

ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
(СПбГУ)

Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров  
Направление «Физика»



**СИНТЕЗ И ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ  
МЕТАЛЛИЧЕСКИХ КЛАСТЕРОВ,  
СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ БЕЛКАМИ  
АЛЬБУМИНОВОЙ ГРУППЫ**

Бакалаврская работа студента

\_\_\_\_\_ **Соболева Максима Евгеньевича**

Научный руководитель:

\_\_\_\_\_ к. ф.-м. н., доц. **Кононов А.И.**

Рецензент:

\_\_\_\_\_ к. ф.-м. н., снс **Мельников А.С.**

Санкт-Петербург  
2017

## Оглавление:

Введение.....	3
Литературный обзор.....	4
Методы исследования и используемые материалы.....	10
Используемые системы и их подготовка к исследованию.....	10
Сывороточные альбумины.....	10
Стационарная люминесценция.....	11
Время жизни люминесценции.....	12
Результаты и обсуждение.....	14
Определение оптимального протокола синтеза.....	14
Измерение времени жизни люминесценции.....	18
Влияние кислотности среды на флуоресценцию.....	20
Заключение и выводы.....	22
Благодарности.....	23
Используемая литература.....	24

## **Введение.**

В настоящее время принято называть частицы размером от 2 нм до 100 нм наночастицами, частицы размером меньше, чем 2 нм – нанокластерами, а меньше 1 нм – суб-нанометровыми кластерами [1]. Из-за малого размера нанокластеров и суб-нанометровых кластеров, их синтез и очистка представляют собой более сложную задачу, в отличие от случая металлических наночастиц. Между тем, из-за своей малости, металлические кластеры суб-нанометрового размера обладают различными свойствами отличными от свойств более крупных наночастиц. Наибольший интерес вызывают люминесцирующие нанокластеры благородных металлов, таких как золото и серебро. Прекрасные спектральные свойства, высокая фотостабильность, низкая токсичность и высокая биосовместимость, а также антибактериальные свойства серебра делают серебряные нанокластеры одними из лучших кандидатов для биоимиджинга.

Несколько десятилетий научные группы по всему миру занимаются изучением металлических нанокластеров, стабилизированных различными биополимерными матрицами, такими как: ДНК [2], белки [3], дендримеры [4], полимеры [5]. Однако, нанокластеры благородных металлов, синтезированные на белках, на сегодняшний день изучены крайне мало. К настоящему времени достигнуты значительные успехи в понимании механизма синтеза и флуоресценции таких уникальных объектов, но многие вопросы до сих пор остаются открытыми, например, оптимальный протокол синтеза (с точки зрения максимальной интенсивности люминесценции) и влияние рН среды на флуоресценцию. В данной работе были найдены ответы на упомянутые выше вопросы.

## Литературный обзор.

Серебряные нанокластеры, синтезированные на бычьем сывороточном альбумине (БСА), могут быть применены для обнаружения биотиолов [6]. Биологические тиолы (биотиолы), такие как цистеин, гомоцистеин и глутатион, участвуют в обратимых окислительно-восстановительных реакциях и имеют важные клеточные функции, включая детоксикацию и метаболизм [7].

Протокол синтеза серебряных нанокластеров на альбуминовой матрице был следующим: 0.5 мл 0.1 М раствора нитрата серебра при комнатной температуре добавляли, интенсивно перемешивая, к 10 мл воды, содержащей 250 мг сухого БСА. После чего смесь выдерживали в течение 5 минут при интенсивном перемешивании. Затем добавляли по каплям 0.3 мл 1 М гидроксида натрия и перемешивали полученной раствор 1 час. Потом по каплям добавляли свежеприготовленный раствор 10 мМ борогидрида натрия до тех пор, пока раствор не превращался из бесцветного в красно-коричневый, что указывало на образование нанокластеров. Затем раствор полученных кластеров на альбуминовой матрице хранили при 4° С в темноте, но люминесценция осталась практически неизменной в течение не менее одного месяца после синтеза. Будем называть этот протокол «стандартным протоколом».

Для обнаружения биотиолов брали их свежеприготовленные водные растворы различной концентрации. Процедура обнаружения была следующая: 150 мкл раствора кластеров на альбуминовой матрице разбавляли до 2 мл с 0.2 моль/л раствором натрий-фосфатного буфера. Водородный показатель составлял рН=9.00 для цистеина, 8.02 для гомоцистеина и 8.55 для глутатиона. Объем, соответствующий 0.01 М основного раствора биотиола, смешивали с раствором серебряных нанокластеров (1.875 мг/мл) при комнатной температуре равной (22 ± 1) °С и уравнивали в течение 1 мин.

Спектр испускания серебряных нанокластеров был снят в диапазоне длин волн 485 - 750 нм при возбуждении длиной волны 465 нм.

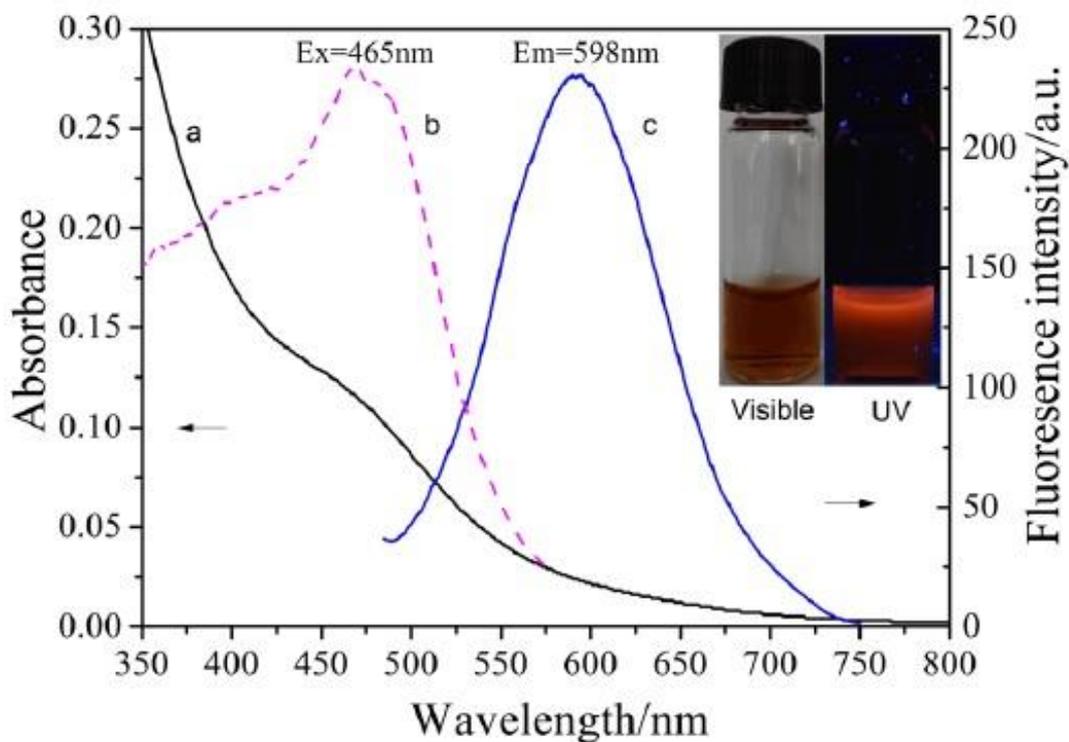


Рис. 1. Оптический спектр поглощения (a) и флуоресцентные (b,c) спектры для полученных кластеров на альбуминовой матрице. Вставка: раствор серебряных нанокластеров при видимом свете (слева) и ультрафиолетовом (справа) с длиной волны 365 нм.

