

**UNIVERZA V MARIBORU**  
**FAKULTETA ZA STROJNIŠTVO**

Doktorska disertacija

**RAZVOJ Au NANODELCEV Z METODO**  
**ULTRAZVOČNE RAZPRŠILNE PIROLIZE ZA**  
**DETEKCIJO PROTITELES PROTI SARS-COV-2**

Marec, 2024

Žiga Jelen

**UNIVERZA V MARIBORU**  
**FAKULTETA ZA STROJNIŠTVO**

Doktorska disertacija

**RAZVOJ Au NANODELCEV Z METODO  
ULTRAZVOČNE RAZPRŠILNE PIROLIZE ZA  
DETEKCIJO PROTITELES PROTI SARS-COV-2**

Marec, 2024

Avtor: Žiga Jelen

Mentorica: red. prof. dr. Rebeka Rudolf

Somentor: doc. dr. Martin Rakuša

UDK: [620.3:669.21]:616-07(043.3)

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici red. prof. Rebeki Rudolf za njeno pomoč in podporo pri izvedbi eksperimentalnega in raziskovalnega dela, brez katerega priprava tega doktorskega dela ne bi bila mogoča.

Zahvaljujem se somentorju doc. dr. Martinu Rakuši, dr. med. specialistu nevrologije, za nasvete in pomoč pri prijavi klinične študije in za podporo pri izvedbi raziskav. Sočasno bi se na tej točki zahvalil Univerzitetnemu kliničnemu centru Maribor, ki je omogočil izvedbo klinične študije razvitih hitrih testov v njihovih prostorih.

Rad bi se tudi zahvalil mag. Doris Golub in Sergeju Tomicu, PhD, za pomoč in podporo pri izvedbi poskusov.

Zahvaljujem se tudi agenciji ARRS za financiranje moje doktorske disertacije.

Posebno zahvalo namenjam tudi staršem, družini in prijateljem za vso podporo v času študija.

# RAZVOJ Au NANODELCEV Z METODO ULTRAZVOČNE RAZPRŠILNE PIROLIZE ZA DETEKCIJO PROTITELES SARS-COV-2

**Ključne besede:** Nanodelci zlata, virus SARS-CoV-2, stabilizacija, konjugacija, karakterizacija, LFIA testi,

## POVZETEK

*V doktorskem delu so predstavljene študije, eksperimentalno delo, tehnike karakterizacije, rezultati in analize, s pomočjo katerih smo potrdili hipotezo, da je možno Au nanodelce (AuND) pripravljene z metodo ultrazvočne razpršilne pirolize (USP), konjugirati s ciljnim antigeni SARS-CoV-2 in rekombinantnim IgG, da bodo delovali v imunoserološkem hitrem testu na lateralni tok (LFIA), za potrditev potencialne prisotnosti protiteles proti virusu SARS-CoV-2. S ciljno izbranimi parametri (0,5 g/l Au, 5 l/min N<sub>2</sub>, 2,5 l/min H<sub>2</sub>) smo z USP sintetizirali AuND iz prekursorja na osnovi zlatovega (III) klorida. AuND smo zbirali v steklenicah z demineralizirano vodo. Določili smo optimalne stabilizatorje in njihove koncentracije: 2,5 g/L PVP 40K ((C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO)<sub>n</sub>) ter naknadno dodani 1 g/L trinatrijevega citrata (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) in saharoze (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>), da bi preprečili AuND aglomeracijo. Presevna elektronska mikroskopija AuND je pokazala, da so okrogli, s povprečno velikostjo okoli 50 nm in ozko velikostno porazdelitvijo, brez defektov in nizkim ZETA potencialom, 2,4 mV, pri pH 7,5. Za odstranitev vode iz suspenzije z AuND in stabilizatorji je bila uporabljena liofilizacija, ki je bila izvedena pri naslednjih pogojih: zamrzovanje pri -40 °C, 4 h, atmosferski tlak; primarno sušenje pri +20 °C, 12 h, 1-4 Pa; sekundarno sušenje pri +30 °C, 33 h, 1-4 Pa. Nastali posušeni AuND so ohranili vse lastnosti, ki so potrebne za funkcijo oznak v hitrih LFIA testih: visoka površinska energija, površinska plazmonska resonanca in proste karboksilne skupine za konjugacijo.*

*V nadaljevanju izvajanja eksperimentov smo, da bi potrdili doktorske hipoteze, izvedli raziskavo in optimizacijo konjugacije AuND z antigenom SARS-CoV-2, ki je bodičasti protein S1 (ak 1-681), in s protitelesi na zajčji IgG (RMG03). Za določitev poteka konjugacije AuND smo uporabili posredne (gelske elektroforeze, UV-Vis, preizkus delovanja) in direktne (XPS, SIMS) metode. Rezultati so pokazali, da se med našim postopkom konjugacije, v fazah čiščenja odstranimo večinski delež PVP in saharoze, ter s tem sprostimo proste karboksilne funkcionalne skupine citratnih ionov, ki so vezani na površini AuND. Na teh prostih mestih lahko poteče konjugacija prek prostih -NH<sub>2</sub> skupin na proteinih. Njihovo funkcionalnost smo ovrednotili z eksperimentalnimi testiranjem lastno razvitega LFIA testa. Na osnovi tega smo postavili model*

*in mehanizem konjugacije AuND, ki predpostavlja, da poteka konjugacija z antigeni oziroma protitelesi prek tvorbe peptidnih vezi med N-koncem proteina in prostimi karboksilnimi skupinami citratnega iona, ki je vezan na površino AuND prek svojih karboksilnih skupin.*

*Za dodatno potrditev funkcionalizacije AuND z izbranimi biomolekulami smo v sklepnem delu doktorskega dela izvedli klinično študijo na pacientih UKC MB, ki je bila odobrena s sklepom KME RS št. 0120-148/2021/3. Rezultati študije so pokazali, da testi dosegajo visoko občutljivost (83 %) tako na vzorcih nosnega sluzi kot na vzorcih seruma, slabšo specifičnost (66 % sluz, 74 % serum), visoko negativno napovedno vrednost (94 %) in slabšo pozitivno napovedno vrednost (38 % sluz, 45 % serum). S študijo smo potrdili delovanje AuND v funkciji oznak, saj so se testne in kontrolne linije v lastno razvitem LFIA hitrem testu obarvale.*

