluminescencijos intensyvumo pasižymi Au-JSA nanoklasteriai, kurių aukščiau aprašyti sintezei naudotas 1:7 JSA ir aukso molinis santykis (22 pav.). Tolesniems eksperimentams Au-JSA nanoklasteriai buvo sintetunami naudojant šį molinį santykį.



22 pav. Aukso-JSA nanoklasterių, susintetintų naudojant skirtingus JSA-Au molinius santykius, normuoti fotoluminescencijos intensyvumai.

### 3.1.2. Au-MES NK sintezė



23 pav. Au-MES nanoklasterių sintezės schema.

2-(N-morfolino)etanesulfonine rūgštimi (MES) dengti fotoluminescuojantys aukso nanoklasteriai (Au-MES NK) buvo susintetinti modifikavus Bao ir jo kolegų sintezės protokolą [193]. Sumaišius 22,5 ml vandeninio MES buferinio tirpalo ( $c = 1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 6,3$ ,  $\text{pH}$  vertė pasiekta titruojant su NaOH tirpalu) su 1 ml vandenilio tetrachloraurato ( $\text{HAuCl}_4$ ) vandeninio tirpalo (0,29 M) mišinys paliekamas maišytis 21,5 val.  $37^\circ\text{C}$  temperatūroje (23 pav.) [194]. Sintzei pasibaigus, aukso nanodalelių koloidinis tirpalas yra 30 min centrifuguojamas  $g = 6,7 \times 10^3$  pagreičiu „MiniSpin plus“ centrifugoje (WTW GmbH, Vokietija). Susintetintas tirpalas pasižymi tamsiai raudona spalva dienos šviesoje bei žaliai mėlyna fotoluminescencija UV šviesoje. Manoma, jog MES prie Au NK paviršiaus jungiasi per azotą (N), arba per deguonį (O) [103].



### 3.2. Spektroskopiniai matavimai

Au-JSA NK bei Au-MES NK sugerties ir fotoluminescencijos spektrai buvo išmatuoti Varian Cary 50 sugerties spektrometru (Varian Inc., Australija) bei Varian Cary Eclipse spektrofluorimetru (Varian Inc., Australija). 10 ir 100 kartų skiestų koloidinių tirpalų spektrai buvo matuoti kvarcinėse 1 cm optinio kelio ilgio kiuvetėse.

Au-JSA NK fotoluminescencija buvo žadinama 405 nm bangos ilgio spinduliuote, pasirinkus 10 nm žadinimo ir emisijos plyšių pločius. FL žadinimo spektrai buvo matuoti su 430-1100 nm bangos ilgio pralaidumo emisijos filtru, siekiant atkirsti JSA fluorescencijos ties 350 nm antrinį maksimumą ties 700 nm, kuris persidengia su nanoklasterių fotoluminescencija.

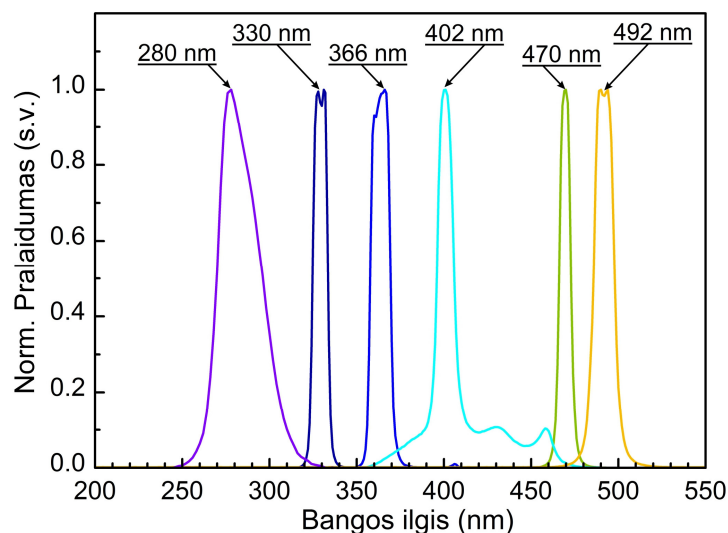
Au-MES nanoklasterių fotoluminescencija buvo žadinama 405 ir 420 nm bangos ilgio spinduliuotėmis, FL žadinimo spektrai matuoti registruojant FL ties 476 nm bangos ilgiu.

Rezultatuose pateikti fotoluminescencijos emisijos bei žadinimo spektrai yra normuoti į optinio tankio vertes ties fotoluminescencijos žadinimo bangos ilgiais.

### 3.3. Fotostabilumo matavimai

Au-JSA NK bei Au-MES NK fotostabilumas buvo tiriamas švitinant 2 ml tiriamojo tirpalo 1 cm optinio kelio ilgio kvarcinėje kiuvetėje (apšvitos sritis 1 cm<sup>2</sup>) su ksenono šviesos šaltiniu MAX-301 (Asahi spectra Inc., Japonija) arba nuolatinės spinduliuotės diodiniu lazeriu ( $\lambda = 405$  nm,  $I = 50$  mW/cm<sup>2</sup>). Švitinant ksenono šviesos šaltiniu, reikiami bangos ilgiai buvo atkirsti pasirinkus atitinkamus juostinius filtrus: 280/32 nm, 330/8 nm, 366/11 nm, 402/10 nm, 470/7 nm, 492/14 nm. Filtrų pralaidumo spektrai pateikti 24 pav. Au-MES nanoklasterių fotostabilumas buvo tiriamas švitinant tik su ksenono šviesos šaltiniu, parinktas vienodas švitinimo intensyvumas  $I = 25$  mW/cm<sup>2</sup>. Au-JSA NK fotostabilumas buvo tiriamas švitinant ir ksenono šviesos šaltiniu, ir lazeriu. Švitinant 280 nm bangos ilgio spinduliuote švitinimo intensyvumas  $I = 7$  mW/cm<sup>2</sup>, 492 nm –

$I = 24 \text{ mW/cm}^2$ . Tirpalai buvo švitinami tol, kol bandinio FL intensyvumas nukrisdavo daugiau nei 70 %. Švitinimo metu tirpalai buvo maišomi magnetine maišykle.



24 pav. Filtrų, naudotų bandinius švitinant ksenono šviesos šaltiniu, optinio pralaidumo spektrai.

Švitinimo dozė  $D$  ( $\text{J/cm}^2$ ) buvo apskaičiuota pagal formulę:

$$D = \frac{P \cdot t}{S} \quad (5)$$

kur  $P$  – švitinimo šaltinio galia (mW),  $t$  – švitinimo laikas (s), ir  $S$  – bandinio apšvitos sritis ( $\text{cm}^2$ ). Santykinė švitinimo dozė ( $D_s$ ,  $\text{J/cm}^2$ ) nuo švitinimo laiko buvo apskaičiuota:

$$D_s = \frac{(1 - T) \cdot P \cdot t}{S} \quad (6)$$

kur  $T$  – bandinio pralaidumas ties švitinimo bangos ilgiu,  $P$  – švitinimo šaltinio galia (mW),  $t$  – švitinimo laikas (s), ir  $S$  – bandinio apšvitos sritis ( $\text{cm}^2$ ).

### 3.4. Aukso nanoklasterių dydžio matavimai

#### 3.4.1. Hidrodinaminio dydžio matavimai

Hidrodinaminis nanodalelių dydis buvo išmatuotas ZetaPlus dalelių dydžio matuokliu (Brookhaven Inc., JAV). Matavimo metodas yra paremtas kvazielastinės šviesos sklaidos fotonų koreliacijos spektroskopija. Matavimo sistemą sudaro kietakūnis lazeris ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ) bei tam tikru kampu krentančios spinduliuotės atžvilgiu įtaisytas detektorius išsklaidytai šviesai registruoti. Dalelių judėjimas

tirpale yra aprašomas Brauno judėjimu, o dalelių išsklaidyta šviesa yra registruojama kaip intensyvumo fliktuacijos laiko atžvilgiu. Fliktuacijos slopimo laikas yra susijęs su difuzijos koeficientu. Difuzijos koeficientas  $D$  yra pagrindinis kvazielastinės šviesos sklaidos metodo fizikinis dydis, atvirkščiai proporcingas dalelių dydžiui  $d$ :

$$D = \frac{k_B T}{3\pi \cdot \eta(t) \cdot d} \quad (7)$$

kur  $k_B$  yra Bolcmano konstanta,  $T$  – absoliutinė temperatūra,  $\eta(t)$  yra tirpiklio, kuriame plaukioja dalelės, klampa, o  $d$  – dalelių skersmuo.

Čia aprašytos dinaminės šviesos sklaidos metodu yra išmatuojamas hidrodinaminis dalelių dydis, dar vadinamas hidrodinaminiu vienetu. Hidrodinaminį vienetą sudaro ne tik dalelė, bet ir ant jos adsorbavęsi jonai bei priešingo nei dalelė krūvio jonai ir prie jų stipriai prisikabinusios molekulės [195].

Hidrodinaminio dydžio skirstiniai pateikti suvidurkinus aštuonis matavimus, vertinant koloidinį tirpalą sudarančių tam tikro dydžio dalelių skaičių.

### **3.4.2. Atomo jėgos mikroskopijos matavimai**

Atomo jėgos mikroskopijos matavimai atlikti VEECO diInnova atominės jėgos mikroskopu (VEECO Inc., JAV) virpančiojo zondo režimu 1 Hz dažniu, 9,7 nm žingsniu. Bandiniai buvo ruošiami užlašinus 40  $\mu$ l tiriamojo koloidinio tirpalo ant šviežiai nuskelto žėručio plokštelės, besisukančios 1000 aps./min greičiu apie plokštei statmeną ašį (angl. *spin coating*).

### **3.4.3. Elektronų pralaidumo mikroskopijos matavimai**

Elektronų pralaidumo mikroskopija angstromų ( $\text{Å}$ ) tikslumu parodo nanodalelių dydį. Visgi organiniai paviršiaus ligandai paprastai nepasižymi pakankamu kontrastu, todėl ši metodika paprastai parodo metalo nanodalelių šerdies dydį. Au-MES NK dydis buvo išmatuotas elektronų pralaidumo mikroskopu FEI TECNAI F20 (FEI, JAV) su lauko emisijos elektronų patranka. Buvo naudojama 200 kV greitinimo įtampa, šviesiniai vaizdai užregistruoti Orius SC1000B CCD kamera (Gatan Inc., JAV). Bandiniai elektronų pralaidumo mikroskopijai buvo

paruošti ant porėtos anglies plėvelės (tinklelio tankis 400, Agarscientific, Jungtinė karalystė) užlašinus lašelį (40 µl) koloidinio Au-MES nanodalelių tirpalo ir leidus jam išdžiūti.

### **3.5. Ląstelių kultivavimas**

Žmogaus krūties adenokarcinomos MCF-7 ląstelių linija buvo įsigyta iš Europos ląstelių kultūrų kolekcijos. Žmogaus krūties adenokarcinomos MDA-MB-231 ląstelių linija įsigyta iš Amerikos ląstelių kultūrų kolekcijos.

*In vitro* eksperimentams ląstelės buvo auginamos 25 arba 75 cm<sup>2</sup> flakonėliuose arba plastikinėse 6/12/96 šulinėlių plokštelėse, užpildytose DMEM ląstelių augimo terpe (Gibco, JAV), papildyta 10% (v/v) fetalinio jaučio serumu (Gibco, JAV), 1 % (10000 U/ml / 10000 µg/ml) penicilino/streptomicino (Biochrom, Vokietija), bei 4 mM l-alanyl-glutamino (Biochrom, Vokietija). Ląstelės buvo auginamos 37°C temperatūroje drėgmės prisotintoje atmosferoje, kurią sudarė 5 % CO<sub>2</sub>.

### **3.6. Ląstelių inkubavimas nanodalelėmis**

Au NK susikaupimo ląstelėse vaizdinimo mikroskopu eksperimentams ląstelės buvo užsėtos į 8-ių šulinėlių plokštelę 4×10<sup>4</sup> ląstelių į šulinėlį tankiu ir 24 h inkubuotos įprastomis sąlygomis (žr. 3.5 skyriuje „Ląstelių kultivavimas“). Po to ląstelių terpė nusiurbta ir pakeista terpe su Au-JSA NK (56 mg/ml) bei su Au-MES NK (45 mg/ml) ir inkubuota 3, 6 ir 24 h. Siekiant įvertinti JSA susikaupimą, ląstelės buvo inkubuotos terpe su JSA-Alexa 488 konjugatu (0,01 mg/ml) (Invitrogen, JAV). Po inkubacijos terpė su Au NK nusiurbta ir ląstelės tris kartus perplautos su Dulbecco fosfato buferiniu druskos tirpalu (angl. *Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS*) (pH 7,0) (Sigma-Aldrich, JAV) ir užpiltos 10 mg/mL branduolių dažo Hoechst 33258 tirpalu. Po 30 min ląstelės dar kartą perplautos DPBS tirpalu ir, užpylus DPBS, paruoštos vaizdinimui lazeriniu skenuojančiu konfokaliniu mikroskopu.

### 3.7. Ląstelių vaizdinimas fluorescenciniu konfokaliu mikroskopu

Aukso nanoklasterių susikaupimas ląstelėse buvo vaizdinamas Nikon Eclipse Te2000-U mikroskopu (Nikon, Japonija) su lazerine skenuojančia konfokaline sistema C1si. Vaizdinimui buvo naudojamas imersinis (alyvos)  $\times 60$  didinimo bei 1,4 skaitinės apertūros objektyvas Plan Apo VC (Nikon, Japonija). JSA-Au NK, JSA-Alexa 488 konjugato ir propidžio jodido FL buvo žadinama 488 nm bangos ilgio argono jonų lazeriu. Au-MES NK bei Hoechst 33258 branduolių dažo FL buvo žadinama 404 nm diodiniu lazeriu (Roithner, Austrija). Fluorescencijai registruoti buvo naudojamas trijų kanalų RGB detektorius su 450/17 nm, 545/45 nm ir 688/67 nm juostiniais filtrais atitinkamai mėlynam, žaliai ir raudonam kanalams. Siekiant išvengti signalų patekimo į gretimus detektorius, buvo naudojama *Frame Lambda* funkcija, leidžianti vienu metu įjungti tik vieną pasirinktą lazerį ir vieną norimą detektorių. Kiti lazeriai ir detektoriai matavimo metu yra išjungti, todėl pašaliniai fluoroforai nėra sužadunami arba į kanalus nukreipta pašalinė emisija nėra registruojama.

Vaizdinimo metu ląstelės buvo laikomos mikroskopavimo inkubatoriuje (Okolab, Italija), kuriame buvo palaikoma 37 °C temperatūra ir drėgmės prisotinta atmosfera, kurią sudarė 5% CO<sub>2</sub> (0.80 l/min O<sub>2</sub> ir 0.04 l/min CO<sub>2</sub>). Vaizdai apdoroti Nikon EZ-C1 3.80 bei ImageJ 1.46 programinėmis įrangomis.

### 3.8. Ląstelių gyvybingumo tyrimai

Siekiant kiekybiškai įvertinti Au-JSA NK bei Au-MES NK toksinį poveikį, buvo atlikti ląstelių gyvybingumo tyrimai ADAM-MC automatinio ląstelių skaičiuokliu (Digital Bio, NanoEnTek Inc., P. Korėja). Ląstelės buvo užšėtos į 12-os šulinėlių plokštelę  $1 \times 10^5$  ląstelių į šulinėlį tankiu ir 24 h inkubuotos įprastomis sąlygomis (žr. 3.5 skyriuje „Ląstelių kultivavimas“). Tuomet terpė buvo nusiurbta ir ląstelės inkubuotos aukso nanodalelėmis (žr. 3.6 skyriuje „Ląstelių inkubavimas nanodalelėmis“). Po inkubacijos ląstelių terpė nusiurbta, ląstelės 1 min užpiltos tripsinu ir vėliau surinktos į anksčiau nusiurbtą terpę. Tuomet ląstelės centrifuguotos  $200 \times g$  7 min ir, nusiurbus supernatantą, resuspenduotos

100 µl PBS tirpale (Gibco, Jungtinė karalystė). Vėliau 20 µl ląstelių suspensijos sumaišoma su 20 µl Accustain T tirpalo ir 20 µl Accustain N tirpalo (Digital Bio, P. Korėja), kad būtų suskaičiuotos visos ir negyvybingos ląstelės. Tuomet gyvybingumas automatiškai suskaičiuojamas ADAM-MC programine įranga. Rezultatuose pateikiamos mažiausiai trijų eksperimentų vidutinės vertės. Statistinė analizė atlikta apskaičiuojant standartinį nuokrypį. Reikšmingumo lygmuo įvertintas *Stjudento T-testu*, apskaičiuojant gautų verčių pasikliautinių intervalų persiklojimą. Visi skaičiavimai atlikti naudojant *Excel* programinę įrangą.

### **3.9. Aukso nanoklasterių susikaupimo bei poveikio aktyvių deguonies formų generacijai ląstelėse tyrimai**

Pasitelkus tėkmės citometrijos metodą buvo kiekybiškai įvertintas Au NK susikaupimas bei Au NK indukuota aktyvių deguonies formų generacija ląstelėse. Ląstelės buvo užsėtos į 24-ių šulinėlių plokštelę  $5 \times 10^4$  ląstelių į šulinėlį tankiu ir 24 h inkubuotos įprastomis sąlygomis, kaip aprašyta 3.6 skyriuje. Tuomet terpė buvo nusiurbta ir ląstelės inkubuotos ląstelių augimo terpe su aukso nanoklasteriais. Po inkubacijos ląstelių terpė nusiurbta, ląstelės 1 min užpiltos tripsinu ir vėliau surinktos į anksčiau nusiurbtą terpę. Tuomet ląstelės centrifuguotos  $200 \times g$  7 min ir, nusiurbus supernatantą, resuspenduotos 100 µl DPBS tirpale analizei tėkmės citometru.

Aktyvių deguonies formų (ADF) generacijos matavimams, po inkubacijos Au NK, ląstelės nuplautos PBS tirpalu ir 1 val. inkubuotos 5 µM CellROX Green (Life technologies, JAV) fluorescencinio ADF dažo tirpalu. Tuomet ląstelės nuplautos PBS tirpalu, tripsinuotos, centrifuguotos ir atitinkamai paruoštos analizei tėkmės citometru. Oksiduotas CellROX Green reagentas prisijungia prie DNR ląstelės branduolyje ir mitochondrijose. Teigiamą kontrolę buvo ląstelės 1 val. inkubuotos su *tetr*-butil hidroperoksidu (TBHP) (Aldrich, Vokietija) (400 µM), indukuojančiu aktyvių deguonies formų generaciją ląstelėse, o po to 1 val. CellROX Green (5 µM).