На рис. 1 показано, что спектр поглощения кластеров на альбуминовой матрице имеет слабовозаметный широкий пик вблизи 450 нм. Максимум испускания был при длине волны 598 нм, в то время как максимум возбуждения системы наблюдался при 465 нм. На вставке к рис. 1 видно, что раствор нанокластеров серебра был красновато-коричневого цвета при видимом свете, и проявлял ярко-красную флуоресценцию под действием ультрафиолетового света с длиной волны 365 нм.

Результаты, показывающие отклик флуоресценции серебряных нанокластеров на цистеин, представлены на рис. 2. При добавлении в раствор с серебряными нанокластерами 100 мкМ цистеина, пик поглощения сместился с 465 нм до примерно 495 нм, при этом интенсивность поглощения практически не изменилась (рис. 2, А). А интенсивность флуоресценции раствора

нанокластеров серебра при длине волны 598 нм значительно снизилась, причем максимум сместился с 598 нм до 617 нм (рис. 2, В). Вставка на рис. 2, В показывает изменение цвета раствора кластеров на альбуминовой матрице с красновато-коричневого до бесцветного при добавлении в него цистеина. На верхней фотографии вставки представлены пробирки с раствором при видимом свете, снизу – при возбуждении УФ светом с длиной волны 365 нм. Наблюдается слабая флуоресценция голубого цвета, что указывает на то, что серебряные кластеры могут быть обнаружены невооруженным глазом.

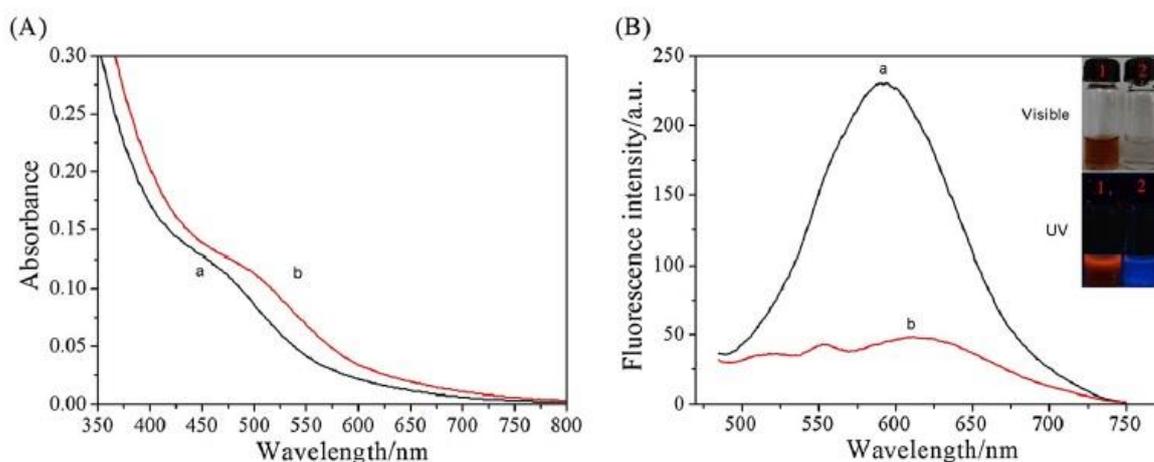


Рис. 2. Спектр поглощения (А) и флуоресцентный (В) спектр кластеров на БСА (1.875 мг/мл) до добавления (а) и после добавления (b) 100 мкМ цистеина.

Для того, чтобы проверить избирательность определения биотиолов, были изучены реакции флуоресцентных серебряных нанокластеров на  $\alpha$ -аминокислоты при их концентрациях, в 10 раз превышающих концентрацию цистеина, гомоцистеина и глутатиона. На рис. 3. представлен график тушения относительной интенсивности флуоресценции серебряных нанокластеров  $((F_0 - F)/F_0)$  после добавления 100 мкМ цистеина, гомоцистеина и глутатиона, и 1000 мкМ других аминокислот. По этим данным видно, что изменение относительной интенсивности испускания нанокластеров серебра при добавлении цистеина, гомоцистеина и глутатиона значительно больше, чем тушение флуоресценции для других  $\alpha$ -аминокислот.

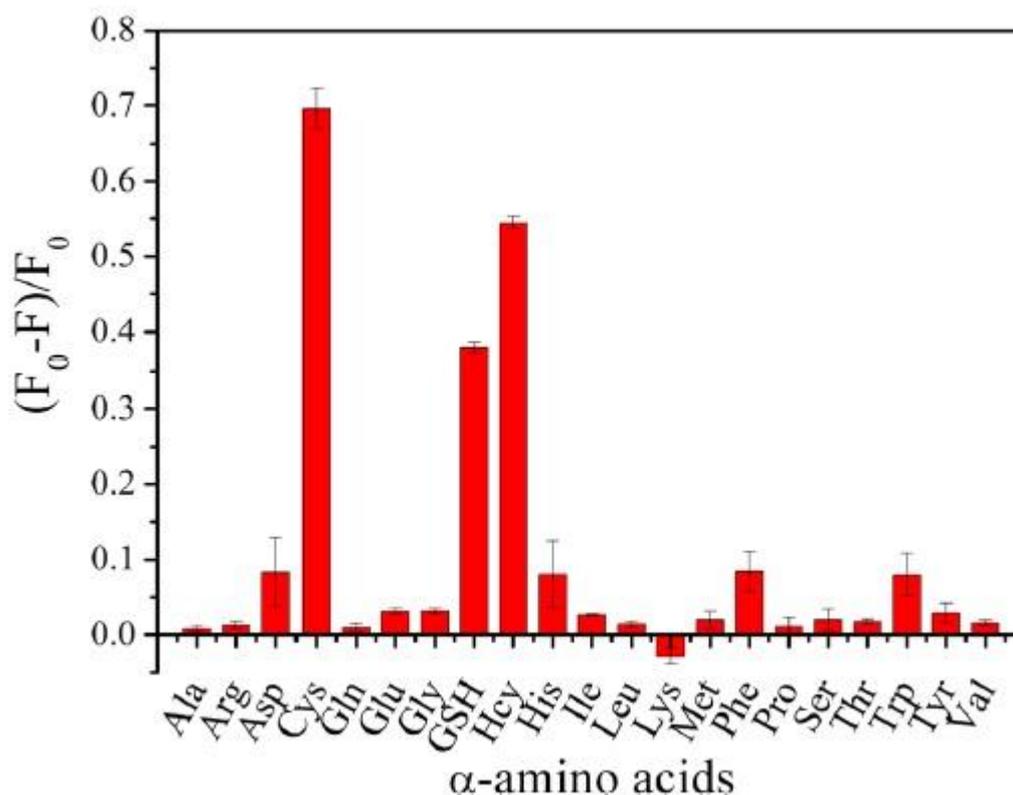


Рис. 3. Изменение относительной интенсивности флуоресценции серебряных нанокластеров на альбуминовой матрице (1.875 мг/мл) после добавления 100 мкМ цистеина, гомоцистеина, глутатитона и 1000 мкМ других  $\alpha$ -аминокислот.

Эти результаты показывают, что предлагаемый авторами [6] метод по обнаружению биотиолов в плазме крови человека имеет высокую избирательность, а значит, может использоваться как важный фактор для диагностики болезней на ранней стадии.

Авторами работы [8] предложен новый флуорометрический метод с использованием золото-серебряных нанокластеров, стабилизированных бычьим сывороточным альбумином, для обнаружения ионов ртути и меди в плазме крови. Ртуть – токсичный тяжелый металл, широко распространенный в природе. Накопление его в человеческом организме наносит вред пищеварительной, выделительной и центральной нервной системе, что может привести к множеству заболеваний. Медь играет важную роль в биохимических процессах жизнедеятельности организма, но дефицит или избыток ионов меди

пагубно влияет на здоровье человека. Поэтому весьма важно быстро и точно определять содержание ионов меди и ртути в плазме крови.