# DEVELOPMENT OF Au NANOPARTICLES BY THE USP METHOD FOR THE DETECTION OF SARS-COV-2 ANTIBODIES

**Key words:** Gold nanoparticles, SARS-CoV-2 virus, stabilisation, conjugation, LFIA assays, characterisation

## ABSTRACT

*This doctoral thesis presents the studies, experimental work, characterisation techniques, results and analyses with the help of which we confirmed the hypothesis that it is possible to conjugate Au nanoparticles (AuNPs) prepared by the ultrasonic spray pyrolysis (USP) method with the target antigens of SARS-CoV-2 and recombinant IgG to function in a rapid lateral flow immunoserological assay (LFIA) to confirm the potential presence of antibodies against the SARS-CoV-2 virus. AuNPs were synthesised with the chosen parameters (0.5 g/l Au, 5 l/min N<sub>2</sub>, 2.5 l/min H<sub>2</sub>) from a precursor based on Au-chloride, using USP. AuNPs were collected in gas wash bottles filled with demineralized water. We determined the optimal stabilisers and their concentrations with the goal of preventing AuNPs agglomeration: 2.5 g/L PVP 40K ((C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO)<sub>n</sub>), and subsequently added 1 g/L of trisodium citrate (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) and sucrose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>). Microstructural analysis of the AuNPs showed them to be round, with sizes of around 50 nm and a narrow size distribution, without defects and with a low ZETA potential of 2.4 mV at a pH of 7.5. To remove water from the suspension with AuNPs and stabilisers, freeze-drying was used, which was carried out under the following conditions: freezing at -40 °C, 4 h, atmospheric pressure; primary drying at +20 °C, 12 h, 1-4 Pa, secondary drying at +30 °C, 33 h, 1-4 Pa. The resulting dried AuNPs retained all the properties required for their use as labels in LFIA assays: high surface energy, surface plasmon resonance, and free carboxyl groups for conjugation.*

*To confirm the doctoral hypothesis, we continued with the experiments and the optimisation of the conjugation process of AuNPs with the SARS-CoV-2 S1 antigen, with the S1 (ak 1-681) subunit, and with anti-rabbit IgG antibodies (RMG03). Indirect methods such as gel electrophoresis, UV-Vis and LFIA experiments, and direct methods such as XPS and SIMS, were used to determine the mechanism of AuNPs conjugation. The results showed that during our conjugation process, the majority of PVP and sucrose is removed in the purification stages, thereby releasing free carboxyl functional groups of citrate ions, which are bound on the AuNPs surface. Conjugation happens via the free -NH<sub>2</sub> groups of proteins and the vacant carboxyl*

*sites on the surface of AuNPs. We evaluated their functionality by testing through our own LFIA test. Based on this, we set up a model and mechanism of AuNPs conjugation, which assumes that conjugation with antigens or antibodies takes place through the formation of peptide bonds between the N terminus of the protein and the free carboxyl groups of the citrate ion, which is bound to the AuNPs surface via its carboxyl groups.*

*To further confirm the functionalisation of AuNPs with the selected biomolecules, in the concluding part of the doctoral thesis, we conducted a clinical study on patients of the University Medical Centre in Maribor, which was approved by The Commission of the Republic of Slovenia for Medical Ethics, with decision no. 0120-148/2021/3. The results of the study showed that the tests achieve a high sensitivity of 83% on both nasal mucus and serum samples and lower specificities of 66% (mucus) and 74% (serum), as well as a high negative predictive value of 94% and lower positive predictive values of 38% (mucus) and 45% (serum). Through the study, we confirmed the function of AuNPs as labels, with a successful staining of the test and control lines in our self-developed LFIA test.*

## KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>2</b>	<b>NANOMATERIALI KOT KOMPONENTE V DIAGNOSTIČNIH PRIPOMOČKIH.....</b>	<b>- 4 -</b>
<b>2.1</b>	<b>Predstavitev nanomaterialov .....</b>	<b>- 4 -</b>
<b>2.2</b>	<b>Opredelitev diagnostičnih metod .....</b>	<b>- 6 -</b>
<b>3</b>	<b>AuND .....</b>	<b>- 8 -</b>
<b>3.1</b>	<b>Lastnosti AuND.....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>3.2</b>	<b>Funkcionalizacija.....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>3.3</b>	<b>Uporaba AuND v LFIA testih .....</b>	<b>- 17 -</b>
<b>4</b>	<b>METODE SINTEZE AUND .....</b>	<b>- 18 -</b>
<b>4.1</b>	<b>Turkevicheva metoda .....</b>	<b>- 18 -</b>
<b>4.2</b>	<b>Sinteza z Brust-Schiffrinovo metodo .....</b>	<b>- 19 -</b>
<b>4.3</b>	<b>Sinteza z lasersko ablacijo .....</b>	<b>- 20 -</b>
<b>4.4</b>	<b>Sinteza z rastjo semen .....</b>	<b>- 22 -</b>
<b>5</b>	<b>SINTEZA Z USP .....</b>	<b>- 24 -</b>
<b>5.1</b>	<b>Mehanizem .....</b>	<b>- 27 -</b>
<b>5.2</b>	<b>Sinteza.....</b>	<b>- 29 -</b>
<b>5.3</b>	<b>Karakterizacija AuND .....</b>	<b>- 30 -</b>
5.3.1	Presevna elektronska mikroskopija .....	- 30 -
5.3.2	ICP-OES .....	- 32 -
5.3.3	Zeta potencial .....	- 32 -
<b>6</b>	<b>STABILIZACIJA NANODELCEV .....</b>	<b>- 34 -</b>
<b>6.1</b>	<b>Mehanizmi stabilizacije AuND.....</b>	<b>- 36 -</b>
<b>6.2</b>	<b>Izbira stabilizatorja .....</b>	<b>- 38 -</b>
6.2.1	PVP.....	- 39 -
6.2.2	PEG.....	- 39 -
6.2.3	Trinatrijev citrat.....	- 40 -



<b>6.3</b>	<b>Liofilizacija</b> .....	<b>- 42 -</b>
<b>6.4</b>	<b>Izbira kriostabilizatorjev</b> .....	<b>- 44 -</b>
<b>6.5</b>	<b>Sinteza z izbranimi stabilizatorji</b> .....	<b>- 45 -</b>
<b>6.6</b>	<b>Mehanizem stabilizacije AuND</b> .....	<b>- 46 -</b>
<b>7</b>	<b>KONJUGACIJA</b> .....	<b>- 48 -</b>
<b>7.1</b>	<b>Izbira lovilnih molekul</b> .....	<b>- 48 -</b>
7.1.1	Protitelesa .....	- 48 -
7.1.2	Antigeni .....	- 52 -
7.1.3	Izbira komponent.....	- 53 -
<b>7.2</b>	<b>LFIA testi</b> .....	<b>- 54 -</b>
7.2.1	Princip delovanja .....	- 54 -
7.2.2	Izbira komponent.....	- 55 -
<b>7.3</b>	<b>Konjugacija z AuND</b> .....	<b>- 57 -</b>
7.3.1	Preliminarni poskus konjugacije .....	- 58 -
7.3.2	Zmanjšanje deleža nespecifične vezave oznak.....	- 61 -
7.3.3	Optimizacija konjugacije AuND .....	- 62 -
<b>7.4</b>	<b>Karakterizacija</b> .....	<b>- 66 -</b>
7.4.1	UV-Vis .....	- 66 -
7.4.2	Elektroforeza .....	- 66 -
7.4.3	Preizkus funkcionalnosti konjugata AuND .....	- 66 -
7.4.4	SIMS.....	- 68 -
7.4.5	XPS.....	- 71 -
<b>7.5</b>	<b>Mehanizem konjugacije AuND</b> .....	<b>- 74 -</b>
<b>8</b>	<b>KLINIČNA ŠTUDIJA</b> .....	<b>- 75 -</b>
<b>8.1</b>	<b>Optimizacija in sestava</b> .....	<b>- 75 -</b>
8.1.1	Optimizacija.....	- 76 -
8.1.2	Sestava .....	- 79 -
<b>8.2</b>	<b>Izvedba testiranja</b> .....	<b>- 79 -</b>