Tėkmės citometrijos eksperimentai atlikti su Accuri C6 (Becton Dickinson, JAV) tėkmės citometru. Kiekvieno bandinio surinkta ir išanalizuota mažiausiai

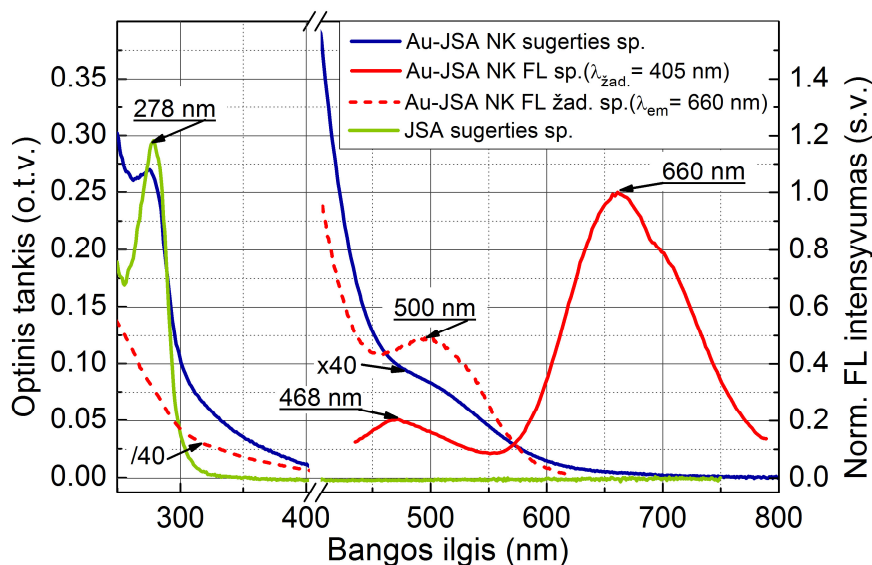
10 000 gyvybingų ląstelių. CellROX Green aktyvių deguonies formų dažo bei JSA-Alexa 488 konjugato fluorescencijai sužadinti naudotas argono jonų lazeris (488 nm), fluorescencija registruota detektoriumi panaudojus 530/30 nm juostinį filtrą. Au-JSA NK susikaupimas ląstelėse išmatuotas fotoluminescenciją žadinant argono jonų lazeriu (488 nm), FL registruota detektoriumi panaudojus 670 nm plačiajuostį filtrą. Duomenys apdoroti Flow Jo (Tree Star, JAV) bei Accuri C6 (Becton Dickinson, JAV) programinėmis įrangomis.

## 4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

### 4.1. Aukso nanoklasterių optinės savybės

#### 4.1.1. Au-JSA NK optinės savybės

Susintetintų Au-JSA nanoklasterių koloidinis tirpalas pasižymėjo sodria rubino spalva dienos šviesoje bei ryškia oranžiniai-raudona fotoluminescencija po UV spinduliuote. Au-JSA nanoklasterių sugerties, fotoluminescencijos bei fotoluminescencijos žadinimo spektrai pristatyti 25 paveiksle.



25 pav. Au-JSA nanoklasterių normuoti sugerties, fotoluminescencijos bei FL žadinimo spektrai dejonizuotame vandenyje; JSA sugerties spektras.

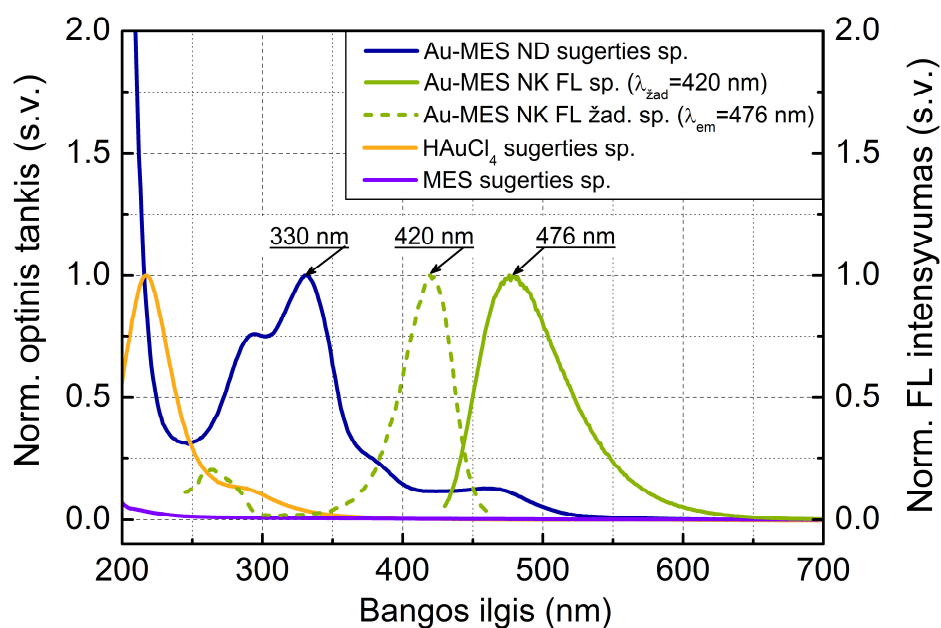
Au-JSA nanoklasterių sugertis išauga trumpabangėje srityje ir turi smailę ties 278 nm, toje pačioje spektrinėje srityje, kurioje sugertimi pasižymi ir grynas jaučio serumo albuminas (25 pav.). Au-JSA nanoklasterių fotoluminescencijos spektras turi dvi smailės regimojoje spektro srityje ties 468 nm ir 660 nm. Sintzei naudotos medžiagos ( $\text{HAuCl}_4$ , JSA) ar jų mišinys nepasižymi fluorescencija raudonoje spektrinėje srityje (600-700 nm) (duomenys nepateikti):  $\text{HAuCl}_4$  iš viso nepasižymi fluorescencija, o JSA fluorescuoja mėlynoje spektrinėje srityje, FL smailės padėtis ties 338 nm ( $\lambda_{\text{žad.}} = 280$  nm). Todėl FL juosta ties 640-700 nm siejama su JSA baltymo molekulėje susiformavusio nanoklasterio fotoluminescencija. Tuo tarpu juosta ties 470 nm Au-JSA NK FL spektre atitinka



baltymo fluorescenciją, kadangi žadinant 405 nm bangos ilgio spinduliuote vandeninis JSA tirpalas pasižymėjo fluorescencija mėlynoje spektrinėje srityje (FL  $\lambda_{\max} \sim 470$  nm) (duomenys nepateikti). Au-JSA nanoklasterių fotoluminescencijos žadinimo spektras, registruojant fotoluminescenciją ties 660 nm, pasižymi smaile ties 500 nm bei šlaitu į ilgabangę spektrinę sritį. Au-JSA nanoklasterių fotoluminescencijos žadinimo spektras nesutampa su sugerties spektru – tik nedidelis petis sugerties spektre buvo išmatuotas ties 500 nm.

Spektrinės Au-JSA NK koloidinio tirpalo savybės (sugerties, fotoluminescencijos intensyvumas, fotoluminescencijos juostos padėtis bei pusplotis) išliko nepakitę daugiau nei vieną mėnesį tirpalą laikant 4°C temperatūroje, tamsoje.

#### 4.1.2. Au-MES NK optinės savybės



26 pav. Au-MES nanoklasterių sugerties, fotoluminescencijos bei FL žadinimo spektrai dejonizuotame vandenyje; HAuCl<sub>4</sub> bei MES sugerties spektrai.

Au-MES NK, susintetintų pagal modifikuotą Bao sintezės protokolą [193], koloidinis tirpalas pasižymėjo sodria raudona spalva dienos šviesoje bei žaliai-mėlyna fotoluminescencija UV spinduliuotėje. Au-MES NK spektrinė charakteristika pateikta 26 paveiksle. Au-MES NK sugerties spektras pasižymėjo pagrindine smaile ties 330 nm ir dviem mažesnio intensyvumo smailėmis ties 290 nm

ir 475 nm bei dar viena mažesnio intensyvumo juosta ties ~390 nm. Au-MES NK sintezei naudotos medžiagos (HAuCl<sub>4</sub>, MES) nepasižymėjo sugertimi minėtose spektrinėse srityse (26 pav.). Au-MES NK koloidinio tirpalo FL spektro smailė buvo ties 476 nm ( $\lambda_{\text{žad.}}=420$  nm). FL žadinimo spektro smailė, registruojant fotoluminescenciją ties 476 nm, išmatuota ties 420 nm, dar viena mažesnio intensyvumo smailė – ties 260 nm. Au-MES NK sugerties spektro forma nesutapo su FL žadinimo spektru, kas rodo, jog koloidinį tirpalą sudaro ne tik fotoluminescuojantys Au-MES NK. Sugerties smailės ties 290, 330, 366 ir 470 nm atitinka nefotoluminescuojančių Au-MES nanodalelių sugertį. Visgi Au-MES NK koloidinis tirpalas nepasižymėjo sugertimi tolimesnėje nei 510 nm spektrinėje srityje, kas rodo, jog tirpale nėra plazmoninėmis savybėmis pasižyminčių aukso nanodalelių [75, 196, 197].

## 4.2. Aukso nanoklasterių dydžio matavimai

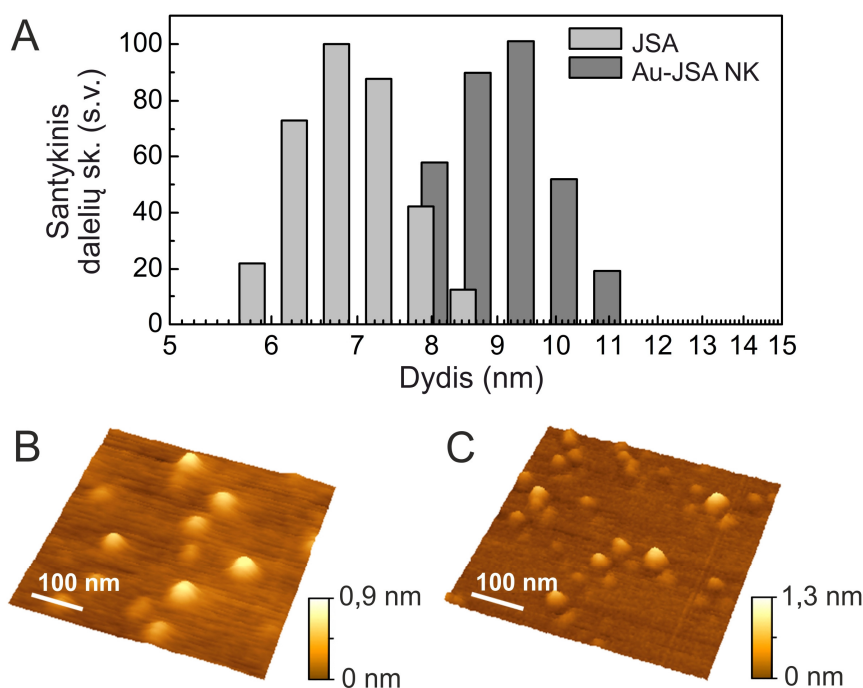
### 4.2.1. Au-JSA NK dydžio matavimai

Nanodalelių dydis – vienas esminių parametru, lemiančių nanodalelių farmakokinetiką, pasiskirstymą gyvame organizme bei pasišalinimą iš jo inkstų kanalais [24]. Hidrodinaminio dydžio matavimai parodė, jog aukso-jaučio serumo albumino (Au-JSA) nanoklasterių dydis dejonizuoto vandens tirpale yra 8-11 nm, daugiausiai išmatuota vidutiniškai 9,4 nm skersmens dalelių. Tuo tarpu JSA molekulių išmatuotas hidrodinaminis dydis buvo 6-8,3 nm, daugiausiai užregistruota vidutiniškai 6,9 nm dydžio dalelių (27 pav. A). JSA hidrodinaminis dydis buvo 2,5 nm mažesnis nei Au-JSA NK, taigi baltyme susifomavęs aukso nanoklasteris lemia išaugusį nanodalelių hidrodinaminį dydį, lyginant su gryno JSA baltymo hidrodinaminiu dydžiu.

Pasitelkus laisvųjų elektronų dujų (želė) modelį iš Au-JSA NK fotoluminescencijos juostos maksimumo padėties (FL  $\lambda_{\text{max}}=660$  nm) apskaičiuotas nanoklasterių sudarančių atomų skaičius  $N$ :

$$N = \left( \frac{e\lambda_{\text{max}}E_f}{hc} \right)^3 \quad (8)$$

kur  $e$  –laisvųjų krūvininkų krūvis,  $\lambda_{\max}$  – fotoluminescencijos juostos maksimumo padėtis (m),  $E_f$  yra begalinio tūrio metalo Fermi energija elektronvoltais,  $h$  – Planck'o konstanta,  $c$  – šviesos greitis. Nustatyta, jog Au NK, pasižymintys fotoluminescencija ties 660 nm, yra sudaryti iš vidutiniškai 29 aukso atomų. Literatūroje paskelbta, jog aukso nanoklasterių, sudarytų iš 25 aukso atomų, skersmuo yra mažesnis nei 1 nm [198, 199]. Tokio dydžio nanoklasterio susiformavimas baltymo struktūroje arba prisijungimas prie jo paviršiaus negalėjo lemti 2,5 nm JSA dydžio pokyčio, išmatuoto dinaminės šviesos sklaidos metodu. Tai rodo, jog išaugęs Au-JSA NK dydis, lyginant su JSA molekulės dydžiu, gali būti sąlygotas antrinės JSA baltymo struktūros pokyčių, atsiradusių dėl aukso nanoklasterio susiformavimo baltyme [112].



**27 pav. Au-JSA NK bei JSA hidrodinaminio dydžio pasiskirstymai, išmatuoti kvazielastinės šviesos sklaidos metodu (A) bei ant žėručio paviršiaus paskleistų JSA (B) ir Au-JSA NK (C) topografijos, išmatuotos atomo jėgos mikroskopu.**

Atomo jėgos mikroskopijos matavimų rezultatai parodė, jog JSA, paskleistas ant žėručio paviršiaus, praranda pailgo elipsoido formą  $14 \times 4 \times 4$  nm [200] ir suplokštėja (27 pav. B). Išmatuotos 0,9 nm aukščio ir 30 skersmens disko formos

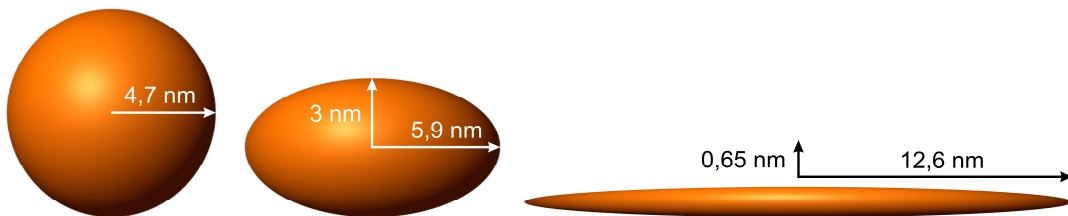
struktūros. Panašūs rezultatai gauti ir Au-JSA NK atveju: atomo jėgos mikroskopu išmatuotų ant žėručio paviršiaus paskleistų Au-JSA nanoklasterių aukštis buvo apie 1,3 nm, o plotis – apie 26 nm (27 pav. C).

Šoninių amino rūgščių grandinių, formuojančių baltymo „griaučius“, sąveikos ir jungtys lemia tretinę baltymo struktūrą. Baltymą perkėlus iš vandeninės aplinkos ant žėručio paviršiaus, baltymą supančios terpės pasikeitimas bei elektrosstatinė sąveika su hidrofiliniu žėručio paviršiumi lemia JSA struktūros pokyčius [201, 202].

Atliekant dalelių hidrodinaminio dydžio matavimus kvazielastinės šviesos sklaidos metodu, dalelių forma yra aproksimuojama sfera. Tokiu atveju Au-JSA nanoklasteriai gali būti aproksimuoti vidutiniškai 9,4 nm skersmens sferomis (27 pav. A). Elipsoido arba sferos tūris gali būti apskaičiuotas:

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot a \cdot b \cdot c \quad (9)$$

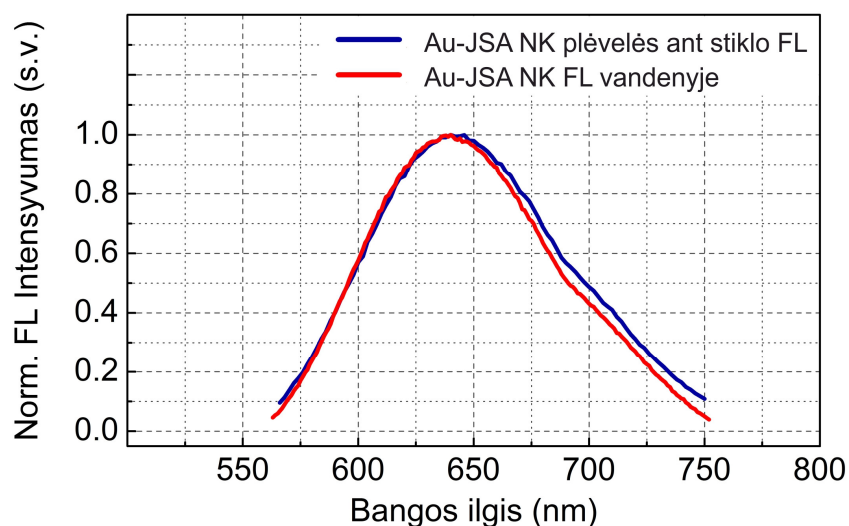
kur a, b ir c yra elipsoido ašių ilgiai (sferos atveju a=b=c). Darant prielaidą, kad ant paviršiaus paskleistų Au-JSA nanoklasterių tūris nepakinta, sfera, kurios skersmuo 9,4 nm (ašys a = b = c = 4,7 nm) suplokštėjusi iki elipsoido, kurio aukštis yra 1,3 nm (a = b, c = 0,65 nm) būtų ~26 nm skersmens (28 pav.).



**28 pav. Teorinis modelis, vaizduojantis Au-JSA nanoklasterių hidrodinaminio dydžio skersmens sferos deformavimą į elipsoidą, kurio aukštis atitinka atomo jėgos mikroskopu išmatuotų nanoklasterių aukštį, išlaikant pastovų tūrį.**

Matematiškai apskaičiuoti suplokštėjusių struktūrų matmenys sutampa su eksperimentiškai atomo jėgos mikroskopu išmatuotais ant žėručio paviršiaus paskleistų Au-JSA NK matmenimis. Taip pat buvo išmatuota, jog ant paviršiaus paskleisti ir išdžiovinti Au-JSA NK išlaiko fotoluminescencines savybes net ir dėl sąveikos su stiklo paviršiumi deformuojantis baltymui (29 pav.). Tai rodo,

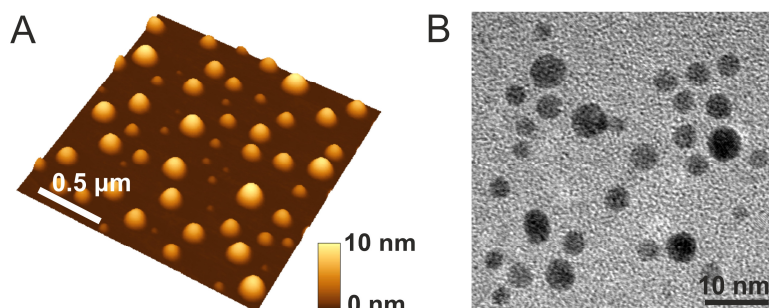
kad susiformavęs aukso nanoklasteris yra itin stabilus. Kadangi ant žėručio paviršiaus paskleistų Au-JSA NK aukštis tesiekė 1,3 nm, o Au NK išlaikė fotoluminescencijos savybes, dar kartą galima įsitikinti, kad aukso nanoklasteris, įsiterpęs į JSA baltymą, turėtų būti mažesnis nei 1,3 nm skersmens.



29 pav. Ant dengiamojo stikliuko paskleistų ir išdžiovintų Au-JSA NK fotoluminescencijos spektras ( $\lambda_{\text{zad.}} = 405 \text{ nm}$ ) bei Au-JSA NK FL spektras tirpale ( $\lambda_{\text{zad.}} = 405 \text{ nm}$ ).

#### 4.2.2. Au-MES NK dydžio matavimai

Au-MES koloidinį tirpalą sudarančių nanodalelių dydžiai buvo išmatuoti atomo jėgos mikroskopijos bei elektronų pralaidumo mikroskopijos metodais. Atomo jėgos mikroskopu išmatuotų ant žėručio paviršiaus paskleistų Au-MES ND aukštis buvo 0,5-10 nm (30 pav. A). Tuo tarpu elektronų pralaidumo mikroskopu buvo išmatuotos 2-6 nm dydžio dalelės (30 pav. B).



30 pav. Au-MES ND, paskleistų ant žėručio paviršiaus, topografija (A), ant anglies plėvelės paskleistų Au-MES ND elektronų pralaidumo mikroskopijos vaizdas (B).