Молярное соотношение золото/серебро в золото-серебряных нанокластерах составляло 25/6. На рис. 4. показана относительная интенсивность испускания 0.417 мМ золото-серебряных нанокластеров на 620 нм при длине волны возбуждения 370 нм. Концентрация добавляемых ионов металлов в раствор была равна 1 мкМ. Видно заметное тушение флуоресценции при добавлении в раствор нанокластеров ионов ртути и меди.

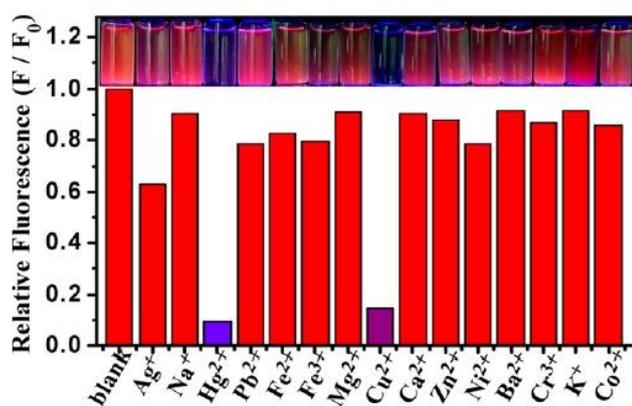


Рис. 4. Изменение интенсивности флуоресценции с добавлением ионов металлов (F) и без ионов (F<sub>0</sub>). На вставке показаны растворы под УФ светом.

На рис. 5. представлена эффективность тушения флуоресценции при добавлении 1, 5, 25, 125, 250, 500, 1000, 2000 нМ ионов ртути и 2, 10, 50, 250, 500, 1000, 2000, 2500 нМ ионов меди. Зависимость эффективности тушения от логарифма концентрации ионов – линейная.

Предложенный авторами [8] метод для обнаружения ионов ртути и меди в плазме крови человека показал высокую избирательность и эффективность, а, значит, может применяться в клинической практике.

Еще одно исследование [9] посвящено серебряным нанокластерам, стабилизированным глутатионом, для обнаружения ионов марганца и йода. Этот метод показал высокую селективность и чувствительность.

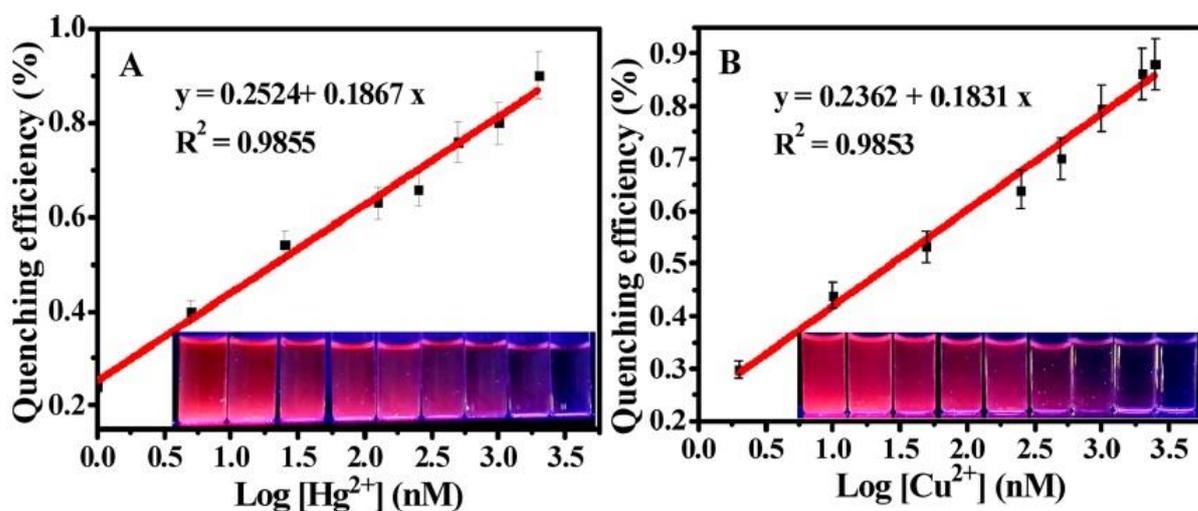


Рис. 5. Эффективность тушения флуоресценции в плазме крови человека. На вставке показаны растворы золото-серебряных кластеров при различной концентрации ртути и меди под ультрафиолетовым светом.

Это лишь малая часть разнообразных применений [10] серебряных нанокластеров, стабилизированных различными матрицами, в биомедицине, текстильной промышленности, сельском хозяйстве и других областях человеческой деятельности.

## **Методы исследования и используемые материалы.**

### **Используемые системы и их подготовка к исследованию.**

В данной работе были исследованы три белка альбуминовой группы: бычий сывороточный альбумин (БСА), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) и лошадиный сывороточный альбумин (ЛСА). БСА и ЛСА находились в виде дегидратированных лиофилизированных порошков, концентрация в водном растворе которых определялась по навеске. После растворения и перемешивания на вортексе (Vortex V-1 Plus, Biosan) для равномерного распределения белка по всему объему раствора с целью достижения монодисперсности получаемой системы, смесь центрифугировалась в течение 5 минут со скоростью 14 500 оборотов в минуту для разделения на фракции полученного раствора. Таким образом, высокомолекулярные фракции (тетрамеры и фракции более высокого порядка) выпадали в осадок, и в растворе оставались только низкомолекулярные фракции, то есть мономеры и димеры исследуемых белков. Очищенная смесь хранилась в морозилке при  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Человеческий сывороточный альбумин, в концентрации 100 мг/мл, находился в физиологическом растворе и хранился в холодильнике при температуре  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

За основу протокола синтеза был взят «стандартный протокол», что соответствовало 14 молекулам нитрата серебра на 1 молекулу белка с концентрацией в растворе 25 мг/мл.

### **Сывороточные альбумины.**

Сывороточные альбумины обладают довольно сложной пространственной структурой. Вторичная структура состоит на 50-68% из  $\alpha$  спирали и на 16-18%

из  $\beta$  слоев. Структура альбуминов включает 3 домена, в каждом из которых имеется 2 поддомена. Третичная структура поддерживается 17 дисульфидными связями между цистеиновыми аминокислотными остатками. Молекулярный вес БСА приблизительно равен 69 кДа, ЧСА и ЛСА - 68 кДа. В организме сывороточные альбумины выполняют транспортную функцию.

### Стационарная люминесценция.

Люминесценция – испускание фотонов из электронно-возбужденных состояний [11]. Выделяют два вида люминесценции: флуоресценцию и фосфоресценцию. Флуоресценция – испускание, происходящее при возвращении спаренного электрона на более низкую орбиталь. Фосфоресценция – испускание, происходящее между состояниями различной мультиплетности, как правило, из возбужденного триплетного в синглетное основное состояние. В данной работе исследуется флуоресценция.