<b>8.3 Rezultati klinične študije .....</b>	<b>- 80 -</b>
<b>9 SKLEPI .....</b>	<b>- 82 -</b>
<b>10 LITERATURA.....</b>	<b>- 84 -</b>
<b>PRILOGE.....</b>	<b>- 96 -</b>

## **KAZALO SLIK**

Slika 1: Shema enostavnega imunskega testa.....	- 7 -
Slika 2: Zrno 99,99 % čistega Au s PCK strukturo .....	- 9 -
Slika 3: Vidna barva in prikaz absorbirane barve okroglih AuND v odvisnosti od njihove velikosti .....	- 10 -
Slika 4: Shema učinka površinske plazmonske resonance pri AuND.....	- 11 -
Slika 5: Shema različnih mehanizmov konjugacije proteinov oziroma specifičnih protiteles IgG na površini AuND.....	- 13 -
Slika 6: USP metoda naprševanja.....	- 25 -
Slika 7: Shematski prikaz osnovnega USP postopka .....	- 25 -
Slika 8: Shematski prikaz modificiranega USP postopka .....	- 26 -
Slika 9: Modificirana USP naprava v Zlatarni Celje, d. o. o. ....	- 27 -
Slika 10: Velikost kapljic aerosola v odvisnosti od frekvence piezo kristala v USP generatorju .....	- 27 -
Slika 11: AuND, sintetizirani iz prekursorja s koncentracijo 1 g (Au)/L iz: .....	- 31 -
Slika 12: AuND, sintetizirani iz iz prekursorja s koncentracijo 0,5 g (Au)/L iz zlatovega (III) klorida.....	- 31 -
Slika 13: Suspenzija AuND, nastala z USP sintezo iz: a) iz zlatovega (III) klorida in b) zlatovega (III) acetata .....	- 32 -
Slika 14: Vrednosti zeta potenciala nestabiliziranih AuND, sintetiziranih z USP v odvisnosti od pH .....	- 33 -
Slika 15: Shematski prikaz dvojne elektrostatične plasti .....	- 34 -
Slika 16: Shematski prikaz celotne interakcijske energije v odvisnosti od razdalje med dvema delcema.....	- 36 -
Slika 17: AuND v različnih suspenzijah; stanje pred liofilizacijo.....	- 46 -
Slika 18: Mehanizem stabilizacije AuND v suspenziji .....	- 47 -

Slika 19: Mehanizem stabilizacije suhih AuND .....	- 48 -
Slika 20: Različne strukture protiteles [169], [176] .....	- 50 -
Slika 21: Domene IgG protitelesa [169], [176] .....	- 52 -
Slika 22: Struktura bodičastega S glikoproteina virusa SARS-CoV-2 .....	- 53 -
Slika 23: Ponazoritev korakov čiščenja AuND konjugata .....	- 58 -
Slika 24: Izmerjen UV-Vis absorpcijski spekter suspenzije AuND pred konjugacijo in po njej- 59 -	
Slika 25: Prikaz rezultatov potovanja nekonjugiranih in konjugiranih AuND iz različnih suspenzij z metodo gelske elektroforeze .....	- 60 -
Slika 26: Prvi poskus ovrednotenja konjugiranih AuND v hitrem testu, kjer so se oznake imobilizirale na začetku kromatografske blazine .....	- 61 -
Slika 27: Prikaz popolne sprostitve oznak iz konjugatne blazine in tok do vzorčne blazine-	61 -
Slika 28: Šibka obarvanost kontrolne linije.....	- 61 -
Slika 29: Prikaz intenzivnejše obarvanosti kontrolne linije po uvedbi dodatnega čiščenja konjugata .....	- 62 -
Slika 30: Intenzivna obarvanost kontrolne linije.....	- 63 -
Slika 31: Rezultati elektroforeze AuND konjugata v testiranjih optimizacije čiščenja .....	- 64 -
Slika 32: Potek konjugacije AuND .....	- 65 -
Slika 33: Nanos kontrolne linije .....	- 67 -
Slika 34: Sestavljen poskusni LFIA listič hitrega testa .....	- 67 -
Slika 35: Spektri SIMS negativnih sekundarnih ionov, m/z področje 10–350 .....	- 70 -
Slika 36: Spektri SIMS pozitivnih sekundarnih ionov, m/z področje 0–400 .....	- 70 -
Slika 37: HR XPS spekter C1s (a) in O1s (b).....	- 72 -
Slika 38: HR XPS spekter N1s (a) in pomerjen HR spekter N1s konjugiranega vzorca (b)-	73 -
Slika 39: HR XPS spekter Au4f.....	- 73 -
Slika 40: Konjugacija AuND s SARS-CoV-2 S1 ak 1-681.....	- 74 -
Slika 41: Konjugacija AuND s protitelesi na zajčji IgG .....	- 75 -
Slika 42: Shematski prikaz sestave LFIA lističa .....	- 79 -

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Splošne lastnosti Au [65], [71] .....	- 9 -
Preglednica 2: Parametri USP sinteze izbranih prekursorjev AuND .....	- 29 -
Preglednica 3: Ovrednoteni stabilizatorji .....	- 41 -
Preglednica 4: Parametri liofilizacije .....	- 43 -
Preglednica 5: Seznam uporabljenih polimernih stabilizatorjev .....	- 45 -
Preglednica 6: Koncentracija Au v suspenzijah različnih stabilizatorjev v ppm .....	- 45 -
Preglednica 7: Izmerjene vsebnosti Au v različnih suspenzijah po redisperziji liofiliziranih AuND v ppm .....	- 46 -
Preglednica 8: Seznam uporabljenih proteinov in njihova funkcija v testu .....	- 54 -
Preglednica 9: Seznam vzorcev .....	- 60 -
Preglednica 10: Prikaz parametrov, ki so bili raziskani pri optimizaciji čiščenja AuND konjugata .....	- 63 -
Preglednica 11: Seznam vzorcev, analiziranih z metodo SIMS .....	- 68 -
Preglednica 12: Seznam vzorcev, analiziranih z XPS skupaj s površinsko sestavo v at. % .....	- 71 -
Preglednica 13: Seznam komponent, uporabljenih v hitrem testu .....	- 76 -
Preglednica 14: Seznam raztopin za modifikacijo konjugatne blazine .....	- 77 -
Preglednica 15: Vpliv modifikacije konjugatne blazine na čas sproščanja oznak in na čas do obarvanja kontrolne linije.....	- 78 -
Preglednica 16: Rezultati na LFIA testih. ....	- 80 -
Preglednica 17: Občutljivost testa .....	- 80 -