Kaip jau minėta ankstesniame skyrelyje, pasitelkus laisvųjų elektronų dujų modelį fotoluminescuojantį aukso nanoklasterį sudarančių atomų skaičius gali būti apskaičiuotas žinant fotoluminescencijos spektro smailės padėtį. Au-MES nanoklasteriai, pasižymintys fotoluminescencija ties 476 nm bangos ilgiu, turėtų būti sudaryti iš vidutiniškai 9 aukso atomų, ir, nepriklausomai nuo atomų išsidėstymo nanoklasteryje, nanoklasterio dydis neturėtų būti didesnis nei 1 nm. Tokios itin mažos (~0,5 nm) dalelės ir buvo išmatuotos atomo jėgos mikroskopu. Deja, bet elektronų pralaidumo mikroskopu tokio mažo dydžio nanoklasterių užfiksuota nebuvo. Tą galėjo lemti nedidelis kontrastas su anglies plėvele esant tokiam mažam nanoklasterio atomų skaičiui.

Yra duomenų, kad plazmonine sugertimi (lokalizuotu paviršiaus plazmonų rezonansu, LPPR) pasižymi didesnės nei 3 nm dydžio aukso nanodalelės [75]. Tokių nanodalelių LPPR sugerties spektro smailės padėtis yra ties 510 nm. Didesnių nanodalelių LPPR smailė slenkasi į ilgujų bangų spektrinę sritį. Visgi nors atomo jėgos bei elektronų pralaidumo mikroskopijos metodais buvo išmatuota, jog koloidiniame Au-MES ND tirpale yra didesnių nei 3 nm dydžio dalelių, jų sugerties spektro ties 510 nm ar ilgesnių bangų spektrinėje srityje neužfiksuota. Taip yra galimai dėl to, jog tokių mažų nanodalelių plazmoninė sugertis yra mažesnio intensyvumo dėl sutrumpėjusio elektronų laisvojo lėkio [75].

### **4.3. Aukso nanoklasterių fotostabilumo tyrimai**

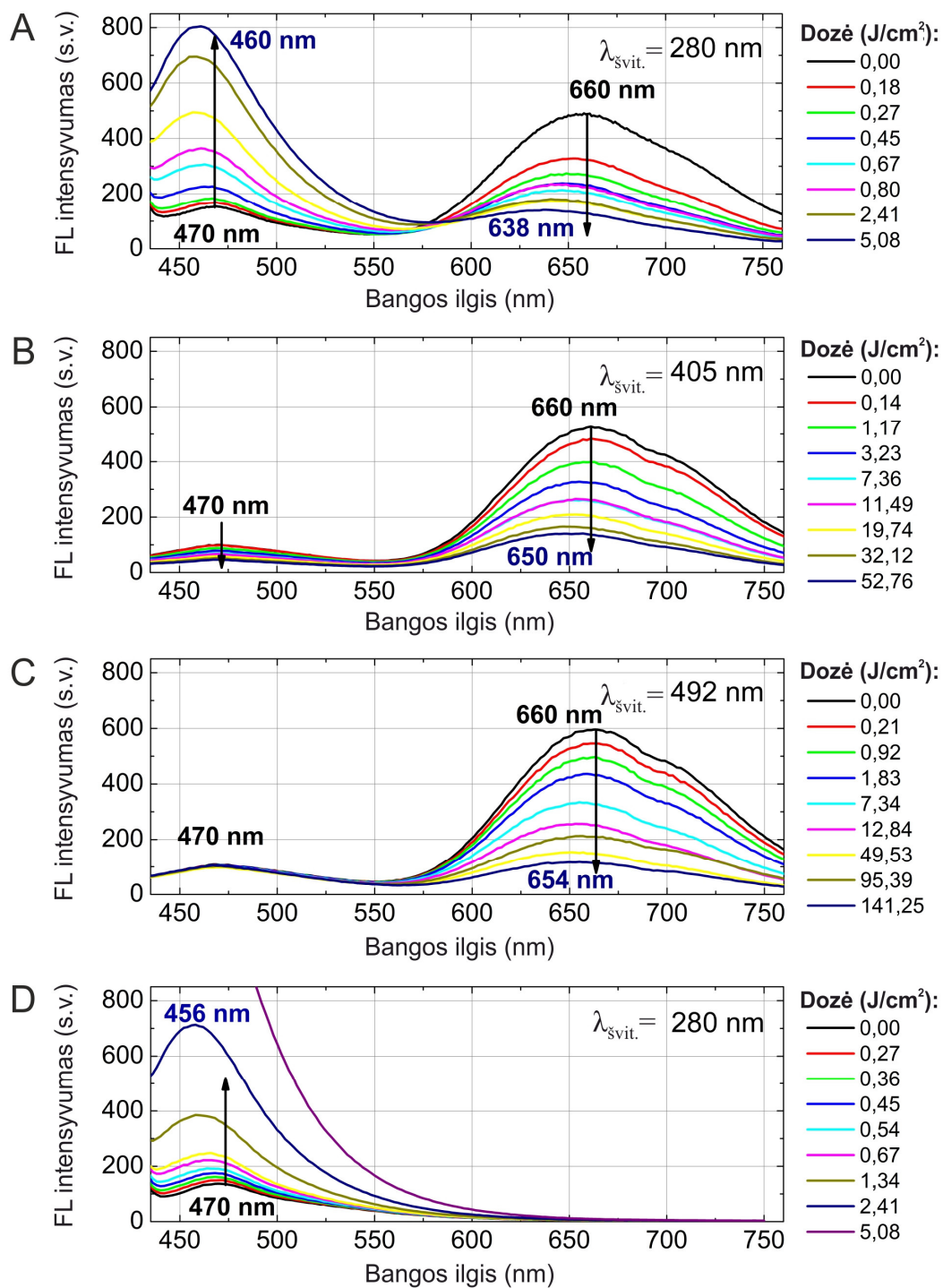
#### ***4.3.1. Au-JSA NK fotostabilumas***

Au-JSA NK fotostabilumo tyrimams buvo pasirinkti trys švitinimo šviesos bangos ilgiai: 280 nm, 405 nm bei 492 nm. 280 nm bangos ilgis pasirinktas siekiant išmatuoti Au-JSA NK stabilumą švitinant į JSA sugerties smailę. 405 nm – mikroskopijoje naudojamas bangos ilgis, labiausiai tinkamas Au-JSA NK FL žadinimui. Tuo tarpu 492 nm bangos ilgis pasirinktas tam, kad nebūtų veikiami FL juosta ties 470 nm.

Au-JSA NK švitinimas UV/Vis spinduliuote sukėlė stiprius ir nuo švitinimo bangos ilgio priklausomus fotoluminescencijos spektro pokyčius. Tuo tarpu pokyčiai sugerties spektre buvo nežymūs.

Švitinant Au-JSA NK koloidinį tirpalą FL juostos ties 660 nm intensyvumas krito nepriklausomai nuo švitinimo bangos ilgio, juosta slinkosi į trumpųjų bangų spektrinę sritį (31 pav. A-C). FL juostos ties 660 nm intensyvumo kritimui galimi keli paaiškinimai. Pirma – tai Au-JSA NK fotosuardymas. Švitinant Au-JSA NK bandinį 405 nm ir 492 nm bangos ilgio spinduliuotėmis, nanoklasterių FL juosta atitinkamai pasislenka iš 660 nm į 650 nm ir 654 nm. Atlikus skaičiavimus pagal 8 formulę, 6-10 nm FL juostos hipsochrominis poslinkis atitiktų nanoklasterio sumažėjimą vidutiniškai vienu-dviem aukso atomais. Švitinimas 280 nm bangos ilgio spinduliuote lėmė didesnę – 22 nm hipsochrominę FL juostos ties 660 nm poslinkį. Toks poslinkis atitiktų 3-4 aukso atomų praradimą. Yra žinoma, kad nanoklasteriai, sudaryti iš tam tikro skaičiaus atomų pasižymi didesniu stabilumu. Tokie skaičiai vadinami „magiškaisiais“. Artimiausias magiškas skaičius 29-iems būtų 25, todėl yra tikėtina, jog švitinant Au-JSA nanoklasterius, jie yra ardomi ir susiformuoja stabilesni 25 atomų aukso nanoklasteriai, kas ir lemia hipsochrominę FL juostos poslinkį. Kita galima FL juostos intensyvumo mažėjimo bei hipsochrominio poslinkio priežastis švitinant Au-JSA NK – nanoklasterių paviršiaus dangalo pažeidimas.

Literatūroje yra parodyta, jog fermentiškai sugeneruotas vandenilio peroksidas  $H_2O_2$  ir fermentinė proteolizė skatina Au-JSA NK dangalo suardymą ir lemia FL juostos intensyvumo mažėjimą ir hipsochrominę poslinkį [198, 203]. Nanodalelių paviršiaus dangalo suardymas dažnai lemia fotoluminescencijos intensyvumo sumažėjimą [164, 194]. Šie du procesai (nanoklasterio suardymas bei paviršiaus dangos irimas) gali vykti kartu ir lemti minėtus spektrinius pokyčius.



31 pav. Au-JSA NK vandeninio tirpalo fotoluminescencijos spektrai bandinį švitinant 280 nm (A), 405 nm (B), 492 nm (C) bangos ilgio spinduliuote, JSA fotoluminescencijos spektras švitinant 280 nm bangos ilgio spinduliuote (D). Fotoluminescencijos spektrai išmatuoti žadinant 405 nm. Rodyklės rodo spektrinius pokyčius didėjant apšvitos dozei.



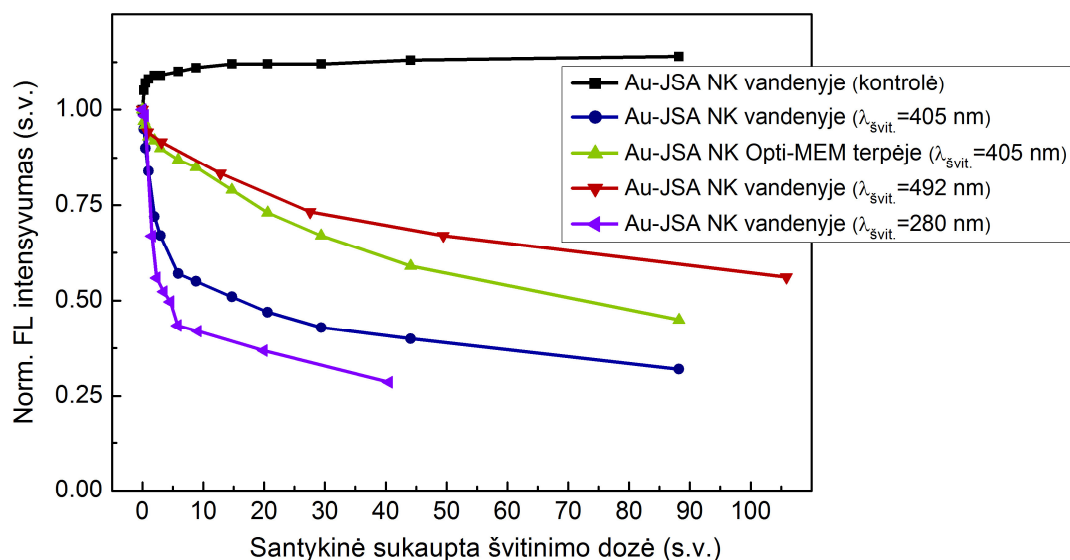
Au-JSA NK švitinant 492 nm spinduliuote visa energija tenka aukso nanoklasteriui, kadangi JSA šioje spektrinėje srityje sugertimi nepasižymi, taigi šiuo atveju tiesioginis baltymo suardymas nėra galimas. Visgi kiti autoriai yra parodę, jog švitinant Au NK yra generuojami laisvieji radikalai [133, 135] ar singuletinis deguonis [138], kurie galėtų netiesiogiai daryti įtaką baltymo struktūrai.

Švitinimas 280 nm bangos ilgio spinduliuote lemia daug spartesnę FL juostos ties 660 nm intensyvumo kritimą ir daug didesnę hipsochrominę FL juostos poslinkį. 280 nm spinduliuotę stipriai sugeria ir JSA, ir jame susiformavęs aukso nanoklasteris, todėl spektriniai pokyčiai gali atsirasti ir dėl Au nanoklasterio, ir dėl dangalo (JSA) irimo. Švitinant JSA tirpalą 280 nm bangos ilgio spinduliuote lemia triptofano fluorescencijos juostos ties 338 nm FL intensyvumo kritimą (duomenys nepateikti). Tai rodo, jog švitinimas 280 nm spinduliuote lemia JSA irimą ir/arba konformacijos pokyčius, dėl ko Au NK gali tapti mažiau apsaugotas nuo tirpiklio (vandens) molekulių – išauga energijos relaksacijos per paviršiaus defektus tikimybė.

Švitinimo UV/Vis spinduliuote poveikis FL juostai ties 470 nm buvo visiškai skirtingas lyginant su poveikiu FL juostai ties 660 nm. Au-JSA NK koloidinį tirpalą švitinant 405 nm spinduliuote, FL juostos ties 660 nm intensyvumas nukrito 73 %, tuo tarpu FL juostos ties 470 nm – 54 %. Švitinant 492 nm spinduliuote FL juostos ties 470 nm intensyvumas praktiškai nesikeitė, tuo tarpu FL juostos ties 660 nm intensyvumas nukrito 80 %. Švitinant Au-JSA NK 280 nm bangos ilgio spinduliuote, FL juostos ties 470 nm intensyvumas išaugo daugiau nei 5 kartus (423 %), kai tuo tarpu FL juostos ties 660 nm intensyvumas nukrito 71,5 %. Labai panašūs rezultatai gauti 280 nm spinduliuote švitinant JSA tirpalą – FL juostos ties 470 nm intensyvumas išaugo – 10 kartų (31 pav. D). Tai parodo, jog FL juosta ties 470 nm nėra susijusi su Au NK fotoluminescencija, bet susijusi su JSA fototransformacija. Švitinant JSA 280 nm bangos ilgio spinduliuote identiškais sąlygomis, FL juostos ties 470 nm intensyvumas išaugo daugiau nei Au-JSA NK atveju sukaupus tą pačią apšvitos dozę. Tai gali būti paaiškinta tuo, kad: pirma – Au-JSA NK atveju dalis spinduliuotės yra sugerama Au

NK ir mažiau žalos padaroma JSA; antra – sužadinta JSA būseną gali būti gėsi-  
nama Au NK. Abu procesai sumašina JSA fototransformacijos proceso efekty-  
vumą.

JSA nesugeria 405 nm bangos ilgio spinduliuotės, todėl švitinant Au-JSA na-  
noklasterių koloidinį tirpalą šiuo bangos ilgiu, JSA fototransformacija nebuvo  
užfiksuota. Visgi JSA fotoproduktas (FL  $\lambda_{\max} = 470$  nm) sugeria 405 nm spin-  
duliuotę, ir švitinimas šiuo bangos ilgiu gali lemti jo fotosuardymą – FL juostos  
ties 470 nm intensyvumas mažėja didėjant sukauptai apšvitos dozei. Švitinimas  
492 nm bangos ilgio spinduliuote nesukėlė jokių FL juostos ties 470 nm bangos  
ilgiu pokyčių, nes nei JSA, nei JSA fotoproduktas nesugeria šio bangos ilgio  
spinduliuotės.



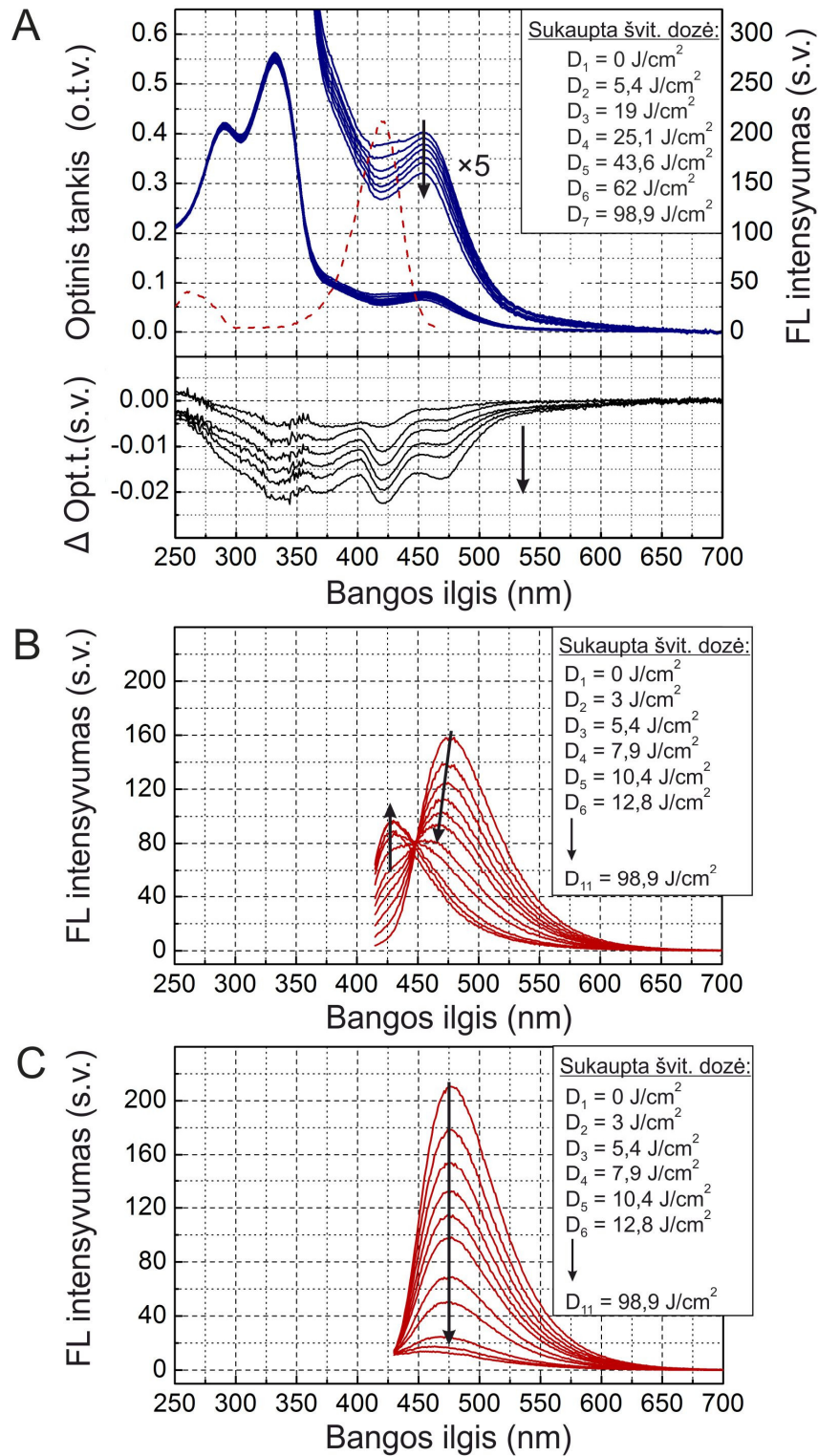
**32 pav.** Normuoto Au-JSA NK FL intensyvumo ties 660 nm ( $\lambda_{\text{žad.}} = 405$  nm) priklausomybė nuo santykinės apšvitos dozės. Normuota į sugertį ties švitinimo bangos ilgiu.

Švitinant Au-JSA NK 405 nm spinduliuote Opti-MEM ląstelių augimo terpėje, nanoklasteriai pasižymėjo didesniu fotostabilumu (32 pav.). Opti-MEM terpę sudaro baltymai ir aminorūgštys, tad išaugęs Au-JSA NK fotostabilumas gali būti nulemtas susiformavusio papildomo dangalo sluoksnio. Literatūroje yra parodyta, kad baltymai gali pagerinti nanodalelių stabilumą bei kvantinį našumą aplink fotoluminescuojančias nanodaleles suformuodami „baltymų vainiką“ [164].