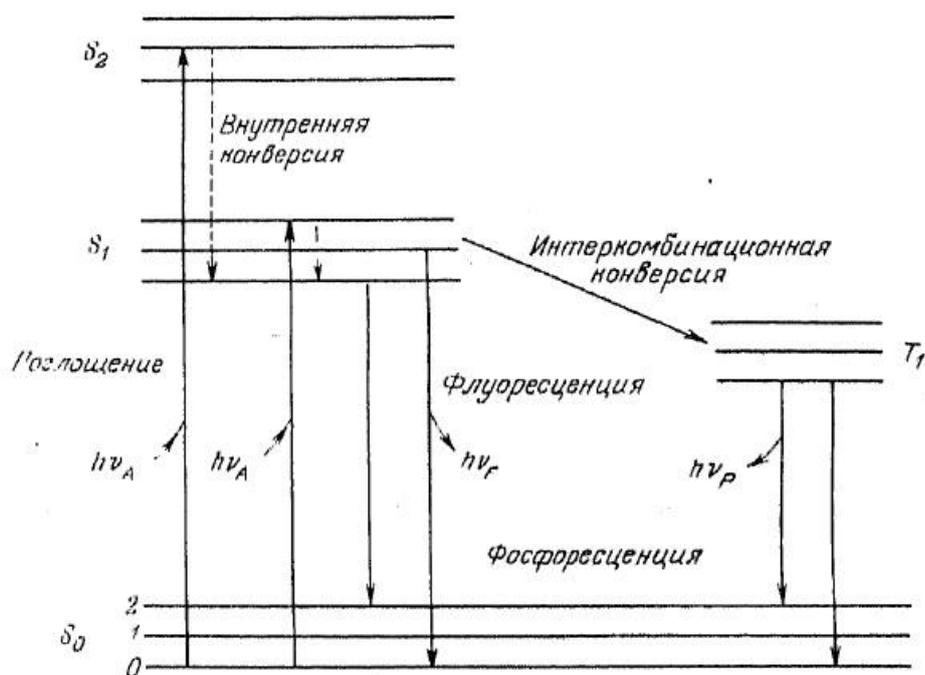


Рис. 6. Диаграмма Яблонского.

Для иллюстрации поглощения и испускания света часто используют диаграмму Яблонского (рис. 6), где:  $S_0$ ,  $S_1$  и  $S_2$  – обозначения для основного, первого и второго синглетных электронных состояний, а  $T_1$  – триплетное состояние. Электронные состояния имеют подуровни, обозначаемые 0, 1, 2 и далее. Переходы между уровнями обозначены стрелочками.

Для регистрации спектра испускания и возбуждения в данной работе был использован спектрофотометр Hitachi 850. Спектр флуоресценции снимался в 4 мм кварцевой кювете под прямым углом к пучку возбуждающего света. Ширина щелей при регистрации спектров испускания флуоресценции составляла 10 и 5 нм в монохроматорах каналов возбуждения и регистрации соответственно, а ширина щелей при регистрации спектра возбуждения – 5 нм в монохроматоре канала возбуждения и 10 нм в канале регистрации. Источником света выступала ксеноновая дуговая лампа. Все спектры регистрировались с учетом корректировки на приборные факторы, такие как чувствительность ФЭУ и спектр самой лампы. Оптическая плотность образцов составляла не более 1.5 оптических единиц в максимуме поглощения при длине волны 210 нм. Спектры возбуждения и испускания корректировались на эффект оптического фильтра. Фон от растворителя составлял не более 5% для всех образцов и вычитался из спектров.

### **Время жизни люминесценции.**

Временем жизни называется среднее время нахождения электрона в возбужденном состоянии. Оно было измерено импульсным методом. Данный метод заключается в следующем: на исследуемый образец подают короткие импульсы света и смотрят зависимость интенсивности испускания от времени.

Времена жизни были измерены на флуориметре Fluorolog 3 (Ресурсный Центр СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования вещества»),

laser.spbu.ru), имеющем светодиодный импульсный источник света с длиной волны 495 нм и систему времякоррелированного счета единичных фотонов. Ширина щелей составляла 14 нм. Длительность импульса светодиода составляла порядка 1 нс.

## Результаты и обсуждение.

### Определение оптимального протокола синтеза.

На начальной стадии изучалась зависимость флуоресценции нанокластеров серебра на белковой матрице при различных концентрациях альбумина в растворе и количества атомов серебра на одну молекулу белка. Длина волны возбуждения 500 нм, испускание регистрировалось с 520 до 800 нм. Полученные результаты представлены на рис. 7-9 и в таблицах 1-3, где первая цифра в названии раствора показывает концентрацию белка в мг/мл, а вторая – количество атомов серебра на одну молекулу белка.

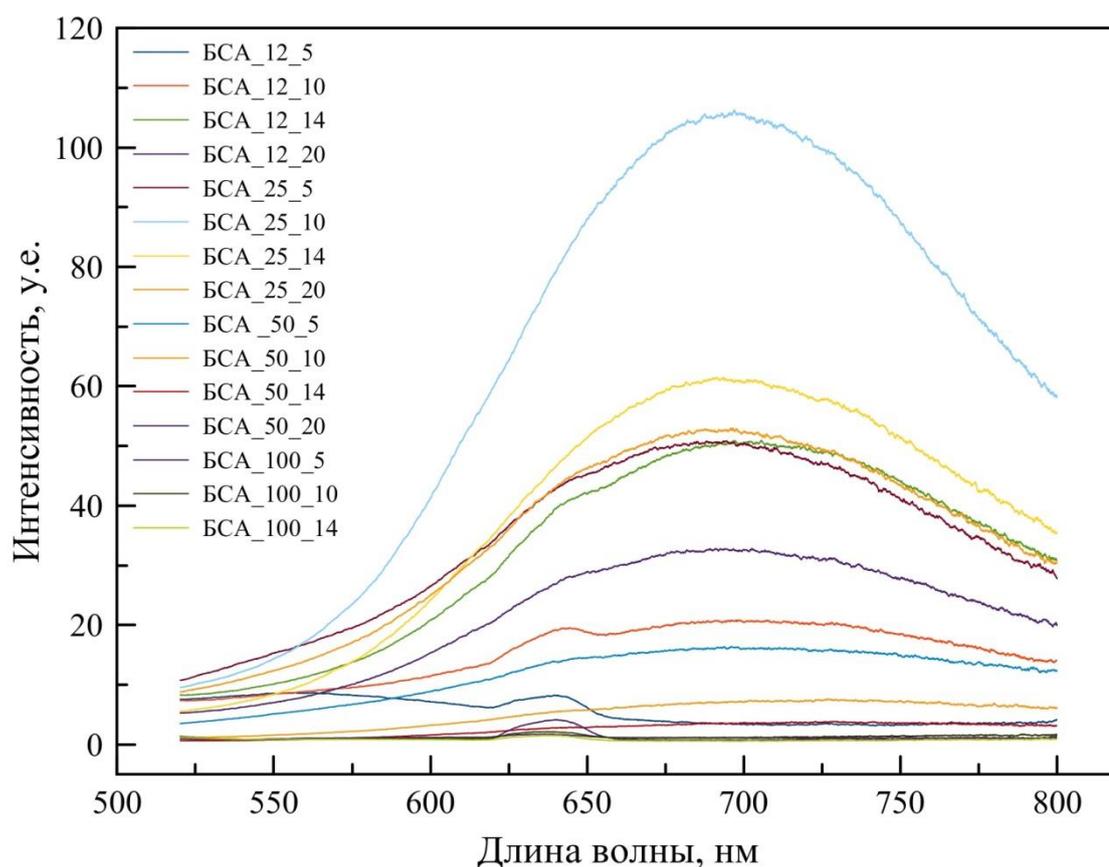


Рис. 7. Флуоресценция серебряных нанокластеров на бычьем сывороточном альбумине при длине волны возбуждения 500 нм.