## UPORABLJENE KRATICE

AuND	Nanodelci zlata
BSA	Goveji serumski albumin (angl. Bovine serum albumin)
Citrat	Trinatrijev citrat
DDT	1-dodekantiol
DLVO	Derjaguin, Landau, Verwey in Overbeek
HGZ	Heksagonalni gosti zlog
LFIA	Imunoserološki test na lateralni tok (angl. Lateral flow immunoassay)
PBS	Fiziološka raztopina fosfatnega pufra
PCK	Ploskovno centrirana kristalna struktura
PCR	Verižna reakcija s polimerazo

PEG	Polietilenglikol
PVP	Polivinilpirolidon
RBD	Reaktivna vezavna domena (angl. Reactive binding domain)
SDS	Natrijev dodecilsulfat
SIMS	Sekundarna ionska masna spektrometrija
TEM	Presevna elektronska mikroskopija
USP	Ultrazvočna razpršilna piroliza
XPS	Rentgenska fotoelektronska spektroskopija

## 1 UVOD

Hitri diagnostični testi na lateralni tok (LFIA testi) igrajo ključno vlogo v številnih analitskih okoljih, kot so klinična in biofarmaceutvska diagnostika, pri spremljanju pojavov v okolju, testiranju hrane in v osebni diagnostiki [1]. Ta ključna vloga LFIA testov je še posebej prišla do izraza z izbruhom pandemije covid-19, kjer je hitro, zanesljivo in selektivno prepoznavanje novega koronavirusa SARS-CoV-2 omogočalo zgodnjo prepoznavo okužbe. To je bilo pomembno zaradi kompleksnega prenosa in omejitve širjenja bolezni covid-19, saj LFIA testi omogočajo prepoznavanje tako simptomatičnih kot asimptomatičnih oseb. Prepoznavanje teh oseb je bilo ključnega pomena za zaježitev širjenja bolezni, saj so zaradi povečane hospitalizacije na oddelkih intenzivne nege praktično čez noč bile preobremenjene vse zdravstvene ustanove [2], [3]. Ta situacija je pripeljala tudi do preobremenitev primarne diagnostične službe, saj se je v začetni fazi epidemije izključno uporabljalo teste na osnovi verižne reakcije s polimerazo v realnem času, v splošnem imenovane kot RT-PCR testi. Ta diagnostična metoda je sicer izjemno občutljiva in zelo natančna. Njena slabost je edino razmeroma dolg čas za izvedbo laboratorijske preiskave, ki ob tem zahteva specializirano opremo in strokovno usposobljeno osebje, ki zna interpretirati rezultate. Kot dodatna podpora tej metodi in kot prva linija zaznave virusa SARS-CoV-2 so se v sredini leta 2020 začeli uporabljati LFIA testi, ki omogočajo zaznavo potencialne okužbe pri testirancu v razmeroma kratkem času, od 5 do 30 min [4]–[8].

LFIA testi delujejo na principu potovanja kapljevinskega vzorca skozi različne membrane s pomočjo zunanjih sil. Na membrane so v diskretnih točkah ali črtah nanešene oziroma pritrjene molekule, ki lahko reagirajo z vzorcem in ga ujamejo, kar omogoča zaznavo prisotnosti potencialne okužbe pri testirancu [9]. LFIA testi so sestavljeni iz vzorčne in konjugatne blazine, zaznavne nitrocelulozne kromatografske membrane in vpojne blazine [10]. Osnova vsakega LFIA testa sta lovilna molekula oziroma bioreceptor in oznaka, ki je iz skupine nanomaterialov; najpogosteje se za ta namen koristijo nanodelci Au (AuND) ter drugi magnetni, polimerni, srebrni, ogljični in fluorescentni nanodelci, kakor tudi kvantne pike idr. [11]). Vsak test mora vsebovati vsaj dve lovilni molekuli, ki omogočata konjugacijo na oznako. Navedena zahteva izhaja iz ključne funkcije lovilne molekule, ki je, da se veže na specifično protitelo ali virus oziroma na drug analit, ki ga iščemo. Ob tem mora lovilna molekula imeti visoko afiniteto in

selektivnost na iskana protitelesa ali virus [9], [12], [13]. Izbira lovilnih molekul je pogojena z analitom, ki ga želimo zaznati.

V doktorskem delu smo izbrali protitelesa za virus SARS-CoV-2, ki pripada rodu beta-koronavirusov s premeri med 50–200 nm. Virusna kapsida je na površini obdana z značilnimi bodičastimi S-proteini (angl. “spike”), ki mu dajejo značilen videz [14], [15]. Pregled literature in stanje raziskav [5], [15] je pokazalo, da bi bilo možno za zaznavo protiteles virusa SARS-CoV-2 uporabiti ustrezne specifične proteine, ki bi bili lahko vezani na oznake [5] in bi tako omogočali obarvanje testnih linij v LFIA testu.

Ključna funkcija oznake je, da omogoča enostavno zaznavo protiteles ali virusa. Oznake morajo zagotavljati koloidno stabilnost v suspenziji pri različnih pogojih, visoko stabilnost v suhem, dobro redispersibilnost ter konstantne lastnosti, ki omogočajo ponovljivo in prilagodljivo konjugacijo oziroma njihovo sproščanje. Prav tako morajo biti komercialno dosegljive z ugodno ceno in enostavno proizvodnjo [9], [16]. Pregled stanja tehnike je pokazal, da je trenutno najpogostejša oznaka v komercialnih LFIA testih koloidno zlato, saj ima večino zahtevanih lastnosti [17]. Kot alternativa koloidnemu zlatu je mogoče za oznake v LFIA testih uporabiti AuND, ki jih lahko sintetiziramo z različnimi kemijskimi in fizikalnimi metodami, med katerimi ima vsaka svoje prednosti in slabosti [18]–[20]. Večina sinteznih metod AuND ima nizko produktivnost (nekaj mg/h). Do zdaj sta se na industrijskem nivoju uveljavili dve ključni metodi: redukcija raztopin Au<sup>3+</sup> in Au<sup>1+</sup> [4], [19], ter laserska ablacija [21]–[23], ki pa omogočata sintezo le v omejenih količinah [24]. Za oznake v LFIA testih je pri AuND treba upoštevati zahteve po njihovih lastnostih, kjer izstopajo ustrezna velikost, oblika in velikostna porazdelitev, če želimo doseči visoko stopnjo zanesljivosti, natančnosti in občutljivosti njihovega delovanja. Predhodne študije so pokazale, da so AuND z velikostjo med 40 nm in 80 nm in z visoko stopnjo sferičnosti (> 0,97) prav tisti, ki omogočajo doseganje višje natančnosti in občutljivosti [25]–[27] LFIA testov. Klinične študije in praktični primeri uporabe LFIA testov na osnovi uporabe koloidnega zlata za oznake so namreč odkrili, da ti testi ne dosegajo pričakovanih stopenj občutljivosti > 95 % in specifičnosti > 98 %, kot jih zahteva svetovna zdravstvena organizacija [16], [28]–[30]. Tudi predhodno opravljene raziskave oznak na osnovi koloidnega zlata, odvzetih iz LFIA testov, ki so se uporabljali v slovenskih zdravstvenih ustanovah, so pokazale, da velikosti oznak v teh testih niso skladne s teoretično postavljenimi zahtevami za uporabo v LFIA testih.