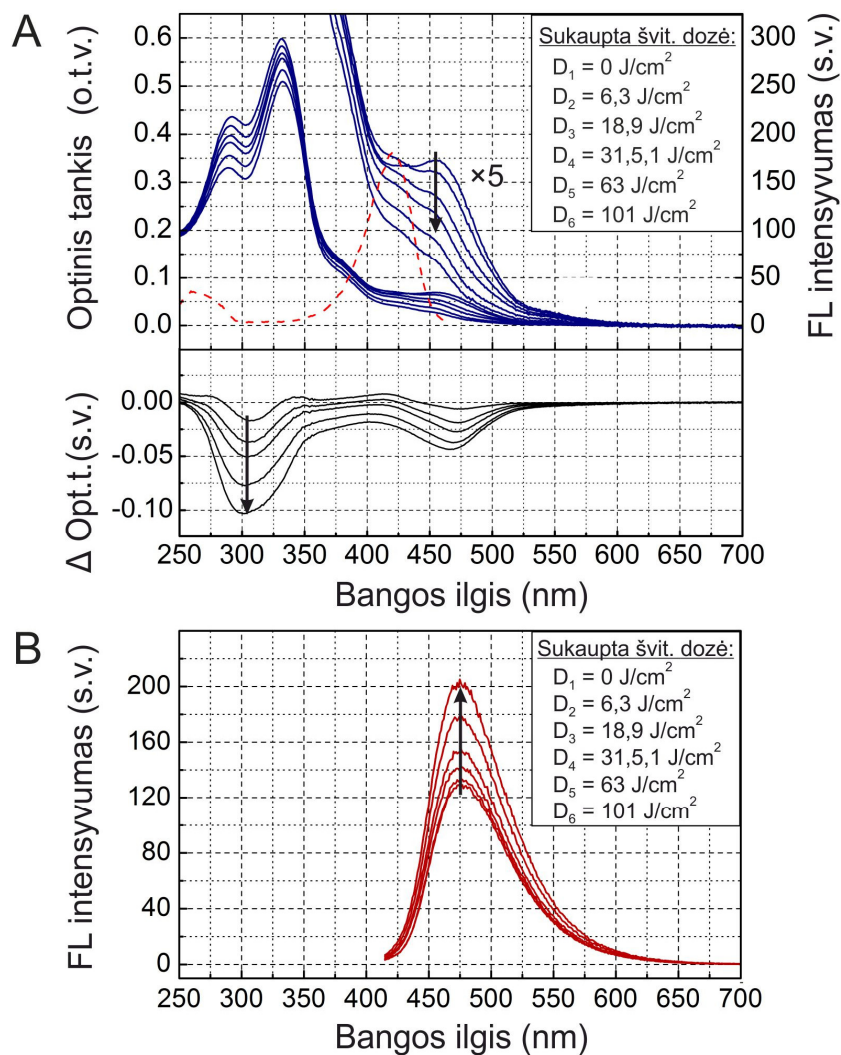
#### **4.3.2. Au-MES NK fotostabilumas**

Au-MES NK fotostabilumo tyrimams, atsižvelgus į sugerties bei fotoluminescencijos žadinimo spektrus buvo pasirinkti keturi švitinimo bangos ilgiai: 330, 366, 402 ir 470 nm.

Pasirinkus švitinimo bangos ilgį, kuris praktiškai pataiko į Au-MES NK FL žadinimo spektro maksimumą ( $\lambda_{\text{švit.}}=402$  nm), didėjant sukauptai apšvitos dozei buvo stebimi nedideli sugerties spektro pokyčiai 250-550 nm spektrinėje srityje (33 pav. A). Sugerties skirtuminiuose spektruose išryškėjo kelios blyškimo juostos ties 290, 330, 366, 420 ir 470 nm. Blyškimo juostos ties 290, 330, 366 ir 470 nm atitiko sugerties juostas Au-MES NK sugerties spektre. Blyškimo juosta ties 420 nm Au-MES NK sugerties spektre neišsiskyrė, tačiau sutapo su Au-MES NK FL žadinimo spektro pagrindine smaile. Tuo pačiu metu, didėjant apšvitos dozei, mažėjo Au-MES NK fotoluminescencijos spektro smailės ties 476 nm ( $\lambda_{\text{žad.}}=405$  nm) intensyvumas, smailė slinkosi į trumpabangę pusę, ties 430 nm formavosi nauja FL juosta (33 pav. B). Didėjant apšvitos dozei, fotoluminescenciją žadinant 420 nm bangos ilgio spinduliuote, FL juostos ties 476 nm padėtis išliko nepakitusi, tik mažėjo FL juostos intensyvumas (33 pav. C).

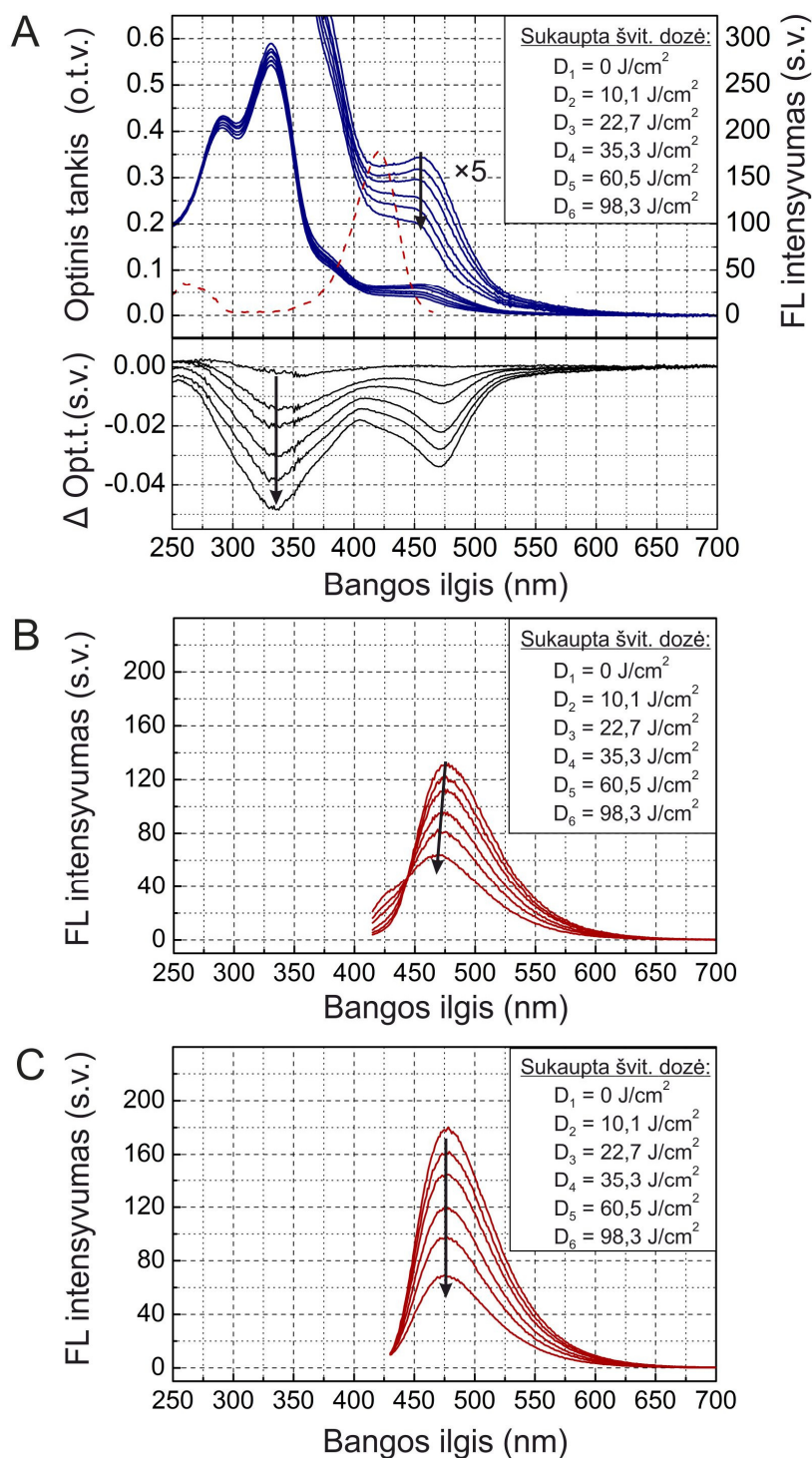


33 pav. Spektriniai Au-MES ND pokyčiai nanodalelių koloidinį vandeninį tirpalą švitinant 402 nm bangos ilgio spinduliuote. Sugerties bei sugerties skirtuminių spektrų pokyčiai, fotoluminescencijos žadinimo spektras ( $\lambda_{em.}=476$  nm) (punktyrinė linija) (A). Au-MES NK fotoluminescencijos spektro pokyčiai ( $\lambda_{žad.}=405$  nm) (B), FL spektro pokyčiai ( $\lambda_{žad.}=420$  nm) (C). Rodyklės parodo pokyčius didėjant sukauptai apšvitos dozei.



34 pav. Spektriniai Au-MES ND pokyčiai nanodalelių koloidinį vandeninį tirpalą švitinant 330 nm bangos ilgio spinduliuote. Sugerties bei sugerties skirtuminių spektrų pokyčiai, fotoluminescencijos žadinimo spektras ( $\lambda_{em.} = 476$  nm) (punktyrinė linija) (A). Au-MES NK fotoluminescencijos spektro pokyčiai ( $\lambda_{\lambda ad.} = 405$  nm) (B). Rodyklės parodo pokyčius didėjant sukauptai apšvitos dozei.

Švitinant Au-MES NK koloidinį tirpalą 330 nm bangos ilgio UV spinduliuote, didžiausi pokyčiai sugerties spektre išmatuoti ties 300 ir 470 nm bangos ilgiais (34 pav.). Tuo pačiu metu buvo stebimas FL juostos ties 476 nm ( $\lambda_{\lambda ad.} = 405$  nm) intensyvumo didėjimas, FL juostos padėtis išliko nepakitusi.



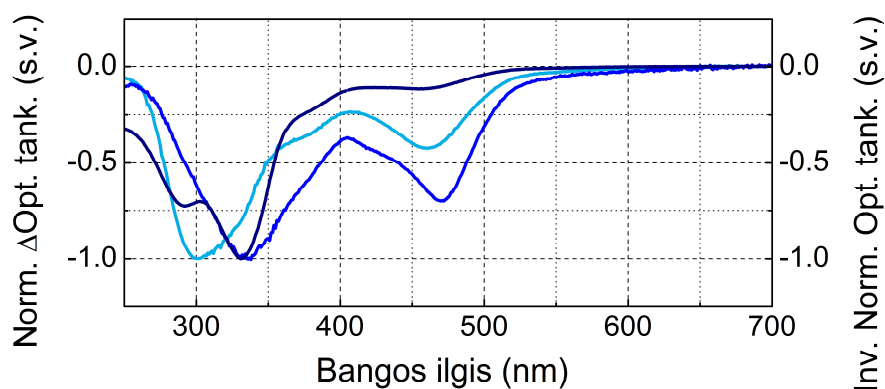
35 pav. Spektriniai Au-MES ND pokyčiai nanodalelių koloidinį vandeninį tirpalą švitinant 366 nm bangos ilgio spinduliuote. Sugerties bei sugerties skirtuminių spektrų pokyčiai, fotoluminescencijos žadinimo spektras ( $\lambda_{em.} = 476 \text{ nm}$ ) (punktyrinė linija) (A). Au-MES NK fotoluminescencijos spektro pokyčiai ( $\lambda_{žad.} = 405 \text{ nm}$ ) (B), FL spektro pokyčiai ( $\lambda_{žad.} = 420 \text{ nm}$ ) (C). Rodyklės parodo pokyčius didėjant sukauptai apšvitos dozei.



Au-MES NK koloidinį tirpalą švitinant 366 nm bangos ilgio spinduliuote didžiausias sugerties sumažėjimas buvo išmatuotas ties 330 ir 470 nm, tai išryškėjo ir sugerties skirtuminiuose spektruose (35 pav.). Šios juostos sutapo su Au-MES ND sugerties spektro juostomis. Fotoluminescencijos spektro pokyčiai buvo panašūs į išmatuotus švitinant 402 nm spinduliuote (33 pav).

Au-MES NK koloidinį tirpalą švitinant 470 nm spinduliuote, pokyčių sugerties ir fotoluminescencijos spektruose užregistruota nebuvo net pasiekus maksimalią  $\sim 100 \text{ J/cm}^2$  sukauptą švitinimo dozę (duomenys nepateikti).

Švitinant Au-MES NK koloidinį tirpalą skirtingo bangos ilgio spinduliuote sugerties skirtuminių spektrų forma nesutapo (36 pav.). Skirtingos sugerties skirtuminių spektrų formos Au-MES ND koloidinį tirpalą švitinant skirtingo bangos ilgio spinduliuote leidžia daryti išvadą, kad mūsų pasirinktų švitinimo bangos ilgių spinduliuotė veikia skirtingo tipo Au-MES ND, ir kad Au-MES ND sugerties spektras yra fotoluminescuojančių Au-MES NK bei mažiausiai dviejų tipų nefotoluminescuojančių Au-MES ND sugerties spektrų superpozicija.



**36 pav. Invertuotas normuotas Au-MES NK sugerties spektras (tamsiai mėlyna kreivė) bei normuoti sugerties skirtuminiai Au-MES NK spektrai, koloidinį tirpalą švitinant 330 nm bangos ilgio spinduliuote (mėlyna kreivė) bei 366 nm bangos ilgio spinduliuote (šviesiai mėlyna kreivė).**

Sugerties blyškimo juostos, sutampančios su FL žadinimo spektro smaile, susiformavimas ties 420 nm sugerties skirtuminiame spektre bei FL intensyvumo ties 476 nm mažėjimas, bandinį švitinant 402 nm spinduliuote, parodė, jog yra ardomi fotoluminescuojantys Au-MES NK. Tuo tarpu FL juostos poslinkis į

trumpabangę spektrinę sritį bei naujos FL juostos susiformavimas ties 430 nm leidžia daryti išvadą, kad bandinį švitinant 402 nm spinduliuote formuojasi naujo tipo fotoluminescuojantys aukso nanoklasteriai. Pasitelkus jau anksčiau aprašytą laisvųjų elektronų dujų modelį, ankstesniame skyriuje (Au-MES ND dydžio matavimai) buvo suskaičiuota, jog Au-MES NK, pasižymintys fotoluminescencija ties 476 nm bangos ilgiu, turėtų būti sudaryti iš vidutiniškai 9 aukso atomų. Šiuo modeliu pagrįsti skaičiavimai rodo, jog nanoklasteriai, kurių fotoluminescencijos juosta yra pasislinkusi į trumpabangę spektrinę sritį, yra sudaryti iš mažiau atomų [8, 134, 204, 205]. Po švitinimo 402 nm bangos ilgio spinduliuote susiformavusi nauja fotoluminescencijos juosta ties 430 nm atitiktų vidutiniškai 7 aukso atomų nanoklasterių fotoluminescenciją.

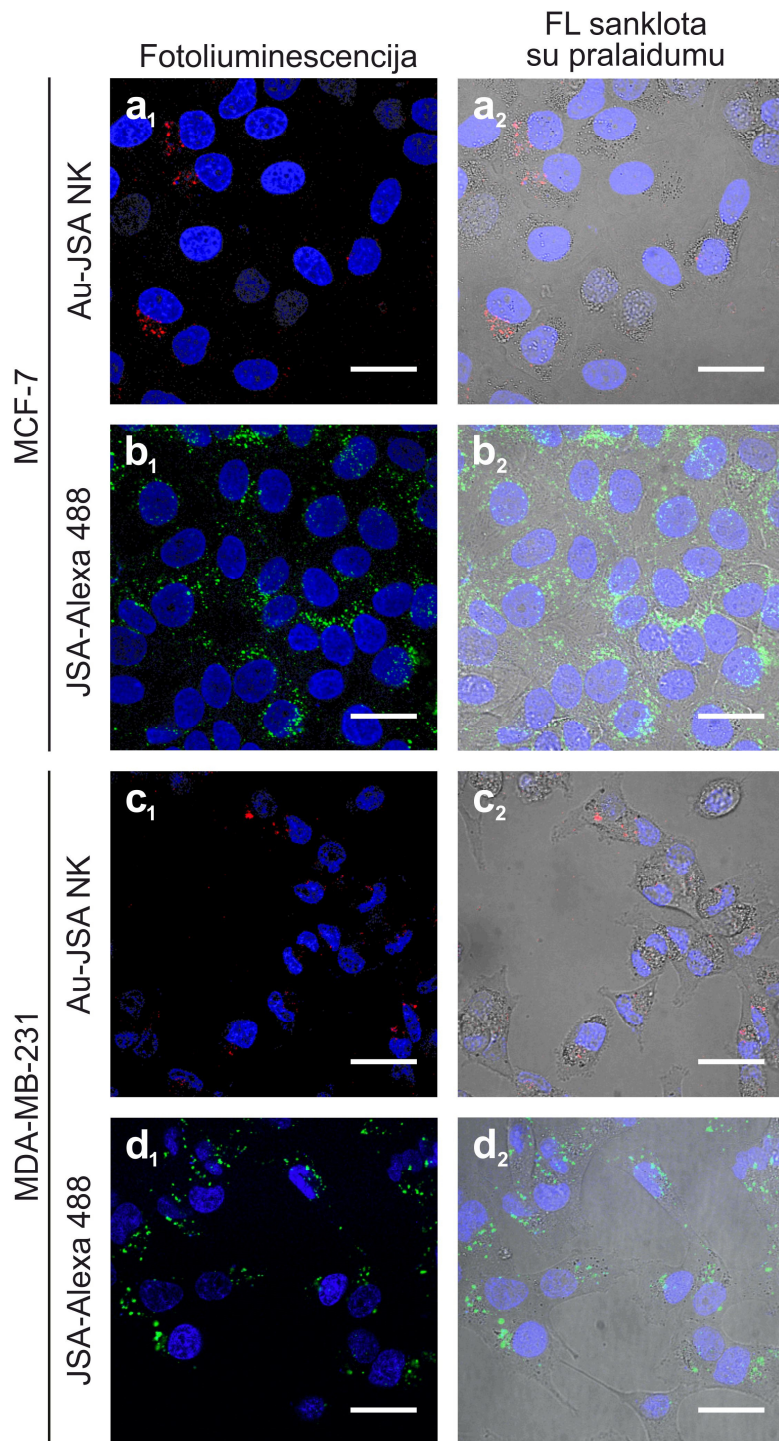
Tuo tarpu Au-MES ND koloidinį tirpalą švitinant 330 nm bangos ilgio spinduliuote išmatuotas sugerties mažėjimas ties 300 nm bei FL intensyvumo augimas ties 476 nm galimai vyko dėl didesnių nefotoluminescuojančių Au-MES nanodalelių ardymo bei fotoluminescuojančių nanoklasterių formavimosi. 330 nm spinduliuotė neturėtų tiesiogiai veikti fotoluminescuojančių nanoklasterių, kadangi FL intensyvumas FL žadinimo spektre ties 330 nm yra nykstamai mažas. Yra žinoma, kad aukso nanodaleles paveikus UV spinduliuote gali būti generuojami hidroksilo radikalai ( $\bullet\text{OH}$ ), singuletinis deguonis ( $^1\text{O}_2$ ) bei superoksido radikalai ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) [133, 134] – aktyvios deguonies formos, kurios galėtų būti aukso nanoklasterių irimo priežastis.