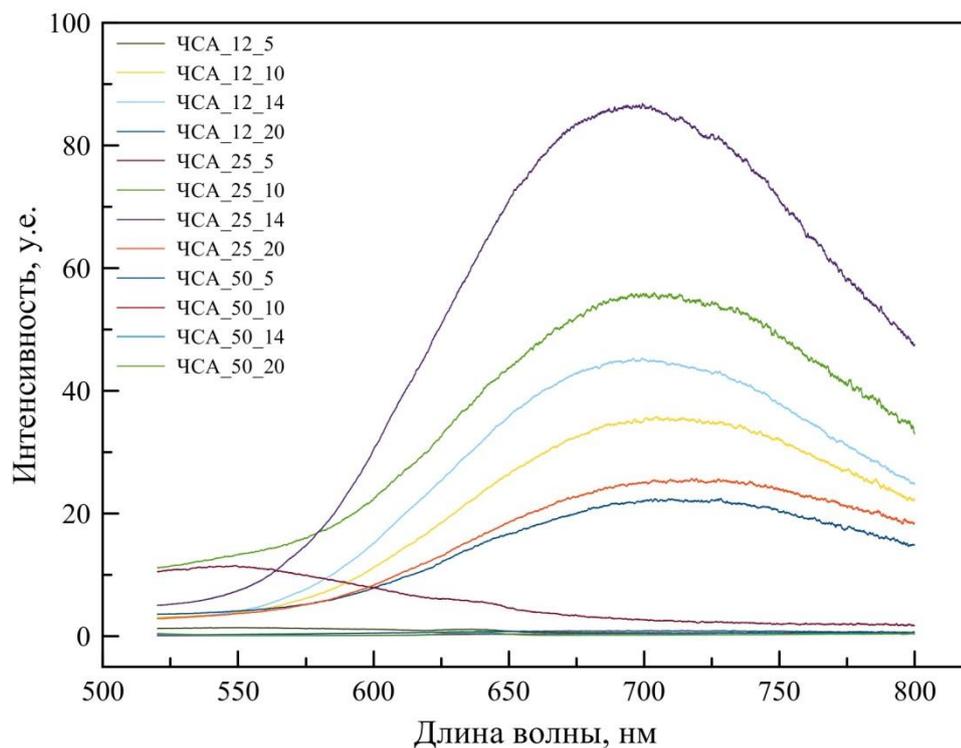


Рис. 8. Флуоресценция серебряных нанокластеров на человеческом сывороточном альбумине при длине волны возбуждения 500 нм.

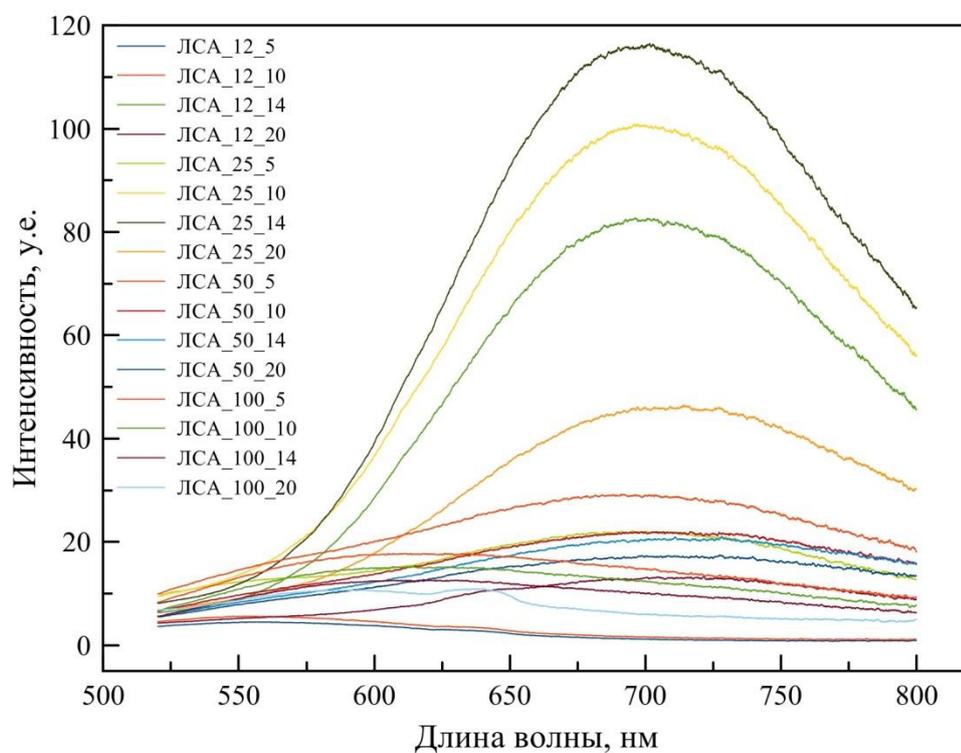


Рис. 9. Флуоресценция серебряных нанокластеров на лошадином сывороточном альбумине при длине волны возбуждения 500 нм.

Интенсивность при 700 нм, у.е.		количество атомов серебра			
		5	10	14	20
Концентрация БСА, мг/мл	12	3.4	20	51	33
	25	50	106	61	53
	50	16	7	3.7	0.7
	100	1.1	1.2	0.6	-

Таблица 1. Испускание серебряных нанокластеров на бычьем сывороточном альбумине на 700 нм при длине волны возбуждения 500 нм.

Интенсивность при 700 нм, у.е.		количество атомов серебра			
		5	10	14	20
Концентрация ЧСА, мг/мл	12	0.6	35	45	22
	25	2.7	56	87	25
	50	0.9	0.5	0.4	0.2
	100	-	-	-	-

Таблица 2. Испускание серебряных нанокластеров на человеческом сывороточном альбумине на 700 нм при длине волны возбуждения 500 нм.

Интенсивность при 700 нм, у.е.		количество атомов серебра			
		5	10	14	20
Концентрация ЛСА, мг/мл	12	1.2	1.6	82	13
	25	22	100	116	46
	50	29	22	20	17
	100	15	12	10	6

Таблица 3. Испускание серебряных нанокластеров на лошадином сывороточном альбумине на 700 нм при длине волны возбуждения 500 нм.

Из представленных данных видно, что для БСА «оптимальным протоколом» синтеза является 10 атомов серебра на одну молекулу белка при концентрации в растворе 25 мг/мл, в то время как, для ЧСА и ЛСА оптимальный протокол - 14 атомов серебра на одну молекулу белка при концентрации в смеси 25 мг/мл. Это говорит о том, что даже небольшие различия в структуре белковых матриц могут привести к заметным различиям при синтезе нанокластеров на них.