V sklopu iskanja alternativnih metod sinteze oznak za LFIA teste smo ugotovili, da bi se za ta namen lahko uporabila ultrazvočna razpršilna piroliza (USP), ki je preprosta in fleksibilna

metoda za sintezo različnih vrst nanodelcev. Pri USP je mogoč enostaven nadzor nad tehnološkimi parametri, ki narekujejo lastnosti nanodelcev, ki so pomembne za namen uporabe kot oznake v LFIA testih [31]–[36]. Z USP se sintetizirajo AuND iz kapljic raztopin različnih kovinskih soli (zlatov (III) klorid, zlatov (III) acetat, zlatov (III) nitrat) [37], ki nastanejo s pomočjo ultrazvoka s frekvencami od 1,6 do 2,5 MHz. Kapljice se iz generatorja nato transportirajo z inertnim nosilnim plinom v reaktor, kjer se kovinske soli v prisotnosti reducirnega plina ( $H_2$ ) in pri povišanih temperaturah reducirajo v AuND. Nastali nanodelci se zbirajo v zbiralnih steklenicah v primernem zbiralnem mediju, kot npr. demineralizirana voda, ki se ji dodajo različni stabilizatorji in modifikatorji kot npr.: natrijev citrat, polivinilpirolidon (PVP) ali polietilen glikol (PEG), ki preprečujejo aglomeracijo AuND ne samo v suspenziji, ampak tudi kasneje med postopkom sušenja. Ključna prednost metode USP je, da omogoča kontinuirno sintezo večjih količin ( $> 1$  g/h) okroglih AuND z ozko porazdelitvijo velikosti [38]–[42].

Z dosedanjim raziskovalnim delom nam je z metodo USP uspelo sintetizirati sferične AuND z velikostno porazdelitvijo  $60 \pm 20$  nm. Ti AuND so bili stabilizirani z različnimi koncentracijami PVP. Uporaba PVP stabilizatorja je bila ključna za kasnejši postopek sušenja AuND, kjer smo uporabili liofilizacijo. Razlog za pripravo posušenih AuND je v tem, da imajo daljšo življenjsko dobo in omogočajo lažje rokovanje v kasnejših postopkih obdelave za pripravo oznak. Postopek stabilizacije je tako ključnega pomena za doseganje funkcionalnosti AuND, ko so ti nanešeni na konjugatno blazino, kjer morajo oznake ohraniti dolgoročno stabilnost v suhem stanju in omogočiti hitro sprostitvev s konjugatne blazine pri uporabi LFIA testa. Raziskave so pokazale, da PVP deluje kot stabilizator pri liofilizaciji kot t. i. kriostabilizator [43], [44].

Vsled naštetih prednosti USP metode in na osnovi rezultatov dosedanjih raziskav, smo postavili hipotezo, da USP omogoča sintezo AuND, s katerimi je z naknadno stabilizacijo možno izvesti njihovo konjugacijo s ciljnim antigeni SARS-CoV-2 in rekombinantnim IgG. Ti bodo v LFIA testu uspešno delovali kot oznake za potrditev potencialne prisotnosti protiteles bolezni COVID-19.



## 2 NANOMATERIALI KOT KOMPONENTE V DIAGNOSTIČNIH PRIPOMOČKIH

Nanomateriali so materiali, ki imajo vsaj eno dimenzijo v velikostnem redu nanometra, običajno med 1 in 100 nanometri. Na tej lestvici se lahko lastnosti materialov zaradi kvantnih in površinskih učinkov bistveno razlikujejo od njihovih makro primerkov, saj imajo edinstvene fizikalne, kemijske in biološke lastnosti [45]–[47]. Odkritih in sintetiziranih je bilo več različnih nanomaterialov, ki jih razvrščamo glede na njihovo obliko (nanocevke, nanožice, nanosfere, nanopalice, nanoplošče in nanovlakna), sestavo (kovinski nanodelci, keramični nanodelci, polimerni nanodelci in nanodelci na osnovi ogljika), lastnosti (magnetni nanodelci, kvantne pike, kovinske nanožice in ogljikove nanocevke) in uporabo (nanomedicina, nanoelektronika, nanokatalizatorji in nanosenzorji). Med nanomateriali imajo AuND posebne lastnosti, med katerimi izstopa zmožnost njihove vezave oziroma konjugacije z biomolekulami, kar omogoča uporabo AuND za diagnostične namene v medicini. To je izhodišče za postavitve teze doktorske disertacije, da bi z AuND, sintetiziranimi z USP, bilo možno izvesti konjugacijo s ciljnim antigeni virusa SARS-CoV-2 in antigeni protiteles tako, da bi AuND v LFIA testu delovali kot oznake za potrditev potencialne prisotnosti protiteles bolezni covid-19 [48], [49].

### 2.1 Predstavitev nanomaterialov

Nanomateriali lahko razvrstimo glede na njihovo velikost, kemijsko sestavo in strukturo. Tri osnovne skupine nanomaterialov glede na velikost pod 100 nm so: ničdimenzionalni (0D), enodimenzionalni (1D) in dvodimenzionalni (2D) materiali.

Primeri 0D nanomaterialov vključujejo kvantne pike, fulerene in nanodelce. Kvantne pike so polprevodniški nanodelci velikosti nekaj nanometrov, ki imajo edinstvene optične in elektronske lastnosti. Fulereni so molekule na osnovi ogljika s strukturo, podobno nogometni žogi, ki imajo edinstvene mehanske in elektronske lastnosti. AuND so vrsta anorganskih nanomaterialov, ki jih je mogoče glede na njihovo dimenzijo razvrstiti kot 0D nanodelce. AuND so sestavljeni iz atomov zlata in imajo lahko različne oblike in velikosti, vključno s krogli, palicami (1D) in trikotniki (0D) [50]–[52].

1D materiali imajo eno dimenzijo izven nanometerskega merila. Primeri 1D nanomaterialov vključujejo nanožice, nanopalice in nanocevke. Nanožice in nanopalice so podolgovate strukture s premeri v območju nanometrov in dolžinami v območju mikronov ali milimetrov.

Nanocevke so cilindrične strukture s premerom nekaj nanometrov in dolžino v območju mikronov. 1D nanomateriali se pogosto uporabljajo v elektroniki, energetiki in katalizi [50]–[52].

2D materiali imajo dve dimenziji izven nanometrskga merila. Primeri 2D nanomaterialov so grafeni, dihalkogenidi prehodnih kovin in borov nitrid. Grafen predstavlja eno plast ogljikovih atomov, ki so razporejeni v šesterokotno mrežo, zaradi česar ima edinstvene elektronske, mehanske in toplotne lastnosti. Dihalkogenidi prehodnih kovin so polprevodniški materiali s plastovito strukturo, ki imajo potencialno uporabo v elektroniki in optoelektroniki. Borov nitrid je material, ki ima podobno strukturo kot grafen, vendar je sestavljen iz atomov bora in dušika namesto atomov ogljika [50]–[52].