#### **4.4. Aukso nanoklasterių susikaupimo ląstelėse tyrimai**

##### ***4.4.1. Au-JSA NK susikaupimas ląstelėse***

Siekiant įvertinti Au-JSA NK susikaupimą vėžinėse MCF-7 bei MDA-MB-231 ląstelėse, ląstelės buvo inkubuotos Au-JSA NK (56 mg/mL). Palyginimui, įvertinti kaip kaupiasi JSA, ląstelės buvo inkubuotos JSA konjuguotu su Alexa 488 fluorescenciniu žymeniu (JSA-Alexa 488) (0,01 mg/mL). Po 24 h inkubacijos Au-JSA NK buvo užfiksuoti susikaupę MCF-7 ląstelių vezikulėse (37 pav. a<sub>1,2</sub>). Kaip matyti iš mikroskopijos vaizdų, Au-JSA NK susikaupė ne visose ląstelėse.

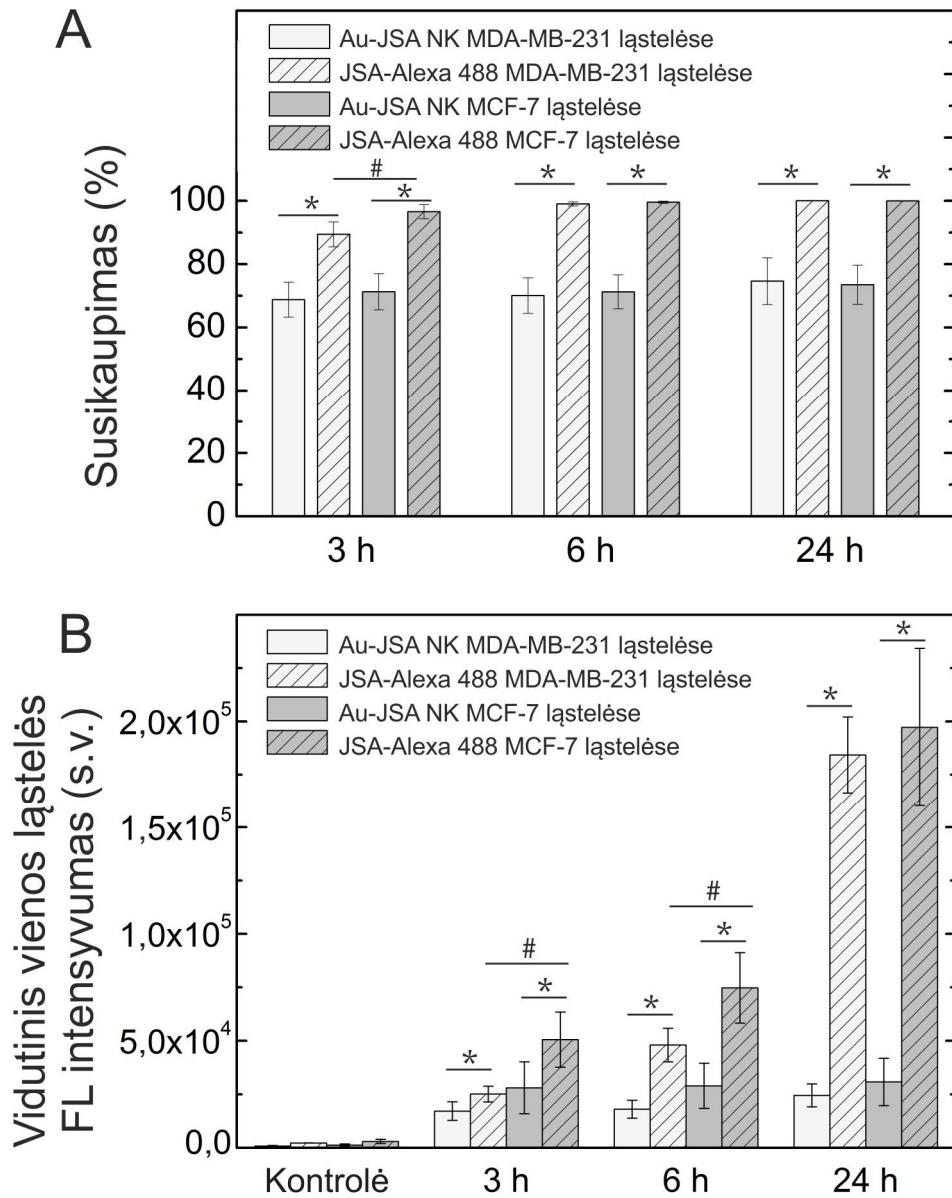




37 pav. Fotoluminescuojančių Au-JSA NK bei JSA-Alexa 488 konjugato susikaupimas MCF-7 ir MDA-MB-231 vėžinėse ląstelėse po 24 h inkubacijos. Vaizdai užregistruoti lazeriniu skenuojančiu konfokaliniu mikroskopu. Skalė – 30  $\mu\text{m}$ . Raudona spalva žymi **Au-JSA NK** ( $\lambda_{\text{zad.}}=488$  nm), žalia - **JSA-Alexa 488 konjugatą** ( $\lambda_{\text{zad.}}=488$  nm), mėlyna – ląstelių branduolius, nudažytus Hoechst 33258 ( $\lambda_{\text{zad.}}=405$  nm).

Tėkmės citometrijos duomenys parodė, jog po 24 h inkubacijos 73,5 % MCF-7 ląstelių buvo sukaupę Au-JSA NK (38 pav. A). Trumpesniais inkubacijos laikais, po 3 h ir 6 h Au-JSA NK atitinkamai buvo sukaupę 71,3 % MCF-7 ląstelių. Tuo tarpu po 24 h inkubacijos su JSA-Alexa 488 konjugatu, praktiškai visose MCF-7 ląstelėse buvo stebimos žaliai fluorescuojančios vezikulės (37 pav. b<sub>1,2</sub>). Tą patvirtino ir tėkmės citometrijos matavimai – po 24 h inkubacijos 100 % MCF-7 ląstelių buvo sukaupę JSA-Alexa 488 konjugato, po 3 h ir 6 h atitinkamai – 96,6 % ir 99,5 % ląstelių (38 pav. A). Au-JSA NK bei JSA-Alexa 488 konjugato susikaupimas MDA-MB-231 vėžinėse ląstelėse buvo labai panašus (37 pav. c<sub>1,2</sub>, d<sub>1,2</sub>). Po 3 h, 6 h ir 24 h inkubacijos atitinkamai 68,8 %, 70,0 % ir 74,6 % MDA-MB-231 ląstelių buvo sukaupę Au-JSA NK. Palyginimui, po 3 h, 6 h ir 24 h inkubacijos atitinkamai 89,4 %, 99,0 % ir 100% ląstelių buvo sukaupę JSA-Alexa 488 konjugato. Tėkmės citometrijos metodu išmatuoti vidutiniai fotoluminescencijos intensyvumai (VFI) vienai ląstelei atskleidė, kaip keitėsi Au-JSA NK bei JSA-Alexa 488 konjugato susikaupimas ilgėjant inkubacijos trukmei. Nustatyta, jog Au-JSA NK susikaupimas ilgėjant inkubacijos trukmei praktiškai nekinta, tuo tarpu JSA-Alexa 488 konjugato vidutinis fluorescencijos intensyvumas po 6 h ir 24 h inkubacijos išaugo 1,5 ir 3,9 kartų. JSA-Alexa 488 konjugato susikaupimo skirtumai MDA-MB-231 ląstelėse buvo dar didesni – po 6 h ir 24 h inkubacijos VFI tenkantis vienai ląstelei išaugo atitinkamai 1,9 ir 7,3 kartų, nepaisant to, kad MDA-MB-231 ląstelės yra šiek tiek mažesnės nei MCF-7 ląstelės [206].

Žymūs Au-JSA NK bei JSA-Alexa 488 konjugato procentinio ląstelių sukau­pimo bei vidutinio vienai ląstelei tenkančio FL intensyvumo skirtumai, išmatuoti tėkmės citometrijos metodu, leidžia daryti prielaidą, jog Au-JSA NK prasčiau kaupiasi ląstelėse dėl po sintezės pakitusio JSA dydžio, kaip jau parodė atomo jėgos mikroskopijos bei dinaminės šviesos sklaidos matavimai. Kiti autoriai yra parodę, jog po sintezės baltyme susiformavus Au NK pakinta ir antrinė JSA struktūra [112], kuri taip pat gali turėti įtakos Au-JSA NK susikaupimui ląste­lėse.



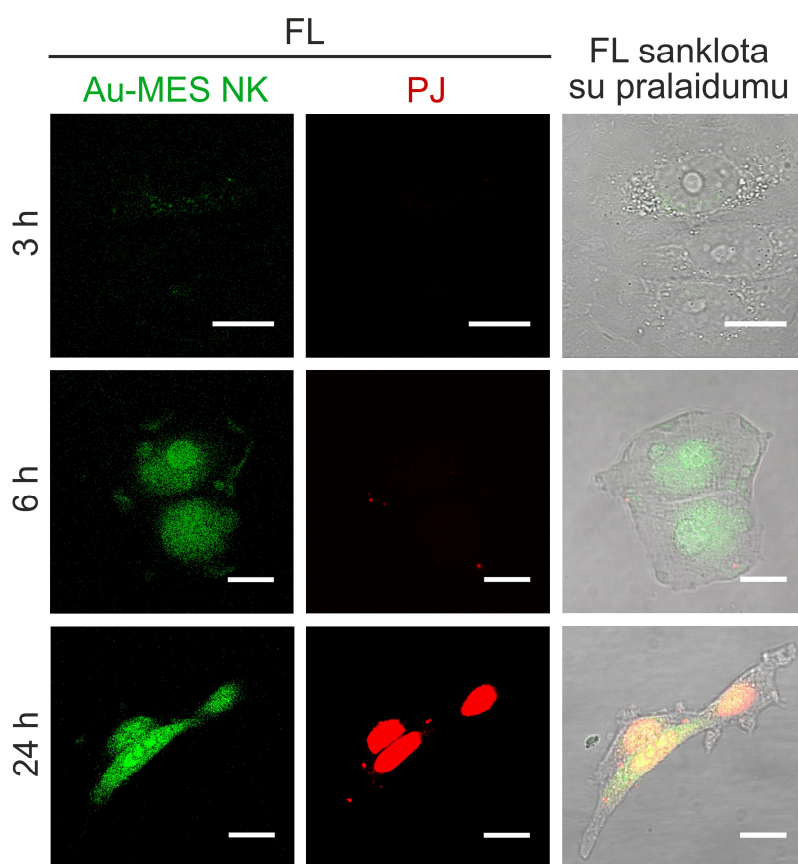
**38 pav. Fotoluminescuojančių Au-JSA NK bei JSA-Alexa 488 konjugato susikaupimas MCF-7 ir MDA-MB-231 vėžinėse ląstelėse po 3, 6 ir 24 h inkubacijos: procentinis Au-JSA NK bei JSA-Alexa 488 konjugatą sukaupusių ląstelių skaičius (A) bei vidutinis FL intensyvumas tenkantis vienai ląstelei (B). Duomenys pateikti suvidurkinus mažiausiai tris nepriklausomų matavimų rezultatus, apskaičiavus standartinę nuokrypį. \* žymi statistiškai patikimus skirtumus tarp Au-JSA NK bei JSA-Alexa 488 konjugato susikaupimo ( $p \leq 0.05$ ); # žymi statistiškai patikimus skirtumus tarp ląstelių linijų ( $p \leq 0.05$ )**

Ir fotoluminescuojantys Au-JSA NK, ir JSA-Alexa 488 konjugatas MDA-MB-231 bei MCF-7 ląstelėse užregistruoti susikaupę vezikulėse, išsidės-

čiusiose palei branduolį, ląstelių branduoliuose šių medžiagų susikaupimo nebuvo pastebėta (37 pav.), kas rodo dalelių pasisavinimą endocitozės būdu. Literatūroje minima, kad JSA į ląsteles patenka nuo kladrino priklausomos endocitozės ir/arba makropinocitozės būdu [171-173].

#### 4.4.2. *Au-MES NK susikaupimas ląstelėse*

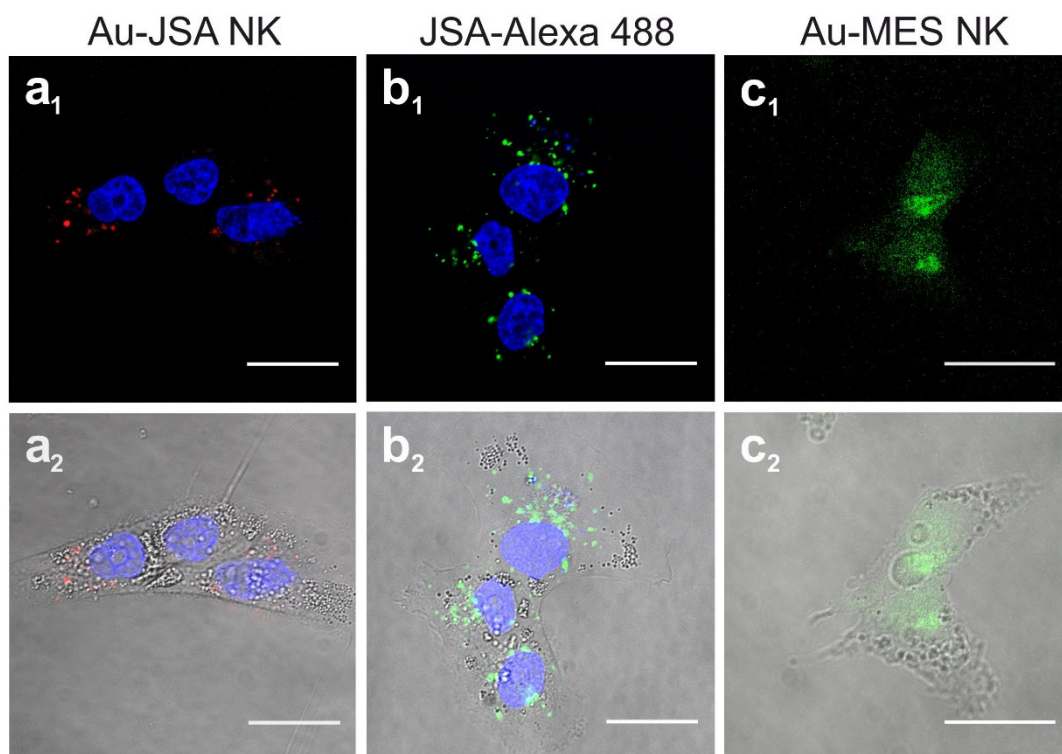
Fotoluminescuojančių Au-MES NK susikaupimas ląstelėse labai skyrėsi nuo Au-JSA NK susikaupimo. Po 3 h inkubacijos su Au-MES NK, MDA-MB-231 ląstelės pasižymėjo visame ląstelių tūryje tolygiai pasiskirsčiusia fotoluminescencija, patenkančia į 450-500 nm spektrinę sritį (39 pav.).



39 pav. Fotoluminescuojančių Au-MES NK susikaupimas MCF-7 vėžinėse ląstelėse po 3, 6 ir 24 h inkubacijos. Vaizdai užregistruoti lazeriniu skenuojančiu konfokaliu mikroskopu. Skalė – 15  $\mu\text{m}$ . Žalia spalva žymi –Au-MES NK ( $\lambda_{\text{zad.}}=405$  nm), raudona – ląstelių gyvybingumo dažą **propidžio jodidą** ( $\lambda_{\text{zad.}}=488$  nm), geltona spalva žymi **kolokalizaciją** – raudonos ir žalios emisijų persiklojimą.



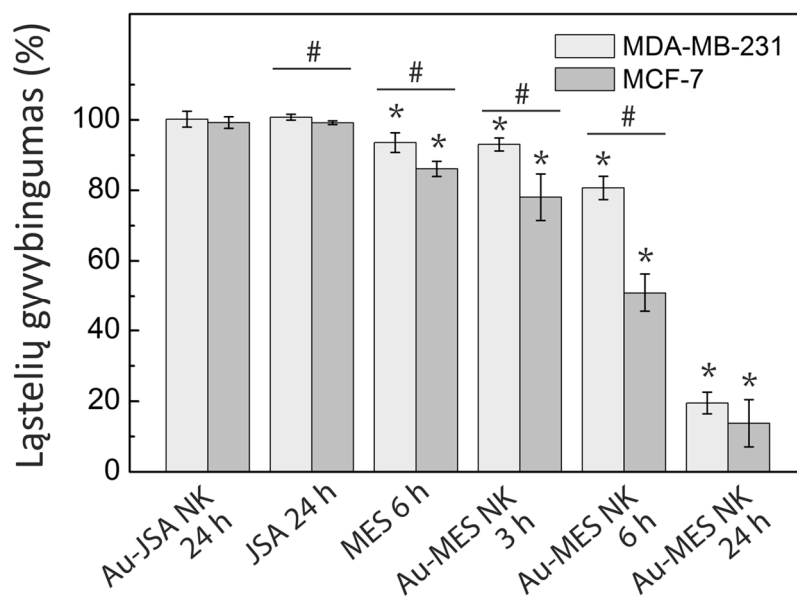
Kontrolinių ląstelių fluorescencija šioje spektrinėje srityje buvo itin mažo intensyvumo. Tik nedidelė dalis ląstelių buvo nusidažę gyvybingumo dažų propidžio jodidu (duomenys nepateikti). Po 6 h inkubacijos fotoluminescencijos intensyvumas ląstelėse išaugo, tačiau ir daugiau ląstelių buvo nusidažę propidžio jodidu, kas rodo išaugusį toksinį poveikį. Po 24 h inkubacijos ląstelių gyvybingumo dažų buvo nusidažiusios beveik visos ląstelės, buvo stebimas gerokai sumažėjęs prie plokštelės paviršiaus prisitvirtinusių ląstelių skaičius šulinėlyje. Palyginus Au-JSA NK, JSA-Alexa 488 konjugato ir Au-MES NK susikaupimą ląstelėse (40 pav.), matyti, jog Au-MES NK, skirtingai nei Au-JSA nanoklasteriai, pasiskirsto difuziškai visame ląstelių tūryje. Fotoluminescuojantys Au-MES NK yra sudaryti iš vidutiniškai 9 aukso atomų, ir yra mažesni nei 0,5 nm, todėl būtent mažas dydis ir lemia Au-MES NK difuzinę pasiskirstymą ląstelėse.



40 pav. Fotoluminescuojančių Au-JSA NK, JSA-Alexa 488 konjugato bei Au-MES NK, susikaupimas MDA-MB-231 ląstelėse. Raudona spalva žymi **Au-JSA NK** ( $\lambda_{\text{zad.}}=488$  nm), žalia - **JSA-Alexa 488 konjugatą** (b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>) ( $\lambda_{\text{zad.}}=488$  nm) bei **Au-MES NK** (c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>) ( $\lambda_{\text{zad.}} = 405$  nm), mėlyna – ląstelių **branduolius**, nudažytus Hoechst 33258 ( $\lambda_{\text{zad.}} = 405$  nm).

Literatūroje yra duomenų, kad mažesnės nei 1,4 nm dydžio aukso nanodalelės ląstelėse ir jų branduoliuose kaupiasi difuziškai [207]. Tikėtina, kad skirtingas dalelių kaupimasis turi įtakos ir dalelių citotoksiškumui – patekusios į branduolį dalelės gali sąveikauti su DNR ir kitomis gyvybiškai svarbiomis molekulėmis taip pažeisdamos ląstelės funkcijas.

#### 4.5. Aukso nanoklasterių poveikio ląstelių gyvybingumui tyrimai



41 pav. MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumo tyrimai po inkubacijos Au-MES NK, Au-JSA NK, JSA bei MES. Duomenys pateikti suvidurkinus mažiausiai tris nepriklausomų matavimų rezultatus, apskaičiavus standartinę nuokrypį. \* žymi statistiškai patikimą skirtumą nuo Au NK neveiktų ląstelių (kontrolės) ( $p \leq 0.05$ ); # žymi statistiškai patikimus skirtumus tarp ląstelių linijų ( $p \leq 0.05$ )

Au-JSA NK bei Au-MES ND toksinis poveikis vėžinių ląstelių gyvybingumui buvo tiriamas ADAM-MC automatinio ląstelių skaičiuokliu. Citotoksiškumo tyrimai atskleidė, jog 24 h inkubacija su Au-JSA NK nesukėlė statistiškai patikimo poveikio MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumui. Citotoksinis poveikis neužregistruotas ir 24 h inkubacijos su JSA atveju. Kitų autorių publikuoti Au-JSA NK citotoksiškumo tyrimai kitų linijų ląstelėse taip pat nerodė toksinio poveikio [174, 208-210], tačiau yra duomenų ir apie sumažėjusį ląstelių gyvybingumą [211].