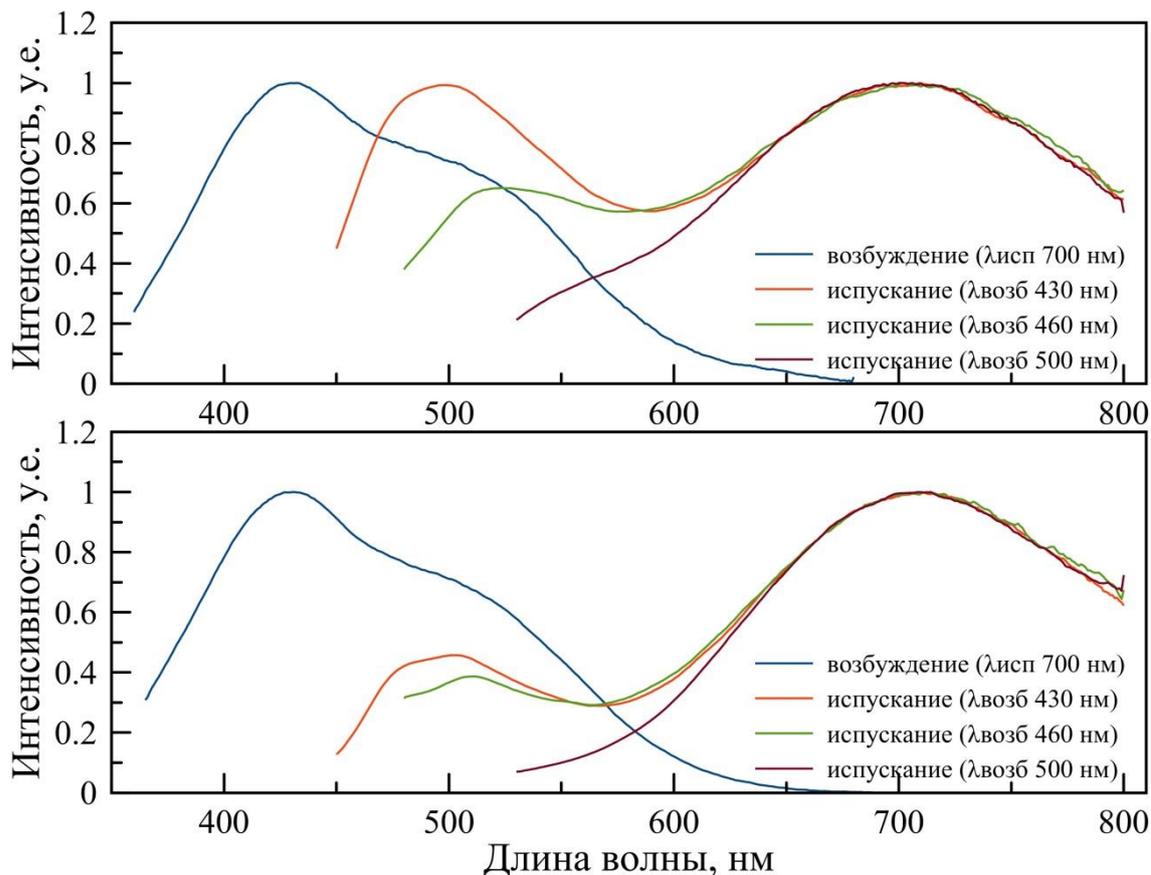


Рис. 10. Спектры возбуждения и испускания для бычьего (вверху) и человеческого (внизу) сывороточных альбуминов.

На рис. 10 показаны спектры возбуждения и испускания для бычьего сывороточного альбумина (вверху) и человеческого сывороточного альбумина (внизу). При длине волны испускания 700 нм имеется максимум возбуждения на длине волны 430 нм и широкий пик на 500 нм, поэтому были измерены три спектра испускания при длинах волн возбуждения 430 нм, 460 нм и 500 нм. Возбуждение снималось при длинах волн от 370 до 680 нм. Спектры испускания регистрировались от 450 нм (красная кривая), 480 нм (зеленая кривая) и 520 нм (фиолетовая кривая) до 800 нм. Исходя из того, что при длине волны возбуждения 500 нм наблюдался только один пик на 700 нм, все спектры испускания для определения «оптимального протокола» синтеза были записаны при длине волны возбуждения 500 нм.

## Измерение времени жизни люминесценции.

Измерения времен жизни велись для серебряных нанокластеров, стабилизированных на белковой матрице с использованием параметров, соответствующих «оптимальному протоколу». Полученные данные представлены на рис. 11-13 и в таблице 4. Аппроксимация была проведена следующей функцией:  $y = A + B_1 e^{-\frac{\tau_1}{t}} + B_2 e^{-\frac{\tau_2}{t}}$ , где  $\tau_1$  и  $\tau_2$  – времена жизни серебряных нанокластеров в двух квантовых состояниях.

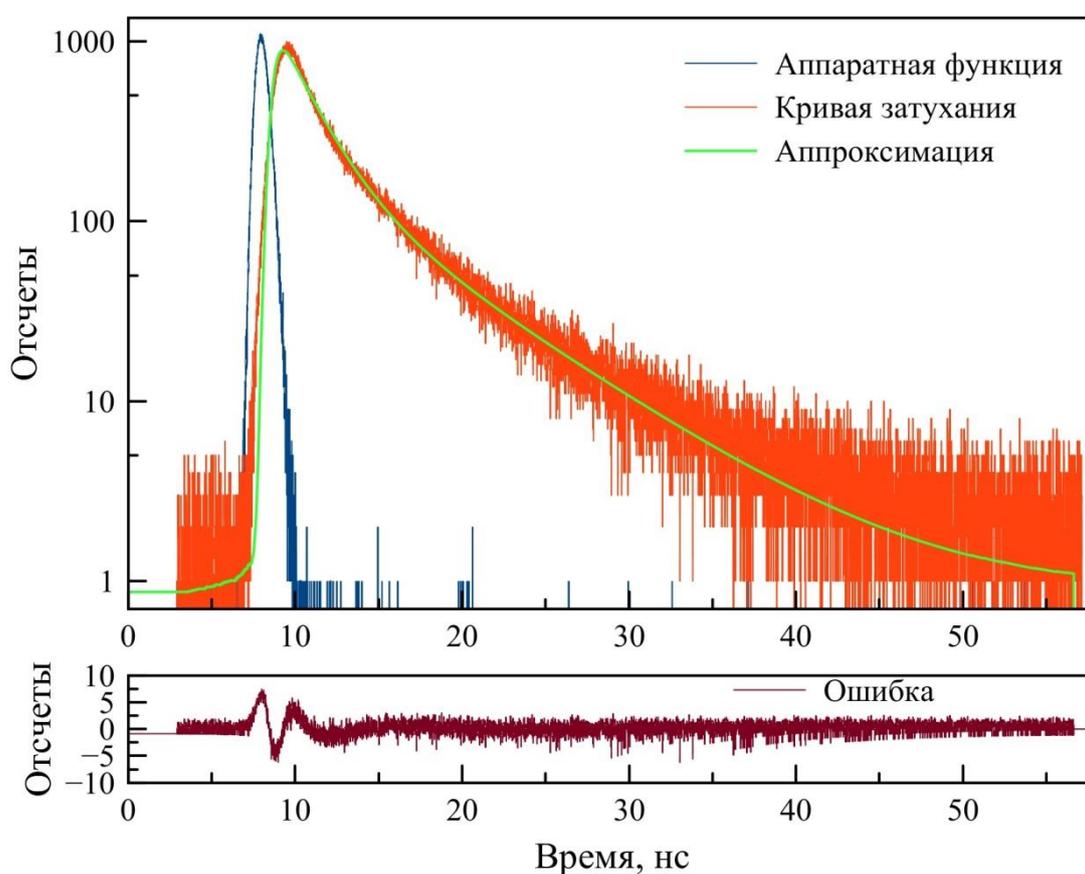


Рис. 11. Измерение времени жизни нанокластеров серебра на БСА.

Матрица	A	B1, %	B2, %	$\tau_1$ , нс	$\tau_2$ , нс
БСА	$0.87 \pm 0.02$	84	16	$1.97 \pm 0.02$	$6.96 \pm 0.05$
ЧСА	$0.81 \pm 0.02$	82	18	$1.54 \pm 0.01$	$6.09 \pm 0.03$
ЛСА	$1.26 \pm 0.02$	83	17	$1.66 \pm 0.02$	$6.58 \pm 0.04$

Таблица 4. Полученные данные времен жизни для нанокластеров на альбуминовой матрице.