3D nanomateriali so materiali, katerih dimenzije so izven nanometrskga območja, vendar vsebujejo osnovne gradnike, ki so v nanometrskih velikostih. Ti materiali so lahko sestavljeni iz različnih materialov – od kovin, kovinskih oksidov, keramike, polimerov do bioloških snovi. Primeri 3D nanomaterialov vključujejo nanostrukturirane kovine, kot sta nanoporozno zlato in srebro, ter kompleksne oksidne strukture, kot sta mezoporozni titan in silicijev dioksid. 3D nanomateriali imajo edinstvene lastnosti, ki se bistveno razlikujejo od 1D ali 2D nanomaterialov. Njihova značilnost je velika površina, možnost manipulacije z velikostjo in deležem poroznosti, zaradi česar so privlačni za aplikacije, kot so kataliza, shranjevanje energije in ločevanje plinov [50]–[52].

Nanomaterialie lahko razvrstimo tudi glede na njihovo sestavo (kot je to prvi opisal J. J. Berzelius leta 1807) [53], tako da so lahko organski, anorganski ali hibridni. Organski nanomateriali so sestavljeni iz organskih molekul, kot so proteini, lipidi in nukleinske kisline. Anorganski nanomateriali so sestavljeni iz anorganskih spojin, kot so kovine, kovinski oksidi in polprevodniki. Hibridni nanomateriali so kombinacija organskih in anorganskih materialov ter imajo lahko edinstvene lastnosti, ki jih ne najdemo v njihovih posameznih komponentah [54], [55].

Nanomaterialie lahko razvrstimo tudi glede na njihovo strukturo, ki je lahko kristalna, amorfna ali kompozitna. Kristalni nanomateriali imajo natančno definirano kristalno strukturo, medtem ko amorfni nanomateriali nimajo definirane kristalne reda. Kompozitni nanomateriali so razred nanomaterialov, ki so sestavljeni iz dveh ali več različnih materialov na nanometrskem merilu. Primeri kompozitnih nanomaterialov vključujejo kompozite ogljikovih nanocevk in polimerov, kompozite grafena in kovinskega oksida ter kompozite kovinskih nanodelcev in

ogljika. Ti materiali imajo potencialno uporabo na številnih področjih, kot so shranjevanje energije, kataliza in biomedicinski inženiring [56].

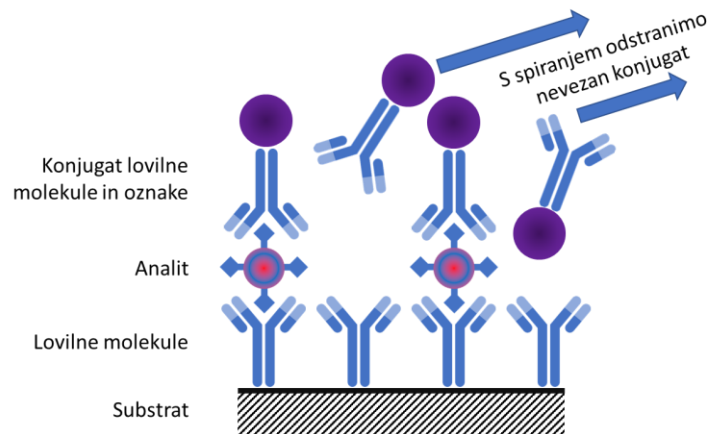
## 2.2 Opredelitev diagnostičnih metod

Nanomateriali se zaradi svojih edinstvenih fizikalnih, kemijskih in bioloških lastnosti v veliki meri uporabljajo v številnih diagnostičnih metodah v biomedicini. Nanomateriale je mogoče uporabiti za izdelavo biosenzorjev, ki zaznavajo biomolekule, kot so proteini in nukleinske kisline. Primer so AuND, kvantne pike in ogljikove nanocevke, ki se pogosto uporabljajo v biosenzorjih zaradi svojih edinstvenih optičnih in elektronskih lastnosti. Različne medicinske metode, kot so slikanje z magnetno resonanco (MRI), računalniška tomografija (CT) in optično slikanje, uporabljajo nanodelce FeO, AuND in kvantne pike zaradi njihovih edinstvenih kontrastnih lastnosti [57]. Trenutno najširše področje uporabe nanomaterialov je diagnostika na kraju samem (Point-of-care), kjer se ti uporabljajo v diagnostičnih napravah, saj je možno z njihovo pomočjo izvajati hitro in dokaj zanesljivo diagnostiko ob pacientovi postelji. To vključuje papirnate mikrofluidne naprave, teste na osnovi lateralnega toka in naprave na čipu. Posebna vrsta tovrstnih naprav so imunski testi, kjer se nanodelce uporablja za oznake pri odkrivanju prisotnosti specifičnih biomolekul, kot so antigeni ali protitelesa. AuND, kvantne pike in magnetni nanodelci se običajno uporabljajo kot oznake v imunskih testih zaradi svojih lastnosti, kot so barva, fluorescenca ali povečana aktivnost v magnetnem polju [9], [58], [59].

Ključna in ciljna diagnostična metoda, s katero smo se ukvarjali v tej doktorski nalogi, je metoda imuno-seroloških testov. Ti uporabljajo reagente za ustvarjanje signala iz majhnih količin ciljnega analita v vzorcu. Pogosto se za ta namen koristijo protitelesa, ki so po naravi zelo selektivna in se vežejo samo na svoje specifične tarče, tudi v prisotnosti velikega števila drugih komponent v vzorcu. Ker so analiti prisotni v majhnih koncentracijah, ni dovolj, da jih preprosto »ujamemo«, da bi vedeli, koliko jih je. Za ustvarjanje signala iz zajetega vzorca je treba uporabiti drug reagent, ki lahko njihov signal ojača.

Najpreprostejša oblika imunskega testa je test po imuno-metrični zasnovi (Slika 1). Lovilne molekule, ki so imobilizirane na površino substrata, ulovijo testni analit iz vzorca. Po kratkem času inkubacije, ki zagotavlja zadostno stopnjo vezave z analitom, se doda konjugat oznake in lovilne molekule, ki je specifičen za drug del molekule analita. Ta je osnova sistema za generiranje signala. Po kratkem času inkubacije med konjugatom oznaka/lovilna molekula in analitom se nevezane komponente odstrani s postopkom spiranja. Razlika v intenziteti

obarvanja oznake pred spiranjem in po spiranju predstavlja signal za določitev vsebnosti analita. Intenzivnost tako določamo na osnovi spremembe barve, kot je primer za oznake AuND, alternativno pa lahko v odvisnosti od vrste oznak za določitev signala koristimo tudi fluorescenčno sevanje, magnetno polje ali radioaktivni izvor [1], [60], [61].