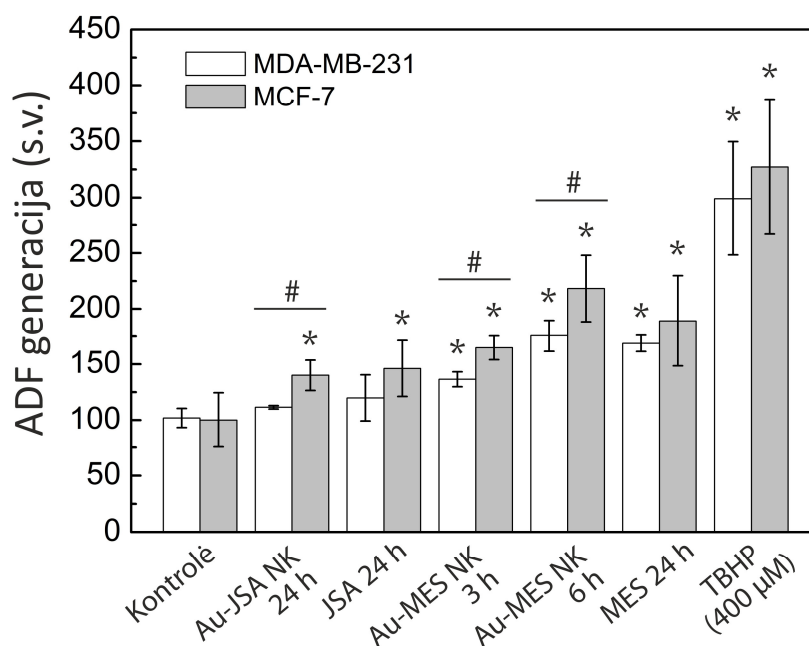
Priešingai, 24 h inkubacija su Au-MES NK labai stipriai paveikė ląstelių gyvybingumą – buvo užregistruota atitinkamai 13,8 % ir 19,5 % gyvybingų MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių (41 pav.). Trumpesni inkubacijos su Au-MES NK laikai sukėlė mažesnę citotoksinę poveikį – po 3 h inkubacijos buvo užregistruota atitinkamai 78,1 % bei 93,1 % gyvybingų MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių (41 pav. B), po 6 h – 50,9 % ir 80,7 %. Citotoksiniškas MES poveikis buvo nedidelis, po 24 h inkubacijos (0,25 M, pH 6.3) MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumas atitinkamai nukrito iki 86,1 % ir 93,6 %. Tuo tarpu literatūroje publikuota, jog  $\text{HAuCl}_4$  mažomis dozėmis nėra toksiškas ląstelėms [212]. Tokį stiprų citotoksinį Au-MES NK poveikį galėjo lemti itin mažas NK dydis ir patekimas į ląstelių branduolius, bei iš to sekanti galima įtaka ląstelės gyvybiniam procesams. Mažesnės nanodalelės dažnai pasižymi didesniu toksiniu poveikiu [27]. Tuo tarpu baltymuose įterptų ar jais dengtų aukso ir kitų tauriųjų metalų ir net puslaidininkinių nanodalelių stabilumas yra didesnis, nei mažos molekulinės masės dangalais dengtų nanodalelių stabilumas, todėl jos pasižymi mažesniu citotoksiniu poveikiu ląstelėms [211, 213, 214]. Visgi apie Au-MES NK citotoksiškumą sunku spręsti, nes šios sintezės metu susiformuoja ir didesnės nefotoluminescuojančios nanodalelės, kurios taip pat gali sąveikauti su ląstelėmis. Taip pat galbūt lieka kitų sintezės komponentų, kaip MES ir  $\text{HAuCl}_4$ , nors mūsų rezultatai rodo, jog MES neturi poveikio ląstelių gyvybingumui.

#### **4.6. Aktyvių deguonies formų generacija ląstelėse**

Siekiant įvertinti galimus Au NK toksiškumo mechanizmus buvo pasirinkta išmatuoti Au NK indukuotą aktyvių deguonies formų (ADF) generaciją ląstelėse. Šio tyrimo metu, po inkubacijos Au NK, ląstelės buvo papildomai inkubuojamos CellROX Green fluorescenciniu aktyvių deguonies formų dažu. ADF generacija buvo vertinama matuojant CellROX Green fluorescenciją ląstelėse tėkmės citometru.

Rezultatai parodė, jog Au-MES NK paveiktose ląstelėse žymiai išauga ADF generacija (42 pav.). Po 3 ir 6 h inkubacijos ADF generacija MDA-MB-231 ląste-

lėse išaugo atitinkamai 36,5 bei 75,6 % lyginant su Au NK neveiktomis ląstelėmis. Au-MES NK poveikis MCF-7 ląstelėms buvo dar didesnis – po 3 ir 6 h inkubacijos ADF generacija išaugo atitinkamai 64,7 ir 118,2 %. 24 h inkubacija MES tirpalu (0,25 M) sukėlė atitinkamai 68,7 ir 89,2 % didesnę ADF generaciją MDA-MB-231 ir MCF-7 ląstelėse nei buvo užregistruota Au NK neveiktų ląstelių atveju. MDA-MB-231 ląstelių inkubacija Au-JSA NK nesukėlė statistiškai patikimo ADF generacijos pokyčio, visgi MCF-7 ląstelėse ADF generacija išaugo 40,1 %. Panašūs rezultatai gauti ląsteles inkubavus atitinkama JSA koncentracija – MDA-MB-231 ląstelėse ADF generacija išaugo 19,8 %, tačiau statistiškai patikimai nesiskyrė nuo Au NK neveiktų ląstelių ADF generacijos, tuo tarpu MCF-7 ląstelėse ADF generacija išaugo 46,2 %.



42 pav. Aktyvių deguonies formų generacija MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelėse po poveikio Au-JSA NK, JSA ir Au-MES NK. Duomenys pateikti suvidurkinus mažiausiai tris nepriklausomų matavimų rezultatus, apskaičiavus standartinį nuokrypį. \* žymi statistiškai patikimą skirtumą nuo Au NK neveiktų ląstelių (kontrolės) ( $p \leq 0.05$ ); # žymi statistiškai patikimus skirtumus tarp ląstelių linijų ( $p \leq 0.05$ )

Kiti autoriai taip pat užregistravo tik nežymų ADF generacijos išaugimą ląsteles inkubavus baltyme įkapsuliuotais Au NK [174], kas rodo, jog baltymo apvalka-



las turi didelę įtaką dalelių biosuderinamumui. Tuo tarpu Au-MES NK, pasiskirstę visame ląstelės tūryje įskaitant ląstelės branduolį, pasižymėjo didesniu poveikiu ląstelių ADF generacijai nei Au-JSA NK. Dėl tokio Au-MES NK pasiskirstymo ląstelėse galimai išaugo nanoklasterių sąveika su ląstelės gyvybiškai svarbiais komponentais, tokiais kaip DNR, dėl ko išmatuotas toksinis poveikis ląstelėms (41 pav.) bei išaugusi ADF generacija (42 pav.). Nanomedžiagų indukuota ADF generacija gali sukelti biologinį stresą bei sutrikdyti pagrindines biologines ląstelės funkcijas, dėl ko gali sutrikti ląstelės ciklas ar net prasidėti apoptozė [185, 190]. Visgi sunku yra vertinti vien tik fotoluminescuojančių Au-MES NK toksiškumą, kadangi sintezės metu susidaro ir nefotoluminescuojančios <10 nm Au-MES ND, todėl reikalingi tolimesni tyrimai šioje srityje.

## 5. IŠVADOS

1. Au-JSA NK sintezės metu susiformuoja vidutiniškai 29 aukso atomų nanoklasteriai, kurie pasižymi fotoluminescencija audinių skaidrumo lango 600-700 nm spektrinėje srityje, todėl galėtų būti panaudoti navikinių darinių fluorescenciniam vaizdinimui. Tuo tarpu Au-MES NK sintezės metu susiformuoja maži, vidutiniškai 9 aukso atomų dydžio mėlynoje spektrinėje srityje fotoluminescuojantys nanoklasteriai, tinkami tyrimams *in vitro*.
2. UV/mėlynos šviesos poveikyje fotoluminescuojantys Au-JSA NK yra nestabilūs, stebimas jų fotoluminescencijos spektro poslinkis į trumpųjų bangų spektrinę sritį. Au-JSA NK irimas priklauso nuo švitinimo bangos ilgio: veikiant  $\lambda = 405$  nm spinduliuote, prarandami 1-2 aukso atomai, kai  $\lambda_{\text{svit.}} = 280$  nm, prarandami 3-4 atomai.
3. UV/mėlynos šviesos poveikyje fotoluminescuojantys Au-MES NK yra nestabilūs. Veikiant 405 nm spinduliuote, Au-MES NK, fotoluminescuojantys ties 476 nm, yra, iš jų formuojasi mažesni, ties 430 nm fotoluminescuojantys Au-MES NK, sudaryti iš vidutiniškai 7 aukso atomų.
4. Mažo dydžio, difuziškai vėžinių ląstelių citoplazmoje ir branduoliuose pasiskirstę Au-MES NK pasižymėjo nuo inkubacijos trukmės priklausomu toksiškumu bei išaugusia aktyvių deguonies formų generacija ląstelėse, todėl nėra tinkami fluorescencinės diagnostikos tyrimams.
5. Susikaupę pūslelėse išsidėsčiusiose palei branduolį Au-JSA NK nesukėlė toksinio poveikio vėžinėms ląstelėms, nors MCF-7 ląstelėse lėmė išaugusią aktyvių deguonies formų generaciją, todėl atlikus tolimesnius tyrimus *in vivo* galėtų būti pritaikyti fluorescenciniam navikų vaizdinimui.

## 6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. World cancer report 2014, B.W. Stewart and C.P. Wild, Editors. International Agency for Research on Cancer: Lyon, France (2014).
2. E.-K. Lim, T. Kim, S. Paik, S. Haam, Y.-M. Huh, and K. Lee, Nanomaterials for theranostics: Recent advances and future challenges, *Chem. Rev.*, **115**(1), 327-394 (2015).
3. N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, and O.C. Farokhzad, Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **66**, 2-25 (2014).
4. L. Dykman and N. Khlebtsov, Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspectives, *Chem. Soc. Rev.*, **41**(6), 2256-2282 (2012).
5. J. Lin, S. Wang, P. Huang, Z. Wang, S. Chen, G. Niu, W. Li, J. He, D. Cui, G. Lu, et al., Photosensitizer-loaded gold vesicles with strong plasmonic coupling effect for imaging-guided photothermal/photodynamic therapy, *ACS Nano*, **7**(6), 5320-5329 (2013).
6. J. Zheng, C.W. Zhang, and R.M. Dickson, Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots, *Phys. Rev. Lett.*, **93**(7), 077402 (2004).
7. C.A.J. Lin, C.H. Lee, J.T. Hsieh, H.H. Wang, J.K. Li, J.L. Shen, W.H. Chan, H.I. Yeh, and W.H. Chang, Synthesis of fluorescent metallic nanoclusters toward biomedical application: Recent progress and present challenges, *J. Med. Biol. Eng.*, **29**(6), 276-283 (2009).
8. S. Palmal and N.R. Jana, Gold nanoclusters with enhanced tunable fluorescence as bioimaging probes, *WIREs Nanomed. Nanobiol.*, **6**(1), 102-110 (2014).
9. R. Weissleder and M.J. Pittet, Imaging in the era of molecular oncology, *Nature*, **452**(7187), 580-589 (2008).
10. S.M. Borisov and O.S. Wolfbeis, Optical Biosensors, *Chem. Rev.*, **108**(2), 423-461 (2008).
11. L. Xi and H. Jiang, Image-guided surgery using multimodality strategy and molecular probes, *WIREs Nanomed. Nanobiol.*, **8**(1), 46-60 (2016).
12. J.R.W. Conway, N.O. Carragher, and P. Timpson, Developments in preclinical cancer imaging: Innovating the discovery of therapeutics, *Nat. Rev. Cancer*, **14**(5), 314-328 (2014).

13. A.L. Vahrmeijer, M. Hutteman, J.R. van der Vorst, C.J.H. van de Velde, and J.V. Frangioni, Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **10**(9), 507-518 (2013).
14. A. Gust, A. Zander, A. Gietl, P. Holzmeister, S. Schulz, B. Lalkens, P. Tinnefeld, and D. Grohmann, A starting point for fluorescence-based single-molecule measurements in biomolecular research, *Molecules*, **19**(10), 15824 (2014).
15. N. Panchuk-Voloshina, R.P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M.K. Bhargava, P.J. Millard, F. Mao, W.Y. Leung, and R.P. Haugland, Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates, *J. Histochem. Cytochem.*, **47**(9), 1179-1188 (1999).
16. J.E. Berlier, A. Rothe, G. Buller, J. Bradford, D.R. Gray, B.J. Filanoski, W.G. Telford, S. Yue, J. Liu, C.-Y. Cheung, et al., Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: Fluorescence of the dyes and their bioconjugates, *J. Histochem. Cytochem.*, **51**(12), 1699-1712 (2003).
17. R. Weissleder, M. Nahrendorf, and M.J. Pittet, Imaging macrophages with nanoparticles, *Nat. Mater.*, **13**(2), 125-138 (2014).
18. U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, and T. Nann, Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels, *Nat. Meth.*, **5**(9), 763-775 (2008).
19. H. Soo Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J.P. Zimmer, B. Iltis, M.G. Bawendi, and J.V. Frangioni, Renal clearance of quantum dots, *Nat. Biotech.*, **25**(10), 1165-1170 (2007).
20. C.T. Yuan, W.C. Chou, J. Tang, C.A. Lin, W.H. Chang, J.L. Shen, and D.S. Chuu, Single fluorescent gold nanoclusters, *Opt. Express*, **17**(18), 16111-16118 (2009).
21. Y.F. Kong, J. Chen, F. Gao, R. Brydson, B. Johnson, G. Heath, Y. Zhang, L. Wu, and D.J. Zhou, Near-infrared fluorescent ribonuclease-A-encapsulated gold nanoclusters: preparation, characterization, cancer targeting and imaging, *Nanoscale*, **5**(3), 1009-1017 (2013).
22. J. Sun, J. Zhang, and Y.D. Jin, 11-Mercaptoundecanoic acid directed one-pot synthesis of water-soluble fluorescent gold nanoclusters and their use as probes

- for sensitive and selective detection of  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{Cr}^{6+}$ , *J Mater Chem C*, **1**(1), 138-143 (2013).
23. C.A.J. Lin, T.Y. Yang, C.H. Lee, S.H. Huang, R.A. Sperling, M. Zanella, J.K. Li, J.L. Shen, H.H. Wang, H.I. Yeh, et al., Synthesis, characterization, and bioconjugation of fluorescent gold nanoclusters toward biological labeling applications, *ACS Nano*, **3**(2), 395-401 (2009).
  24. H. Kawasaki, H. Yamamoto, H. Fujimori, R. Arakawa, Y. Iwasaki, and M. Inada, Stability of the DMF-protected Au nanoclusters: Photochemical, dispersion, and thermal properties, *Langmuir*, **26**(8), 5926-5933 (2010).
  25. H. Kawasaki, K. Yoshimura, K. Hamaguchi, and R. Arakawa, Trypsin-stabilized fluorescent gold nanocluster for sensitive and selective  $\text{Hg}^{2+}$  detection, *Anal. Sci.*, **27**(6), 591-596 (2011).
  26. A. Albanese, P.S. Tang, and W.C.W. Chan, The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **14**, 1-16 (2012).
  27. L. Shang, K. Nienhaus, and G.U. Nienhaus, Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters, *J. Nanobiotechnol.*, **12**(1), 1-5 (2014).
  28. S. Rana, A. Bajaj, R. Mout, and V.M. Rotello, Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**(2), 200-216 (2012).
  29. D. Jaque, L. Martinez Maestro, B. del Rosal, P. Haro-Gonzalez, A. Benayas, J.L. Plaza, E. Martin Rodriguez, and J. Garcia Sole, Nanoparticles for photothermal therapies, *Nanoscale*, **6**(16), 9494-9530 (2014).
  30. L.C. Kennedy, L.R. Bickford, N.A. Lewinski, A.J. Coughlin, Y. Hu, E.S. Day, J.L. West, and R.A. Drezek, A new era for cancer treatment: Gold-nanoparticle-mediated thermal therapies, *Small*, **7**(2), 169-183 (2011).
  31. O.S. Muddineti, B. Ghosh, and S. Biswas, Current trends in using polymer coated gold nanoparticles for cancer therapy, *Int. J. Pharmaceut.*, **484**(1-2), 252-267 (2015).
  32. N. Li, P.X. Zhao, and D. Astruc, Anisotropic gold nanoparticles: Synthesis, properties, applications, and toxicity, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **53**(7), 1756-1789 (2014).

33. S. Alex and A. Tiwari, Functionalized gold nanoparticles: synthesis, properties and applications - A review, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **15**(3), 1869-1894 (2015).
34. R. Chib, S. Butler, S. Raut, S. Shah, J. Borejdo, Z. Gryczynski, and I. Gryczynski, Effect of quencher, denaturants, temperature and pH on the fluorescent properties of BSA protected gold nanoclusters, *J. Luminesc.*, **168**, 62-68 (2015).
35. T.N. Dung, D.J. Kim, and K.S. Kim, Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles, *Micron*, **42**(3), 207-227 (2011).
36. A. Schrofel, G. Kratosova, I. Safarik, M. Safarikova, I. Raska, and L.M. Shor, Applications of biosynthesized metallic nanoparticles - A review, *Acta Biomater.*, **10**(10), 4023-4042 (2014).
37. S. Kumar, V. Lather, and D. Pandita, Green synthesis of therapeutic nanoparticles: an expanding horizon, *Nanomedicine-UK*, **10**(15), 2451-2471 (2015).
38. K. Chaudhari, P.L. Xavier, and T. Pradeep, Understanding the evolution of luminescent gold quantum clusters in protein templates, *ACS Nano*, **5**(11), 8816-8827 (2011).
39. X.C. Qu, Y.C. Li, L. Li, Y.R. Wang, J.N. Liang, and J.M. Liang, Fluorescent gold nanoclusters: Synthesis and recent biological application, *J. Nanomater.*, **6**(784097), 1-23 (2015).
40. D.M. Chevrier, A. Chatt, and P. Zhang, Properties and applications of protein-stabilized fluorescent gold nanoclusters: Short review, *J. Nanophotonics*, **6**(1), 064504 (2012).
41. N. Schaeffer, B. Tan, C. Dickinson, M.J. Rosseinsky, A. Laromaine, D.W. McComb, M.M. Stevens, Y.Q. Wang, L. Petit, C. Barentin, et al., Fluorescent or not? Size-dependent fluorescence switching for polymer-stabilized gold clusters in the 1.1-1.7 nm size range, *Chem. Commun.*, (34), 3986-3988 (2008).
42. X. Huang, Y. Luo, Z. Li, B.Y. Li, H. Zhang, L. Li, I. Majeed, P. Zou, and B.E. Tan, Biolabeling hematopoietic system cells using near-infrared fluorescent gold nanoclusters, *J. Phys. Chem. C*, **115**(34), 16753-16763 (2011).