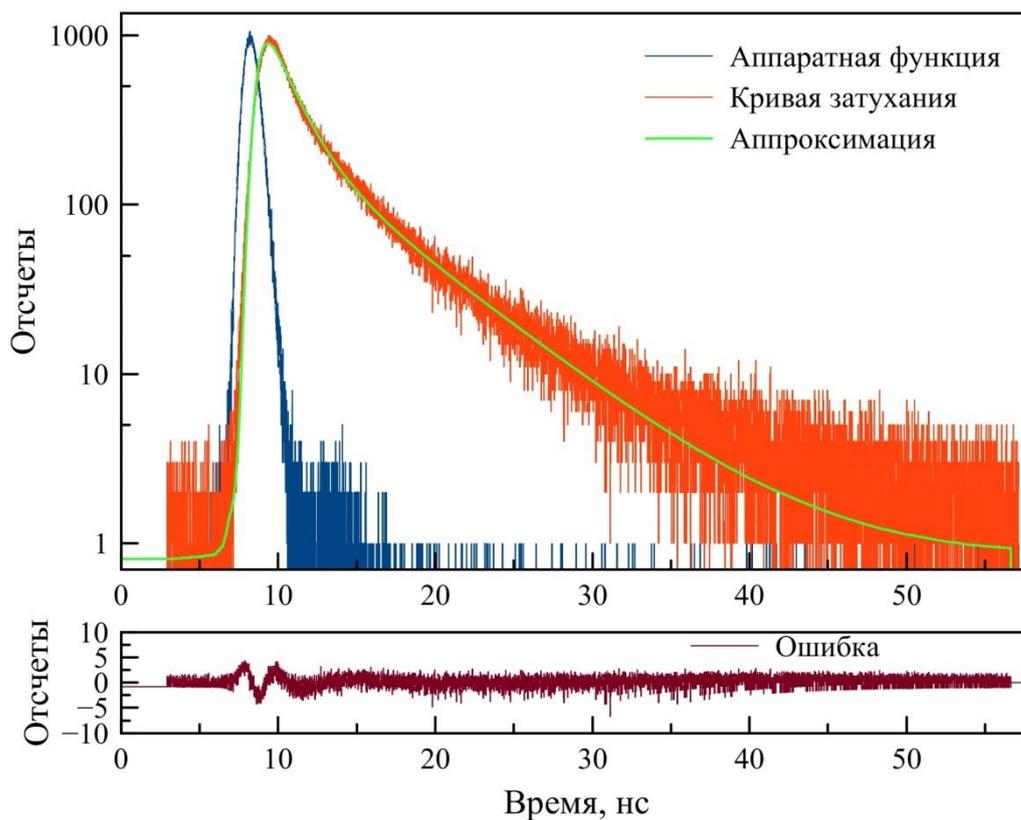


Рис. 12. Измерение времени жизни нанокластеров серебра на ЧСА.

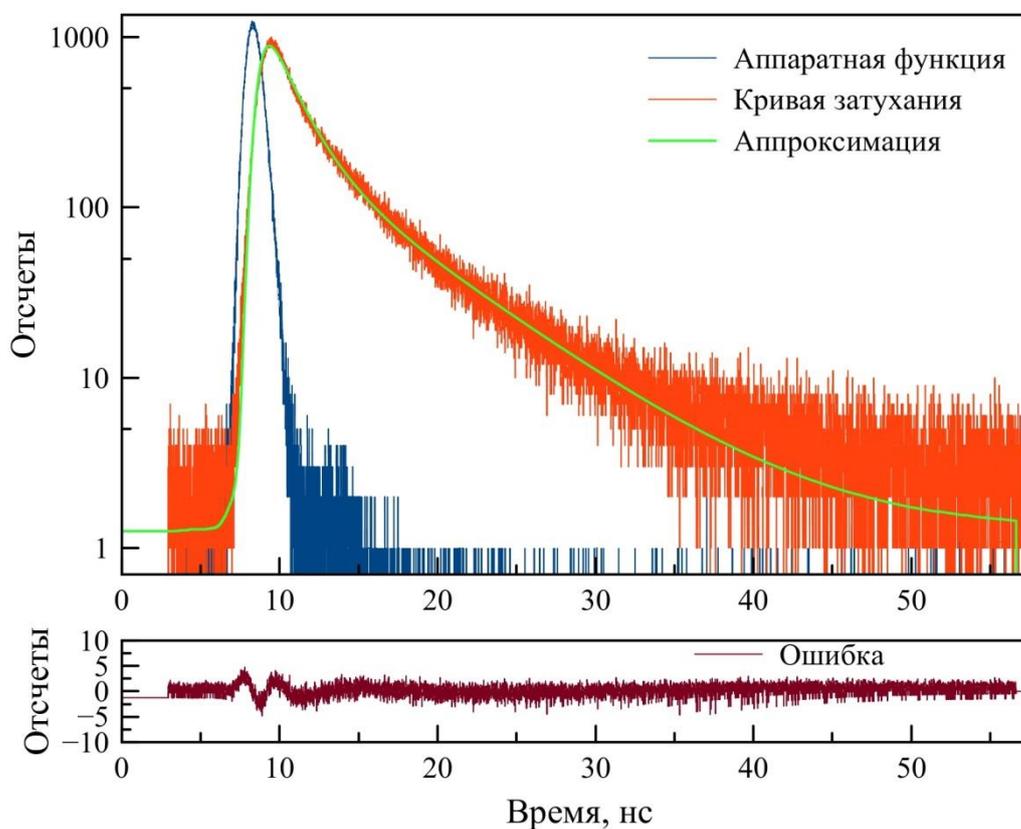


Рис. 13. Измерение времени жизни нанокластеров серебра на ЛСА.

Из представленных данных видно, что для всех трех белковых матриц времена жизни для обеих соответствующих компонент весьма близки (около 2 и 6.5 нс) с учетом реальной погрешности измерений порядка 0.2 нс, при этом доля нанокластеров с временем жизни 2 нс значительно больше. Их вклады в стационарную люминесценцию относятся примерно как 1.3:1.

### **Влияние кислотности среды на флуоресценцию.**

Решено было посмотреть зависимость испускания на длине волны 700 нм от рН среды для БСА и ЧСА. Для этого кислотность среды менялась от 4 до 12 с шагом 1. Полученные данные представлены на рис. 14.

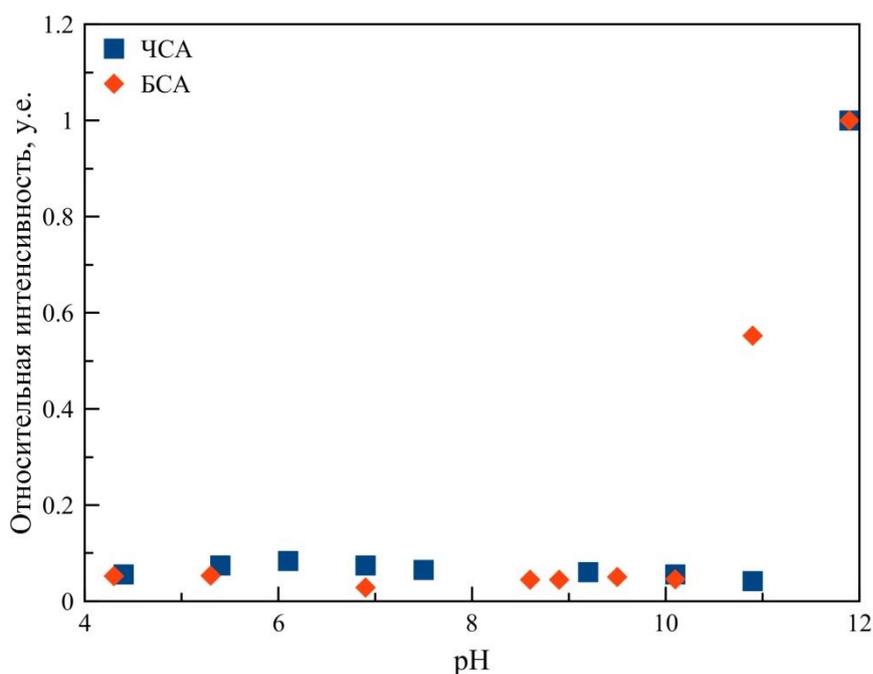


Рис. 14. Относительная интенсивность флуоресценции от рН для БСА и ЧСА.

Как видно из рис. 14, имеется увеличение интенсивности испускания в области рН равного 12. Поэтому, для нахождения максимальной интенсивности при варьировании кислотности среды, были проведены дополнительные исследования в области рН = 9 – 13.5 с меньшим шагом, они представлены на рис. 15.