Slika 1: Shema enostavnega imunskega testa

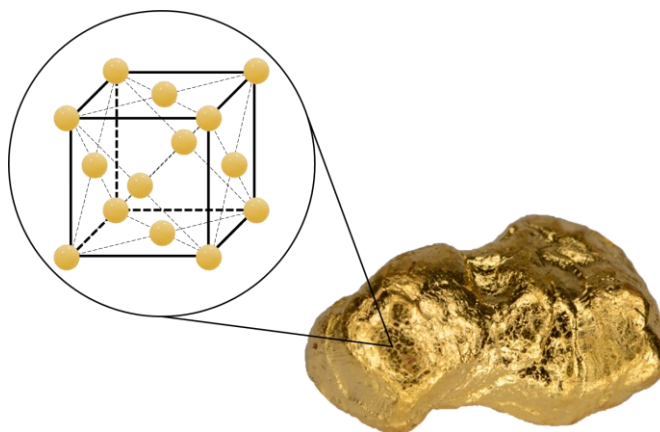
Za lovilne molekule se najpogosteje uporabljajo različne proteine, kot so protitelesa ali proteini, ki se pojavljajo na površini virusov. Te se lahko imobilizirajo na substrat in tako iz vzorca ulovijo specifična protitelesa za ta virus. Tovrstni testi delujejo dobro, če je ciljni analit velika molekula z zadostno površino, da sprejme dve molekuli protitelesa [61]. Za imunske teste, ki so namenjeni za zaznavo manjših spojin, kot so zdravila ali droge, je potreben drugačen pristop. V teh testih se uporablja samo eno protitelo, ki je prisotno v omejeni količini. Drugi ključni reagent, imenovan kot sledilnik, je narejen iz ciljnega analita, označenega z ustreznim materialom za ustvarjanje signala, kot je radioizotop ali encim. Delež sledilca, ki se veže na omejena mesta protiteles, je posredno sorazmeren s koncentracijo analita v vzorcu. To je znano kot konkurenčni imunski test. Pri tej vrsti testa so kritične natančne količine imobiliziranega protitelesa in označenega analita. Pri imunskih testih se analit, na katerega se vežejo protitelesa, pogosto imenuje antigen, čeprav se beseda "antigen" nanaša na snov, ki lahko povzroči T-celični imunski odziv in s tem povezano tvorbo protiteles. Pri mnogih konkurenčnih imunskih testih so molekule analita premajhne, da bi izzvale odziv protiteles pri živalih, in jih je treba kemijsko povezati (konjugirati) z večjo molekulo, običajno protein, da se ustvarijo protitelesa [62]. Ko so protitelesa ustvarjena, je mogoče najti protitelesa pri nekaterih ali vseh cepljenih živalih, ki se vežejo samo na analit. V tem primeru se analit imenuje haptent. Molekula, ki se uporablja za imunizacijo živali, ne glede na to, ali gre za čisti analit ali konjugirano različico, se imenuje imunogen. Doslej je bila vsaka opisana vrsta imunskega testa odvisna od ločitve

nevezanega sledilnika, preden se izmeri vezan signal. Vsi ti formati testov so primeri heterogenega imunskega testa. Razviti so bili nekateri testi, ki ne zahtevajo ločevanja, pri katerih sledilnik ustvari signal šele, ko se veže na analit v imunometričnem testu ali na protitelo v konkurenčnem testu [1].

Najpogostejša in za uporabnika najenostavnejša oblika tovrstnega testa je LFIA test oziroma imuno-serološki test na lateralni tok. Znanstvena spoznanja s področja nanomaterialov v zadnjih petih letih so omogočila prenos in uporabo LFIA testov v medicini, kjer se zahteva visoka natančnost in občutljivost diagnosticiranja. Če se bodo raziskave z enako intenzivnostjo izvajale tudi v prihodnosti, bi tako lahko LFIA testi predstavljali osnovo za prehod v tehnološki izziv za postavitev povsem drugačnega laboratorijskega sistema. LFIA teste, kjer se uporablja kromatografski nitrocelulozni trak kot komponenta platforme za doseganje visoke stopnje specifičnosti, bi lahko povezali z naprednimi podpornimi tehnologijami v obliki čitalnikov za ravnanje z vzorci. To bi pripeljalo do ustvarjanja temeljev za nastanek analiznih laboratorijev, ki bi delovali izključno na osnovi LFIA testov v funkciji osnovnega diagnostičnega orodja. State of the Art pregled stanja kaže, da so bili LFIA testi že v preteklosti in bodo tudi v prihodnje vključeni v tehnologijo na znanstvenem področju diagnostičnega kontinuuma [30], [57], [63], [64].

### 3 AuND

Plemenita živorodna kovina zlato je ena izmed najbolj kovljivih in duktilnih kovin, s ploskovno centrirano kristalno strukturo (PCK) in značilno zlato barvo (Slika 2). Au ima lastnosti, da ga je mogoče razvleči v izredno dolgo žico ali valjati in skovati v izredno tanke folije, brez da bi počilo. Zlato je odličen prevodnik elektrike in toplote ter je eden od najmanj reaktivnih kemijskih elementov. Zlato je razmeroma redek element, njegova cena pa je pogosto višja od drugih kovin. Poleg znanih uporab zlata v nakitu in naložbah se zlato uporablja tudi za polprevodnike in v mikroelektroniki [65]. Zlato je nestrupeno in nereaktivno, zaradi česar je primerno za uporabo v medicini, kjer se smatra kot eden izmed najbolj biokompatibilnih elementov. To potrjuje tudi uporaba zlata v preteklosti, kjer zgodovina dentalne medicinske uporabe zlata sega celo v antične čase (2500 pr. n. št.) [66]. Splošne lastnosti zlata, so prikazane v preglednici 1. Zlato je s pomočjo različnih sinteznih metod možno pretvoriti v izredno majhne delce različnih oblik in velikosti, med katerimi so posebej pomembni AuND.



Slika 2: Zrno 99,99 % čistega Au s PCK strukturo

AuND imajo običajno PCK strukturo in primerljiv mrežni parameter, kot Au – 0,408 nm, velikost, oblika in metoda sinteze lahko vplivajo na spremembo njihove kristalne strukture, saj obstaja možnost nastanka drugih kristalnih struktur, kot je heksagonalni gosti zlog (HGZ) ali kombinacija PCK in HGZ [67]. Velikosti AuND so med 1 do 100 nm v vsaj eni izmed treh dimenzij [68]. Zaradi svoje velikosti in oblike imajo edinstvene optične, elektronske in toplotne lastnosti in se posledično razlikujejo od zlata v makro stanju. AuND je mogoče sintetizirati z različnimi metodami, ki se v splošnem delijo v dve skupini, in sicer »bottom-up« (od spodaj navzgor) in »top-down« (od zgoraj navzdol). Nastale AuND je mogoče funkcionalizirati z različnimi površinskimi prevlekami ali ligandi, da se izboljša njihova stabilnost, topnost v različnih medijih in doseže biokompatibilnost [25], [69], [70].