43. J. Zheng and R.M. Dickson, Individual water-soluble dendrimer-encapsulated silver nanodot fluorescence, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**(47), 13982-13983 (2002).
44. D. Joseph and K.E. Geckeler, Synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters using egg white proteins, *Colloid Surf. B Interf.*, **115**, 46-50 (2014).
45. C.L. Liu, H.T. Wu, Y.H. Hsiao, C.W. Lai, C.W. Shih, Y.K. Peng, K.C. Tang, H.W. Chang, Y.C. Chien, J.K. Hsiao, et al., Insulin-directed synthesis of fluorescent gold nanoclusters: Preservation of insulin bioactivity and versatility in cell imaging, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **50**(31), 7056-7060 (2011).
46. H.C. Yeh, J. Sharma, J.J. Han, J.S. Martinez, and J.H. Werner, A DNA-silver nanocluster probe that fluoresces upon hybridization, *Nano Lett.*, **10**(8), 3106-3110 (2010).
47. J. Zheng, J.T. Petty, and R.M. Dickson, High quantum yield blue emission from water-soluble Au<sub>8</sub> nanodots, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**(26), 7780-7781 (2003).
48. V.S. Myers, M.G. Weir, E.V. Carino, D.F. Yancey, S. Pande, and R.M. Crooks, Dendrimer-encapsulated nanoparticles: New synthetic and characterization methods and catalytic applications, *Chem. Sci.*, **2**(9), 1632-1646 (2011).
49. L. Maya, G. Muralidharan, T.G. Thundat, and E.A. Kenik, Polymer-mediated assembly of gold nanoclusters, *Langmuir*, **16**(24), 9151-9154 (2000).
50. X. Huang, B.Y. Li, L. Li, H. Zhang, I. Majeed, I. Hussain, and B.E. Tan, Facile preparation of highly blue fluorescent metal nanoclusters in organic media, *J. Phys. Chem. C*, **116**(1), 448-455 (2012).
51. Z.X. Wang, B.E. Tan, I. Hussain, N. Schaeffer, M.F. Wyatt, M. Brust, and A.I. Cooper, Design of polymeric stabilizers for size-controlled synthesis of monodisperse gold nanoparticles in water, *Langmuir*, **23**(2), 885-895 (2007).
52. N. Goswami, R. Saha, and S.K. Pal, Protein-assisted synthesis route of metal nanoparticles: exploration of key chemistry of the biomolecule, *J. Nanopart. Res.*, **13**(10), 5485-5495 (2011).
53. Y.L. Xu, J. Sherwood, Y. Qin, D. Crowley, M. Bonizzoni, and Y.P. Bao, The role of protein characteristics in the formation and fluorescence of Au nanoclusters, *Nanoscale*, **6**(3), 1515-1524 (2014).
54. J.P. Xie, Y.G. Zheng, and J.Y. Ying, Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**(3), 888-889 (2009).

55. Y.N. Tan, J.Y. Lee, and D.I.C. Wang, Uncovering the design rules for peptide synthesis of metal nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**(16), 5677-5686 (2010).
56. A.R. Garcia, I. Rahn, S. Johnson, R. Patel, J.R. Guo, J. Orbulescu, M. Micic, J.D. Whyte, P. Blackwelder, and R.M. Leblanc, Human insulin fibril-assisted synthesis of fluorescent gold nanoclusters in alkaline media under physiological temperature, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **105**, 167-172 (2013).
57. H. Wei, Z.D. Wang, L.M. Yang, S.L. Tian, C.J. Hou, and Y. Lu, Lysozyme-stabilized gold fluorescent cluster: Synthesis and application as Hg<sup>2+</sup> sensor, *Analyst*, **135**(6), 1406-1410 (2010).
58. Y. Wang, J.T. Chen, and X.P. Yan, Fabrication of transferrin functionalized gold nanoclusters/graphene oxide nanocomposite for turn-on near-infrared fluorescent bioimaging of cancer cells and small animals, *Anal. Chem.*, **85**(4), 2529-2535 (2013).
59. C.J. Sun, H. Yang, Y. Yuan, X. Tian, L.M. Wang, Y. Guo, L. Xu, J.L. Lei, N. Gao, G.J. Anderson, et al., Controlling assembly of paired gold clusters within apoferritin nanoreactor for in vivo kidney targeting and biomedical imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**(22), 8617-8624 (2011).
60. M. Shamsipur, F. Molaabasi, M. Shanehsaz, and A.A. Moosavi-Movahedi, Novel blue-emitting gold nanoclusters confined in human hemoglobin, and their use as fluorescent probes for copper(II) and histidine, *Microchim. Acta*, **182**(5-6), 1131-1141 (2015).
61. J.M. Liu, J.T. Chen, and X.P. Yan, Near infrared fluorescent trypsin stabilized gold nanoclusters as surface plasmon enhanced energy transfer biosensor and in vivo cancer imaging bioprobe, *Anal. Chem.*, **85**(6), 3238-3245 (2013).
62. H. Kawasaki, K. Hamaguchi, I. Osaka, and R. Arakawa, pH-dependent synthesis of pepsin-mediated gold nanoclusters with blue green and red fluorescent emission, *Adv. Funct. Mater.*, **21**(18), 3508-3515 (2011).
63. P. Couleaud, S. Adan-Bermudez, A. Aires, S.H. Mejias, B. Sot, A. Somoza, and A.L. Cortajarena, Designed modular proteins as scaffolds to stabilize fluorescent nanoclusters, *Biomacromolecules*, **16**(12), 3836-3844 (2015).



64. X. Geng and T.Z. Grove, Repeat protein mediated synthesis of gold nanoparticles: effect of protein shape on the morphological and optical properties, *RSC Adv.*, **5**(3), 2062-2069 (2015).
65. M.A.H. Muhammed, S. Ramesh, S.S. Sinha, S.K. Pal, and T. Pradeep, Two distinct fluorescent quantum clusters of gold starting from metallic nanoparticles by pH-dependent ligand etching, *Nano Res.*, **1**(4), 333-340 (2008).
66. H.F. Qian, Y. Zhu, and R.C. Jin, Size-focusing synthesis, optical and electrochemical properties of monodisperse Au<sub>38</sub>(SC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Ph)<sub>24</sub> nanoclusters, *ACS Nano*, **3**(11), 3795-3803 (2009).
67. P.L. Xavier, K. Chaudhari, A. Baksi, and T. Pradeep, Protein-protected luminescent noble metal quantum clusters: an emerging trend in atomic cluster nanoscience, *Nano Rev.*, **3**, 14767 (2012).
68. A. Sommerfeld, Zur elektronentheorie der metalle auf grund der fermischen statistik, *Zeits. f. Physik*, **47**(1), 1-32 (1928).
69. A. Sommerfeld and H. Bethe, *Elektronentheorie der Metalle*, in: *Handbuch der Physik*, Vol. 24/2 (Springer, Berlin, Heidelberg, 1933).
70. S.A. Maier, *Plasmonics: fundamentals and applications*, (Springer, 2007).
71. M. Quinten, *Optical properties of nanoparticle systems*, (Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, 2011).
72. K.A. Willets and R.P. Van Duyne, Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **58**(1), 267-297 (2007).
73. J.M. Luther, P.K. Jain, T. Ewers, and A.P. Alivisatos, Localized surface plasmon resonances arising from free carriers in doped quantum dots, *Nat. Mater.*, **10**(5), 361-366 (2011).
74. X.M. Lu, M. Rycenga, S.E. Skrabalak, B. Wiley, and Y.N. Xia, Chemical synthesis of novel plasmonic nanoparticles, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **60**, 167-192 (2009).
75. W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, and D.G. Fernig, Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra, *Anal. Chem.*, **79**(11), 4215-4221 (2007).

76. J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán, and P. Mulvaney, Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications, *Coord. Chem. Rev.*, **249**(17–18), 1870-1901 (2005).
77. K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, and G.C. Schatz, The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment, *J. Phys. Chem. B*, **107**(3), 668-677 (2003).
78. N.S. Abadeer, M.R. Brennan, W.L. Wilson, and C.J. Murphy, Distance and plasmon wavelength dependent fluorescence of molecules bound to silica-coated gold nanorods, *ACS Nano*, **8**(8), 8392-8406 (2014).
79. A. Mooradian, Photoluminescence of metals, *Phys. Rev. Lett.*, **22**, 185 (1969).
80. S. Link, A. Beeby, S. FitzGerald, M.A. El-Sayed, T.G. Schaaff, and R.L. Whetten, Visible to infrared luminescence from a 28-atom gold cluster, *J. Phys. Chem. B*, **106**(13), 3410-3415 (2002).
81. H. Haberland, *Clusters of atoms and molecules: theory experiment, and clusters of atoms*, in: Springer Series in Chemical Physics, (Springer-Verlag, Berlin, 1994).
82. R. Kubo, Electronic properties of metallic fine particles, *J Phys Soc Japan*, **17**(6), 975-986 (1962).
83. T.G. Schaaff, G. Knight, M.N. Shafigullin, R.F. Borkman, and R.L. Whetten, Isolation and selected properties of a 10.4 kDa gold: Glutathione cluster compound, *J. Phys. Chem. B*, **102**(52), 10643-10646 (1998).
84. J. Zheng, P.R. Nicovich, and R.M. Dickson, Highly fluorescent noble-metal quantum dots, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **58**, 409-31 (2007).
85. M. Zhu, C.M. Aikens, F.J. Hollander, G.C. Schatz, and R. Jin, Correlating the crystal structure of a thiol-protected Au<sub>25</sub> cluster and optical properties, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**(18), 5883-5885 (2008).
86. K. Clemenger, Ellipsoidal shell structure in free-electron metal clusters, *Phys. Rev. B*, **32**(2), 1359-1362 (1985).
87. J.P. Wilcoxon, J.E. Martin, F. Parsapour, B. Wiedenman, and D.F. Kelley, Photoluminescence from nanosize gold clusters, *J. Chem. Phys.*, **108**(21), 9137-9143 (1998).
88. T. Huang and R.W. Murray, Visible luminescence of water-soluble monolayer-protected gold clusters, *J. Phys. Chem. B*, **105**(50), 12498-12502 (2001).

89. F. Aldeek, M.A.H. Muhammed, G. Palui, N. Zhan, and H. Mattoussi, Growth of highly fluorescent polyethylene glycol- and zwitterion-functionalized gold nanoclusters, *ACS Nano*, **7**(3), 2509-2521 (2013).
90. X.-D. Zhang, Z. Luo, J. Chen, S. Song, X. Yuan, X. Shen, H. Wang, Y. Sun, K. Gao, L. Zhang, et al., Ultrasmall glutathione-protected gold nanoclusters as next generation radiotherapy sensitizers with high tumor uptake and high renal clearance, *Sci. Rep.*, **5**, 8669 (2015).
91. T.H. Chen and W.L. Tseng, (Lysozyme type VI)-stabilized Au<sub>8</sub> clusters: Synthesis mechanism and application for sensing of glutathione in a single drop of blood, *Small*, **8**(12), 1912-1919 (2012).
92. C.-C. Huang, Z. Yang, K.-H. Lee, and H.-T. Chang, Synthesis of highly fluorescent gold nanoparticles for sensing mercury(II), *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**(36), 6824-6828 (2007).
93. H.-C. Chang, Y.-F. Chang, N.-C. Fan, and J.-a.A. Ho, Facile preparation of high-quantum-yield gold nanoclusters: Application to probing mercuric ions and biothiols, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **6**(21), 18824-18831 (2014).
94. L. Shang, R.M. Dorlich, S. Brandholt, R. Schneider, V. Trouillet, M. Bruns, D. Gerthsen, and G.U. Nienhaus, Facile preparation of water-soluble fluorescent gold nanoclusters for cellular imaging applications, *Nanoscale*, **3**(5), 2009-2014 (2011).
95. J. Michl and V. Bonačić-Koutecký, *Electronic aspects of organic photochemistry*, in, (Wiley, New York, 1990) 475.
96. W. Zhang, G. Chen, J. Wang, B.-C. Ye, and X. Zhong, Design and synthesis of highly luminescent near-infrared-emitting water-soluble CdTe/CdSe/ZnS core/shell/shell quantum dots, *Inorg. Chem.*, **48**(20), 9723-9731 (2009).
97. Z. Yuan, Q. Ma, A. Zhang, Y. Cao, J. Yang, and P. Yang, Synthesis of highly luminescent CdTe/ZnO core/shell quantum dots in aqueous solution, *J. Mater. Sci.*, **47**(8), 3770-3776 (2012).
98. C.M. Tyrakowski, A. Shamirian, C.E. Rowland, H. Shen, A. Das, R.D. Schaller, and P.T. Snee, Bright Type II Quantum Dots, *Am. Chem. Soc.*, **27**(21), 7276-7281 (2015).
99. Z. Deng, O. Schulz, S. Lin, B. Ding, X. Liu, X. Wei, R. Ros, H. Yan, and Y. Liu, Aqueous synthesis of zinc blende CdTe/CdS magic-core/thick-shell

- tetrahedral-shaped nanocrystals with emission tunable to near-infrared, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**(16), 5592-5593 (2010).
100. S. Link and M.A. El-Sayed, Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **54**, 331-366 (2003).
  101. J. Wang, G. Wang, and J. Zhao, Density-functional study of  $Au_n$  ( $n=2-20$ ) clusters: Lowest-energy structures and electronic properties, *Phys. Rev. B*, **66**(3), 035418 (2002).
  102. C.M. Aikens, Electronic structure of ligand-passivated gold and silver nanoclusters, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2**(2), 99-104 (2011).
  103. W. An, L. Wintzinger, C.H. Turner, and Y. Bao, A combined computational/experimental study of fluorescent gold nanocluster complexes, *Nano LIFE*, **01**(1&2), 133-143 (2010).
  104. H. Qian, W.T. Eckenhoff, Y. Zhu, T. Pintauer, and R. Jin, Total structure determination of thiolate-protected  $Au_{38}$  nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**(24), 8280-8281 (2010).
  105. C. Zeng, H. Qian, T. Li, G. Li, N.L. Rosi, B. Yoon, R.N. Barnett, R.L. Whetten, U. Landman, and R. Jin, Total structure and electronic properties of the gold nanocrystal  $Au_{36}(SR)_{24}$ , *Angew. Chem. Int. Edit.*, **51**(52), 13114-13118 (2012).
  106. A. Das, T. Li, K. Nobusada, Q. Zeng, N.L. Rosi, and R. Jin, Total structure and optical properties of a phosphine/thiolate-protected  $Au_{24}$  nanocluster, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**(50), 20286-20289 (2012).
  107. C. Zeng, T. Li, A. Das, N.L. Rosi, and R. Jin, Chiral structure of thiolate-protected 28-gold-atom nanocluster determined by X-ray crystallography, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**(27), 10011-10013 (2013).
  108. S. Erkoc, Stability of gold clusters: molecular-dynamics simulations, *Physica E Low Dimens. Syst. Nanostruct.*, **8**(3), 210-218 (2000).
  109. A. Mathew and T. Pradeep, Noble metal clusters: Applications in energy, environment, and biology, *Part. Part. Syst. Char.*, **31**(10), 1017-1053 (2014).
  110. J. Akola, M. Walter, R.L. Whetten, H. Hakkinen, and H. Gronbeck, On the structure of thiolate-protected  $Au_{25}$ , *J. Am. Chem. Soc.*, **130**(12), 3756-3757 (2008).

111. M.W. Heaven, A. Dass, P.S. White, K.M. Holt, and R.W. Murray, Crystal structure of the gold nanoparticle  $[\text{N}(\text{C}_8\text{H}_{17})_4][\text{Au}_{25}(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{Ph})_{18}]$ , *J. Am. Chem. Soc.*, **130**(12), 3754-3755 (2008).
112. X. Le Guevel, B. Hotzer, G. Jung, K. Hollemeyer, V. Trouillet, and M. Schneider, Formation of fluorescent metal (Au, Ag) nanoclusters capped in bovine serum albumin followed by fluorescence and spectroscopy, *J. Phys. Chem. C* **115**(22), 10955–10963 (2011).
113. X.M. Wen, P. Yu, Y.R. Toh, and J. Tang, Structure-correlated dual fluorescent bands in BSA-protected  $\text{Au}_{25}$  nanoclusters, *J. Phys. Chem. C*, **116**(21), 11830-11836 (2012).
114. W.D. Knight, K. Clemenger, W.A. de Heer, W.A. Saunders, M.Y. Chou, and M.L. Cohen, Electronic shell structure and abundances of sodium clusters, *Phys. Rev. Lett.*, **52**(24), 2141-2143 (1984).
115. W.A. de Heer, The physics of simple metal clusters: Experimental aspects and simple models, *Rev. Mod. Phys.*, **65**(3), 611-676 (1993).
116. H.-G. Boyen, G. Kästle, F. Weigl, B. Koslowski, C. Dietrich, P. Ziemann, J.P. Spatz, S. Riethmüller, C. Hartmann, M. Möller, et al., Oxidation-resistant gold-55 clusters, *Science*, **297**(5586), 1533-1536 (2002).
117. Y. Shichibu, K. Suzuki, and K. Konishi, Facile synthesis and optical properties of magic-number  $\text{Au}_{13}$  clusters, *Nanoscale*, **4**(14), 4125-4129 (2012).
118. Y. Negishi, Y. Takasugi, S. Sato, H. Yao, K. Kimura, and T. Tsukuda, Magic-numbered  $\text{Au}_n$  clusters protected by glutathione monolayers ( $n = 18, 21, 25, 28, 32, 39$ ): Isolation and spectroscopic characterization, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**(21), 6518-6519 (2004).
119. J. Akola, K.A. Kacprzak, O. Lopez-Acevedo, M. Walter, H. Grönbeck, and H. Häkkinen, Thiolate-protected  $\text{Au}_{25}$  superatoms as building blocks: Dimers and crystals, *J. Phys. Chem. C*, **114**(38), 15986-15994 (2010).
120. C.E. Román-Velázquez, C. Noguez, and I.L. Garzón, Circular dichroism simulated spectra of chiral gold nanoclusters: A dipole approximation, *J. Phys. Chem. B*, **107**(44), 12035-12038 (2003).
121. C. Zeng, Y. Chen, A. Das, and R. Jin, Transformation chemistry of gold nanoclusters: From one stable size to another, *J. Phys. Chem. Lett.*, **6**(15), 2976-2986 (2015).

122. G.M. Lowman, S.L. Nelson, S.M. Graves, G.F. Strouse, and S.K. Buratto, Polyelectrolyte–quantum dot multilayer films fabricated by combined layer-by-layer assembly and langmuir–schaefer deposition, *Am. Chem. Soc.*, **20**(6), 2057-2059 (2004).
123. B.C. Hess, I.G. Okhrimenko, R.C. Davis, B.C. Stevens, Q.A. Schulzke, K.C. Wright, C.D. Bass, C.D. Evans, and S.L. Summers, Surface transformation and photoinduced recovery in CdSe nanocrystals, *Phys. Rev. Lett.*, **86**(14), 3132-3135 (2001).
124. M. Jones, J. Nedeljkovic, R.J. Ellingson, A.J. Nozik, and G. Rumbles, Photoenhancement of luminescence in colloidal CdSe quantum dot solutions, *J. Phys. Chem. B*, **107**(41), 11346-11352 (2003).
125. J. Aguilera-Sigalat, S. Rocton, J.F. Sanchez-Royo, R.E. Galian, and J. Perez-Prieto, Highly fluorescent and photostable organic- and water-soluble CdSe/ZnS core-shell quantum dots capped with thiols, *RSC Adv.*, **2**(4), 1632-1638 (2012).
126. J. Kimura, T. Uematsu, S. Maenosono, and Y. Yamaguchi, Photoinduced fluorescence enhancement in CdSe/ZnS quantum dot submonolayers sandwiched between insulating layers: Influence of dot proximity, *J. Phys. Chem. B*, **108**(35), 13258-13264 (2004).
127. P. Juzenas, W. Chen, Y.-P. Sun, M.A.N. Coelho, R. Generalov, N. Generalova, and I.L. Christensen, Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**(15), 1600-1614 (2008).
128. Y. Li, W. Zhang, J. Niu, and Y. Chen, Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles, *ACS Nano*, **6**(6), 5164-5173 (2012).
129. G. Pasparakis, Light-induced generation of singlet oxygen by naked gold nanoparticles and its implications to cancer cell phototherapy, *Small*, **9**(24), 4130-4134 (2013).
130. T. Nann, Nanoparticles in Photodynamic Therapy, *Nano Biomed. Eng.*, **3**(2), 137-143 (2011).
131. A.C.S. Samia, X. Chen, and C. Burda, Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**(51), 15736-15737 (2003).