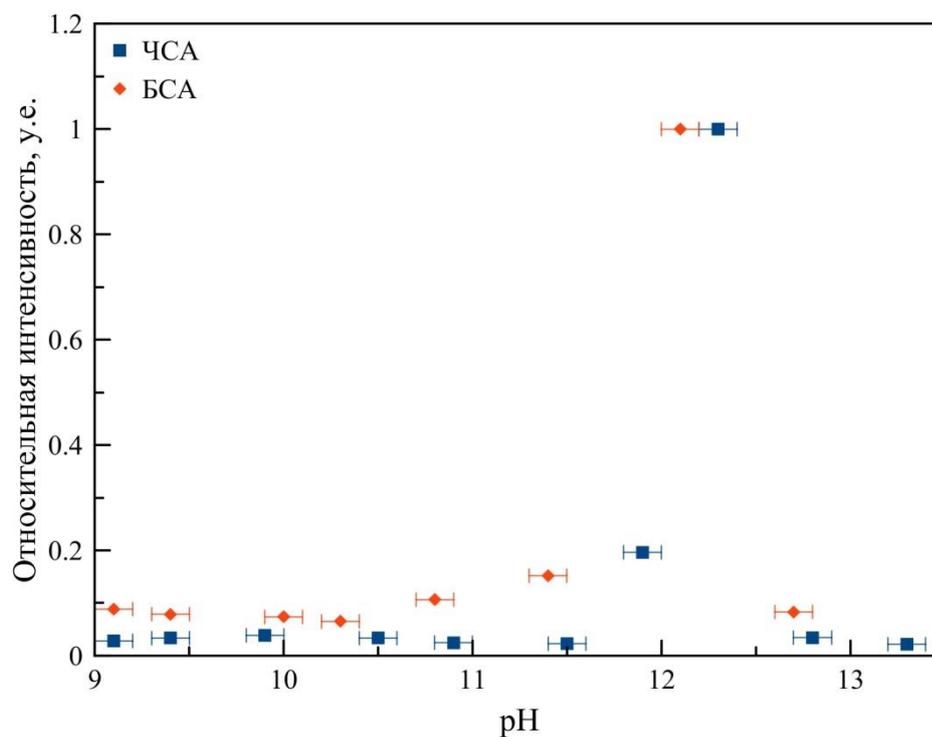


Рис. 15. Относительная интенсивность флуоресценции от рН для ЧСА и БСА.

По полученным данным можно судить о том, что максимум интенсивности флуоресценции наблюдается при рН среды, равной 12.1 для бычьего сывороточного альбумина и 12.3 для человеческого сывороточного альбумина.

Возможно, при данных значениях рН среды образуется оптимальное количество мест связывания отрицательно заряженных молекул белка и положительно заряженных атомов серебра, что в последствие приводит к образованию флуоресцентных нанокластеров.

## **Заключение и выводы.**

В данной работе были исследованы серебряные нанокластеры на белках альбуминовой группы: бычий сывороточный альбумин, человеческий сывороточный альбумин и лошадиный сывороточный альбумин. Определен оптимальный протокол синтеза, то есть такое соотношение реагентов, при котором наблюдается максимальная интенсивность флуоресценции. Для БСА это 10 атомов серебра на одну молекулу белка при концентрации в растворе 25 мг/мл, для ЧСА и ЛСА - 14 атомов серебра на одну молекулу белка при концентрации в смеси 25 мг/мл.

Определена оптимальная точка рН среды для серебряных нанокластеров, стабилизированных альбуминовой матрицей, она оказалась равной 12.1 для БСА и 12.3 для ЧСА. Возможно, при таких значениях рН среды возникает большее число мест связывания молекул белка с атомами серебра.

Измерено время жизни флуоресценции образовавшихся нанокластеров. Кривые затухания флуоресценции указывают на образование двух типов кластеров с временами жизни близкими к 2 и 6.5 нс.

В дальнейшем, представляет большой интерес исследовать влияние вторичной и третичной структур матрицы на интенсивность испускания и эффективность образования кластеров. Помимо этого, важной целью является уточнение «оптимального протокола» синтеза.

## **Благодарности.**

Хочется выразить благодарность аспиранту кафедры молекулярной биофизики и физики полимеров Физического факультета СПбГУ Сычу Томашу Сергеевичу.

Большое спасибо специалисту по спектрофлуорометрии Ресурсного Центра СПбГУ "Оптические и лазерные методы исследования вещества" (laser.spbu.ru) Колесникову Илье Евгеньевичу.

Хочется выразить слова благодарности доценту кафедры молекулярной биофизики и физики полимеров Физического факультета СПбГУ, кандидату физико-математических наук Поляничко Александру Михайловичу.

Выражаю особую признательность своему научному руководителю, доценту кафедры молекулярной биофизики и физики полимеров Физического факультета СПбГУ, кандидату физико-математических наук Кононову Алексею Игоревичу.

## Используемая литература.

1. Yizhong Lu, Wei Chen, Sub-nanometre sized metal clusters: from synthetic challenges to the unique property discoveries. Chem. Soc. Rev., 2012. **41**, p: 3594–3623.
2. Richards C. I., Choi S., Hsiang J. C., Antoku Y., Vosch T., Bongiorno A., Tzeng Y. L., Dickson R. M., Oligonucleotide-stabilized Ag nanocluster fluorophores. J. Am. Chem. Soc., 2008. **130**, p: 5038-5039.
3. Xie J. P., Zheng Y. G., Ying J. Y., Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters. J. Am. Chem. Soc., 2009. **131**, p: 888-889.
4. Han Wang, Linfeng Zheng, Rui Guo, Chen Peng, Mingwu Shen, Xiangyang Shi, and Guixiang Zhang, Dendrimer-entrapped gold nanoparticles as potential CT contrast agents for blood pool imaging. Nanoscale Res Lett., 2012. **7**(1), p: 190-197.
5. Duan, H. W., Nie, S. M., Etching Colloidal Gold Nanocrystals with Hyperbranched and Multivalent Polymers: A new Route to Fluorescent and Water-Soluble Atomic Clusters. J. Am. Chem. Soc., 2007. **129**, p: 2412-2413.
6. Zhen Chen, Dongtao Lu, Zongwei Cai, Chuan Dong and Shaomin Shuang, Bovine serum albumin-confined silver nanoclusters as fluorometric probe for detection of biothiols. Luminescence, 2014. **29**, p: 722–727.
7. Chen X, Zhou Y, Peng X, Yoon J., Fluorescent and colorimetric probes for detection of thiols. Chem Soc Rev, 2010. **39**, p: 2120–2135.
8. Ning Zhang, Yanmei Si, Zongzhao Sun, Lijun Chen, Rui Li, Yuchun Qiao, and Hua Wang, Rapid, Selective, and Ultrasensitive Fluorimetric Analysis of Mercury and Copper Levels in Blood Using Bimetallic Gold–Silver Nanoclusters with “Silver Effect”-Enhanced Red Fluorescence. Anal Chem, 2014. **86**, p: 11714–11721.
9. Weihua Ding, Saipeng Huang, Lingmei Guan, Xianhu Liu and Zhixun Luo, Furthering the chemosensing of silver nanoclusters for ion detection. RSC Adv., 2015. **5**, p: 64138–64145.

10. Bryan Calderon-Jimenez, Monique E. Johnson, Antonio R. Montoro Bustos, Karen E. Murphy, Michael R. Winchester and Jose R. Vega Baudrit, Silver Nanoparticles: Technological Advances, Societal Impacts, and Metrological Challenges. *Frontiers in Chemistry*, 2017. **5**, 6.
11. Лакович Дж., Основы флуоресцентной спектроскопии, пер. с англ., Москва «Мир», 1986.