132. P.K. Jain, K.S. Lee, I.H. El-Sayed, and M.A. El-Sayed, Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine, *J. Phys. Chem. B*, **110**(14), 7238-7248 (2006).
133. M. Misawa and J. Takahashi, Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticles under x-ray and UV Irradiations, *Nanomedicine*, **7**(5), 604-14 (2011).
134. L.B. Zhang and E.K. Wang, Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging, *Nano Today*, **9**(1), 132-157 (2014).
135. W. Zhang, Y. Li, J. Niu, and Y. Chen, Photogeneration of reactive oxygen species on uncoated silver, gold, nickel, and silicon nanoparticles and their antibacterial effects, *Langmuir* **29**(15), 4647-4651 (2013).
136. P.K. Jain, W. Qian, and M.A. El-Sayed, Ultrafast cooling of photoexcited electrons in gold nanoparticle-thiolated DNA conjugates involves the dissociation of the gold-thiol bond, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**(7), 2426-2433 (2006).
137. M. Sakamoto, T. Tachikawa, M. Fujitsuka, and T. Majima, Photochemical reactivity of gold clusters: Dependence on size and spin multiplicity, *Langmuir*, **25**(24), 13888-13893 (2009).
138. H. Kawasaki, S. Kumar, G. Li, C.J. Zeng, D.R. Kauffman, J. Yoshimoto, Y. Iwasaki, and R.C. Jin, Generation of singlet oxygen by photoexcited Au<sub>25</sub>(SR)<sub>18</sub> clusters, *Chem. Mater.*, **26**(9), 2777-2788 (2014).
139. J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3<sup>rd</sup> ed, in, (Springer, Singapore, 2006) 954.
140. R. Vankayala, Y.K. Huang, P. Kalluru, C.S. Chiang, and K.C. Hwang, First demonstration of gold nanorods-mediated photodynamic therapeutic destruction of tumors via near infra-red light activation, *Small*, **10**(8), 1612-1622 (2014).
141. T. Zhao, X. Shen, L. Li, Z. Guan, N. Gao, P. Yuan, S.Q. Yao, Q.-H. Xu, and G.Q. Xu, Gold nanorods as dual photo-sensitizing and imaging agents for two-photon photodynamic therapy, *Nanoscale*, **4**(24), 7712-7719 (2012).

142. R. Vankayala, A. Sagadevan, P. Vijayaraghavan, C.L. Kuo, and K.C. Hwang, Metal nanoparticles sensitize the formation of singlet oxygen, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **50**(45), 10640-10644 (2011).
143. R. Vankayala, C.-L. Kuo, A. Sagadevan, P.-H. Chen, C.-S. Chiang, and K.C. Hwang, Morphology dependent photosensitization and formation of singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) by gold and silver nanoparticles and its application in cancer treatment, *J. Mater. Chem. B*, **1**(35), 4379-4387 (2013).
144. M. Rabinovitch, Professional and non-professional phagocytes: an introduction, *Trends Cell. Biol.*, **5**(3), 85-87 (1995).
145. A. Aderem and D.M. Underhill, Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Annu. Rev. Immunol.*, **17**(1), 593-623 (1999).
146. S.D. Conner and S.L. Schmid, Regulated portals of entry into the cell, *Nature*, **422**(6927), 37-44 (2003).
147. Z.G. Qu, X.C. He, M. Lin, B.Y. Sha, X.H. Shi, T.J. Lu, and F. Xu, Advances in the understanding of nanomaterial–biomembrane interactions and their mathematical and numerical modeling, *Nanomedicine*, **8**(6), 995-1011 (2013).
148. Y. Jiang, S.D. Huo, T. Mizuhara, R. Das, Y.W. Lee, S. Hou, D.F. Moyano, B. Duncan, X.J. Liang, and V.M. Rotello, The interplay of size and surface functionality on the cellular uptake of sub-10 nm gold nanoparticles, *ACS Nano*, **9**(10), 9986-9993 (2015).
149. X.W. Ma, Y.Y. Wu, S.B. Jin, Y. Tian, X.N. Zhang, Y.L. Zhao, L. Yu, and X.J. Liang, Gold nanoparticles induce autophagosome accumulation through size-dependent nanoparticle uptake and lysosome impairment, *ACS Nano*, **5**(11), 8629-8639 (2011).
150. K. Saha, S.T. Kim, B. Yan, O.R. Miranda, F.S. Alfonso, D. Shlosman, and V.M. Rotello, Surface functionality of nanoparticles determines cellular uptake mechanisms in mammalian cells, *Small*, **9**(2), 300-305 (2013).
151. S.-H. Wang, C.-W. Lee, A. Chiou, and P.-K. Wei, Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images, *J. Nanobiotechnol.*, **8**(1), 33 (2010).
152. M. Neshatian, S. Chung, D. Yoshan, C. Yang, and B.D. Chithrani, Determining the size dependence of colloidal gold nanoparticle uptake in a tumor-like interface (hypoxic), *Colloids Interface Sci. Commun.*, **1**, 57-61 (2014).



153. F. Lu, S.-H. Wu, Y. Hung, and C.-Y. Mou, Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles, *Small*, **5**(12), 1408-1413 (2009).
154. J.A. Varela, M.G. Bexiga, C. Åberg, J.C. Simpson, and K.A. Dawson, Quantifying size-dependent interactions between fluorescently labeled polystyrene nanoparticles and mammalian cells, *J. Nanobiotechnol.*, **10**(1), 39 (2012).
155. H. Yuan, J. Li, G. Bao, and S. Zhang, Variable nanoparticle-cell adhesion strength regulates cellular uptake, *Phys. Rev. Lett.*, **105**(13), 138101 (2010).
156. R. Vácha, F.J. Martinez-Veracoechea, and D. Frenkel, Receptor-mediated endocytosis of nanoparticles of various shapes, *Nano Lett.*, **11**(12), 5391-5395 (2011).
157. F.M. Kievit and M. Zhang, Cancer nanotheranostics: Improving imaging and therapy by targeted delivery across biological barriers, *Adv. Mater.*, **23**(36), H217-H247 (2011).
158. C. Foerg and H.P. Merkle, On the biomedical promise of cell penetrating peptides: Limits versus prospects, *J. Pharm. Sci.*, **97**(1), 144-162 (2008).
159. D. Osmanovic, A. Fassati, I.J. Ford, and B.W. Hoogenboom, Physical modelling of the nuclear pore complex, *Soft Matter*, **9**(44), 10442-10451 (2013).
160. R. Gamini, W. Han, J.E. Stone, and K. Schulten, Assembly of Nsp1 nucleoporins provides insight into nuclear pore complex gating, *PLOS Comp. Biol.*, **10**(3), e1003488 (2014).
161. M. Tagliazucchi, O. Peleg, M. Kröger, Y. Rabin, and I. Szleifer, Effect of charge, hydrophobicity, and sequence of nucleoporins on the translocation of model particles through the nuclear pore complex, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **110**(9), 3363-3368 (2013).
162. B.D. Chithrani and W.C.W. Chan, Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes, *Nano Lett.*, **7**(6), 1542-1550 (2007).
163. C. Rocker, M. Potzl, F. Zhang, W.J. Parak, and G.U. Nienhaus, A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles, *Nat. Nano.*, **4**(9), 577-580 (2009).

164. V. Poderys, M. Matulionyte, A. Selskis, and R. Rotomskis, Interaction of water-soluble CdTe quantum dots with bovine serum albumin, *Nanoscale Res. Lett.*, **6**(1), 1-6 (2011).
165. M.P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F. Baldelli Bombelli, and K.A. Dawson, Physical–chemical aspects of protein corona: Relevance to *in vitro* and *in vivo* biological impacts of nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**(8), 2525-2534 (2011).
166. Y.K. Lee, E.J. Choi, T.J. Webster, S.H. Kim, and D. Khang, Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity, *Int. J. Nanomed.*, **10**(1), 97-113 (2015).
167. L. Damalakiene, V. Karabanovas, S. Bagdonas, M. Valius, and R. Rotomskis, Intracellular distribution of nontargeted quantum dots after natural uptake and microinjection, *Int. J. Nanomed.*, **8**(1), 555-568 (2013).
168. X. Cheng, X. Tian, A. Wu, J. Li, J. Tian, Y. Chong, Z. Chai, Y. Zhao, C. Chen, and C. Ge, Protein corona influences cellular uptake of gold nanoparticles by phagocytic and nonphagocytic cells in a size-dependent manner, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **7**(37), 20568-20575 (2015).
169. A. Salvati, A.S. Pitek, M.P. Monopoli, K. Prapainop, F.B. Bombelli, D.R. Hristov, P.M. Kelly, C. Aberg, E. Mahon, and K.A. Dawson, Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface, *Nat. Nanotechnol.*, **8**(2), 137-143 (2013).
170. C.Q. Ding and Y. Tian, Gold nanocluster-based fluorescence biosensor for targeted imaging in cancer cells and ratiometric determination of intracellular pH, *Biosens. Bioelectron.*, **65**, 183-190 (2015).
171. R. Yumoto, H. Nishikawa, M. Okamoto, H. Katayama, J. Nagai, and M. Takano, Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN, *Am. J. Physiol-Lung C*, **290**(5), L946-L955 (2006).
172. J. Eyre, K. Ioannou, B.D. Grubb, M.A. Saleem, P.W. Mathieson, N.J. Brunskill, E.I. Christensen, and P.S. Topham, Statin-sensitive endocytosis of albumin by glomerular podocytes, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **292**(2), F674-F681 (2007).

173. E. Dobrinskikh, K. Okamura, J.B. Kopp, R.B. Doctor, and J. Blaine, Human podocytes perform polarized, caveolae-dependent albumin endocytosis, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **306**(9), F941-F951 (2014).
174. A. Retnakumari, S. Setua, D. Menon, P. Ravindran, H. Muhammed, T. Pradeep, S. Nair, and M. Koyakutty, Molecular-receptor-specific, non-toxic, near-infrared-emitting Au cluster-protein nanoconjugates for targeted cancer imaging, *Nanotechnology*, **21**(5), 055103 (2010).
175. Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, and W. Jahnen-Dechent, Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles, *Small*, **3**(11), 1941-1949 (2007).
176. J. Park, D.-H. Lim, H.-J. Lim, T. Kwon, J.-s. Choi, S. Jeong, I.-H. Choi, and J. Cheon, Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticles, *Chem. Commun.*, **47**(15), 4382-4384 (2011).
177. R. Coradeghini, S. Gioria, C.P. García, P. Nativo, F. Franchini, D. Gilliland, J. Ponti, and F. Rossi, Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts, *Toxicol. Lett.*, **217**(3), 205-216 (2013).
178. H. Yin, H.P. Too, and G.M. Chow, The effects of particle size and surface coating on the cytotoxicity of nickel ferrite, *Biomaterials*, **26**(29), 5818-5826 (2005).
179. W.J. Cui, J.R. Li, Y.K. Zhang, H.L. Rong, W.S. Lu, and L. Jiang, Effects of aggregation and the surface properties of gold nanoparticles on cytotoxicity and cell growth, *Nanomedicine*, **8**(1), 46-53 (2012).
180. X.Q. Li, J.R. Li, and L. Jiang, A silica-gold core-shell structure to mimic the large size of gold particles for promoting cell growth: A comparative study of the silica core size and the nanogold amount in the shell, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **459**(5), 211-216 (2014).
181. H.Y. Gu, Z. Chen, R.X. Sa, S.S. Yuan, H.Y. Chen, Y.T. Ding, and A.M. Yu, The immobilization of hepatocytes on 24 nm-sized gold colloid for enhanced hepatocytes proliferation, *Biomaterials*, **25**(17), 3445-3451 (2004).
182. E.J. Park, J. Yi, Y.H. Chung, D.Y. Ryu, J. Choi, and K. Park, Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells, *Toxicol. Lett.*, **180**(3), 222-229 (2008).

183. M.I. Setyawati, W.R. Fang, S.L. Chia, and D.T. Leong, Nanotoxicology of common metal oxide based nanomaterials: their ROS-y and non-ROS-y consequences, *Asia-Pac. J. Chem. Eng.*, **8**(2), 205-217 (2013).
184. B. Song, Y.L. Zhang, J. Liu, X.L. Feng, T. Zhou, and L.Q. Shao, Is neurotoxicity of metallic nanoparticles the cascades of oxidative stress?, *Nanoscale Res. Lett.*, **11**(1), 291 (2016).
185. P.P. Fu, Q.S. Xia, H.M. Hwang, P.C. Ray, and H.T. Yu, Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species, *J. Food Drug Anal.*, **22**(1), 64-75 (2014).
186. K. Hensley, K.A. Robinson, S.P. Gabbita, S. Salsman, and R.A. Floyd, Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury, *Free Radic. Biol. Med.*, **28**(10), 1456-1462 (2000).
187. T. Finkel, Signal transduction by mitochondrial oxidants, *J. Biol. Chem.*, **287**(7), 4434-4440 (2012).
188. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**(1), 44-84 (2007).
189. H. Sauer, M. Wartenberg, and J. Hescheler, Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation, *Cell Physiol. Biochem.*, **11**(4), 173-186 (2001).
190. A. Manke, L.Y. Wang, and Y. Rojanasakul, Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity, *Biomed. Res. Int.*, **20**, 942916 (2013).
191. Y. Pan, A. Leifert, D. Ruau, S. Neuss, J. Bornemann, G. Schmid, W. Brandau, U. Simon, and W. Jahnen-Dechent, Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage, *Small*, **5**(18), 2067-2076 (2009).
192. V. Poderys, M. Matulionyte-Safine, D. Rupsys, and R. Rotomskis, Protein stabilized Au nanoclusters: Spectral properties and photostability, *Lith. J. Phys.*, **56**(1), 55-65 (2016).
193. Y.P. Bao, H.C. Yeh, C. Zhong, S.A. Ivanov, J.K. Sharma, M.L. Neidig, D.M. Vu, A.P. Shreve, R.B. Dyer, J.H. Werner, et al., Formation and stabilization of fluorescent gold nanoclusters using small molecules, *J. Phys. Chem. C*, **114**(38), 15879-15882 (2010).

194. M. Matulionyte, R. Marcinonyte, and R. Rotomskis, Photoinduced spectral changes of photoluminescent gold nanoclusters, *J. Biomed. Opt.*, **20**(5), 051018 (2015).
195. 90Plus/BI-MAS multi angle particle sizing option operation manual, B. Inc., (1995).
196. V. Amendola and M. Meneghetti, Size evaluation of gold nanoparticles by UV-Vis spectroscopy, *J. Phys. Chem. C*, **113**(11), 4277-4285 (2009).
197. P.N. Njoki, I.I.S. Lim, D. Mott, H.Y. Park, B. Khan, S. Mishra, R. Sujakumar, J. Luo, and C.J. Zhong, Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles, *J. Phys. Chem. C*, **111**(40), 14664-14669 (2007).
198. L.H. Jin, L. Shang, S.J. Guo, Y.X. Fang, D. Wen, L. Wang, J.Y. Yin, and S.J. Dong, Biomolecule-stabilized Au nanoclusters as a fluorescence probe for sensitive detection of glucose, *Biosens. Bioelectron.*, **26**(5), 1965-1969 (2011).
199. Z. Wu and R. Jin, On the ligand's role in the fluorescence of gold nanoclusters, *Nano Lett.*, **10**(7), 2568-73 (2010).
200. A.K. Wright and M.R. Thompson, Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence, *Biophys. J.*, **15**(2 Pt 1), 137-41 (1975).
201. A.M. Moulin, S.J. O'Shea, R.A. Badley, P. Doyle, and M.E. Welland, Measuring surface-induced conformational changes in proteins, *Langmuir*, **15**(26), 8776-8779 (1999).
202. J.L. Brash and T.A. Horbett, *Proteins at Interfaces*, in *Proteins at interfaces II*. (American Chemical Society, 1995) pp. 1-23.
203. X.X. Wang, Y.Y. Wang, H.B. Rao, and Z. Shan, A sensitive fluorescent assay for trypsin activity in biological samples using BSA-Au nanoclusters, *J. Brazil. Chem. Soc.*, **23**(11), 2011-2015 (2012).
204. X. Yuan, Z.T. Luo, Y. Yu, Q.F. Yao, and J.P. Xie, Luminescent noble metal nanoclusters as an emerging optical probe for sensor development, *Chem-Asian J.*, **8**(5), 858-871 (2013).
205. C. Zhou, S.Y. Yang, J.B. Liu, M.X. Yu, and J. Zheng, Luminescent gold nanoparticles: A new class of nanoprobe for biomedical imaging, *Exp. Biol. Med.*, **238**(11), 1199-1209 (2013).

206. S. Steponkiene, D. Dapkute, U. Riekstina, and R. Rotomskis, Accumulation and distribution of non-targeted and anti-CD44-conjugated quantum dots in distinct phenotypes of breast cancer, *J. Nanomed. Nanotechnol.*, **6**(6), 1000341 (2015).
207. H.Y. Chen, B.W. Li, C. Wang, X. Zhang, Z.Q. Cheng, X. Dai, R. Zhu, and Y.Q. Gu, Characterization of a fluorescence probe based on gold nanoclusters for cell and animal imaging, *Nanotechnology*, **24**(5), 055704 (2013).
208. H.Y. Chen, B.W. Li, X.Y. Ren, S.N. Li, Y.X. Ma, S.S. Cui, and Y.Q. Gu, Multifunctional near-infrared-emitting nano-conjugates based on gold clusters for tumor imaging and therapy, *Biomaterials*, **33**(33), 8461-8476 (2012).
209. H.Y. Chen, S.L. Li, B.W. Li, X.Y. Ren, S.N. Li, D.M. Mahounga, S.S. Cui, Y.Q. Gu, and S. Achilefu, Folate-modified gold nanoclusters as near-infrared fluorescent probes for tumor imaging and therapy, *Nanoscale*, **4**(19), 6050-6064 (2012).
210. W.J. Zhang, J. Ye, Y.Y. Zhang, Q.W. Li, X.W. Dong, H. Jiang, and X.M. Wang, One-step facile synthesis of fluorescent gold nanoclusters for rapid bio-imaging of cancer cells and small animals, *RSC Adv.*, **5**(78), 63821-63826 (2015).
211. L.Y. Dong, M.L. Li, S. Zhang, J. Li, G. Shen, Y. Tu, J. Zhu, and J. Tao, Cytotoxicity of BSA-stabilized gold nanoclusters: *In vitro* and *in vivo* study, *Small*, **11**(21), 2571-2581 (2015).
212. B.S. Ramesh, E. Giorgakis, V. Lopez-Davila, A.K. Dashtarzheneha, and M. Loizidou, Detection of cell surface calreticulin as a potential cancer biomarker using near-infrared emitting gold nanoclusters, *Nanotechnology*, **27**(28), 285101 (2016).
213. Y.J. Li, L.Z. Feng, X.Z. Shi, X.J. Wang, Y.L. Yang, K. Yang, T. Liu, G.B. Yang, and Z. Liu, Surface coating-dependent cytotoxicity and degradation of graphene derivatives: Towards the design of non-toxic, degradable nanographene, *Small*, **10**(8), 1544-1554 (2014).
214. J.H. Shannahan, R. Podila, A.A. Aldossari, H. Emerson, B.A. Powell, P.C. Ke, A.M. Rao, and J.M. Brown, Formation of a protein corona on silver nanoparticles mediates cellular toxicity via scavenger receptors, *Toxicol. Sci.*, **143**(1), 136-146 (2015).