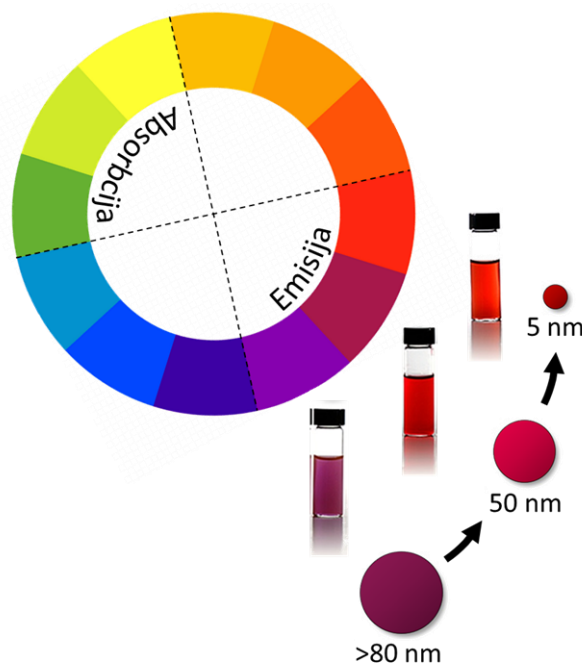
Preglednica 1: Splošne lastnosti Au [65], [71]

Kristalna struktura	PCK
Mrežni parameter	0,408 nm
Atomsko število	79
Atomska masa	196,97
Gostota	19,32 g/cm <sup>3</sup>
Tališče	1064,43 °C
Vrelišče	3080 °C
Toplotna kapaciteta	0.13 J/gK
Toplotna prevodnost	318 W/mK
Razporeditev elektronov	[Xe] 4f <sup>14</sup> 5d <sup>10</sup> 6s <sup>1</sup>
Ionski radij	0,85 Å
Električna upornost	22,14 nΩ/m
Natezna trdnost	120 Mpa
Modul elastičnosti	97 Gpa
Trdota po mohs	2,5

### 3.1 Lastnosti AuND

AuND imajo visoko razmerje med površino in prostornino. Učinek tega je, da so lastnosti površine bolj izrazite od lastnosti sredice. Ta vpliv izrazito narašča s padajočo velikostjo, še posebej v primeru okroglih nanodelcev. Pri določeni velikosti postanejo vplivi površine dominantni [72]. Pri nanodelcih se pojavi tudi krčenje osnovne kristalne mreže. To se nanaša na pojav, pri katerem je kristalna mreža nanodelcev stisnjena ali skrčena v primerjavi s klasičnimi materiali. Ta pojav se lahko zgodi zaradi več dejavnikov, vključno s površinsko napetostjo, napakami v kristalni strukturi in spremembami v elektronski strukturi atomov na površini nanodelcev. Na splošno krčenje mreže v nanodelcih vodi do višje površinske energije in njihove višje reaktivnosti [73]–[75]. Površina nanodelcev določa njihove fizikalne lastnosti, kot sta stabilnost, topnost in reaktivnost.

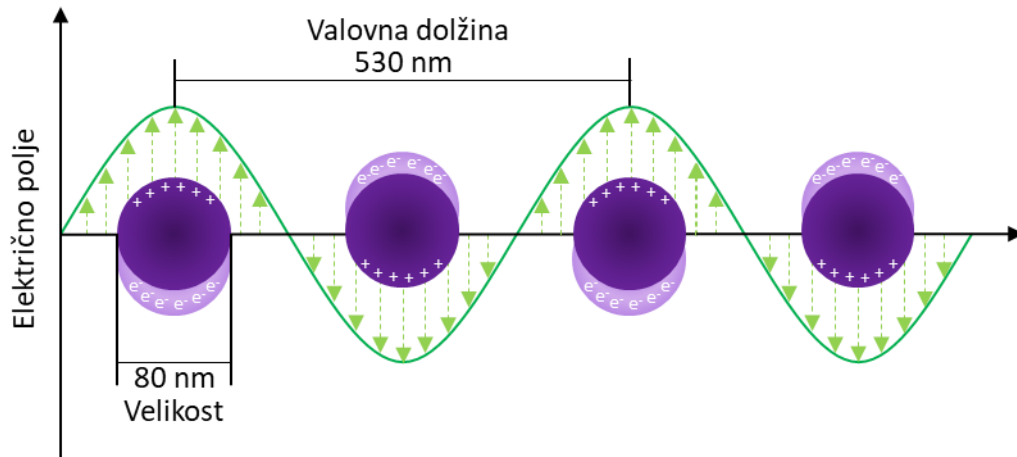
Kovinski nanodelci imajo dodatno posebno lastnost, in sicer je to površinska plazmonska resonanca, ki je še posebej izrazita pri AuND, saj njihova plazmonska resonanca in s tem povezana sprememba barve sovpada s človeku vidnimi valovnimi dolžinami svetlobe, kar vidimo kot značilno obarvanost (Slika 3) [76]–[78].



Slika 3: Vidna barva in prikaz absorbirane barve okroglih AuND v odvisnosti od njihove velikosti

Površinska plazmonska resonanca povzroča nihanje prevodnih elektronov na površini nanodelcev, ki jih resonančno (v fazi) spodbuja elektromagnetno polje vpadne svetlobe. AuND

so poleg nanodelcev srebra in bakra najpogostejši nanodelci, ki izkazujejo plazmsonsko resonanco v človeku vidnih valovnih dolžinah svetlobe [79]. Učinek plazmsonske resonance ojača sevalne in nesevalne lastnosti nanodelcev [70], kot sta sipanje in absorpcija. Nihanje prevodnih elektronov okoli površine delca povzroča razlike v nabojih v atomski strukturi in ustvarja dipolno nihanje v smeri električnega polja vpadne svetlobe (Slika 4).



Slika 4: Shema učinka površinske plazmsonske resonance pri AuND

Skupna nihanja prevodnih elektronov ali obratno nihanje plazme imenujemo plazmon. Amplituda nihanj doseže maksimum pri določeni frekvenci, ki jo imenujemo površinska plazmsonska resonanca. Frekvenco nihanja določajo: kristalna zgradba nanodelca, efektivna elektronska masa, gostota elektronov ter oblika in velikost porazdelitve naboja [80], [81]. To povzroči močno absorpcijo vpadne svetlobe, ki jo je mogoče izmeriti z merilnimi inštrumenti, kot je UV-Vis absorpcijski spektrometer. Barva AuND in nanodelcev srebra je tako povsem drugačna, če jo primerjamo z znano barvo obeh kovin na makro nivoju.

Intenzivnost resonančnega pasu in valovna dolžina sta odvisni od več dejavnikov, ki vplivajo na gostoto naboja elektronov na površini delca. Ti dejavniki so: kristalna zgradba in velikost nanodelca; oblika, struktura in površina nanodelca; sestava in dielektrične lastnosti okoliškega medija [80]. Okrogli AuND imajo značilno visoko absorpcijo zelenih valovnih dolžin (območje 520 nm), kar je ob vpadu bele ali sončne svetlobe vidno kot rdeča obarvanost. Sprememba v velikosti, obliki in površini nanodelcev običajno povzroči spremembo valovne dolžine absorbirane svetlobe in s tem posledično tudi barvo AuND, ki jo vidimo.

Intenzivnosti sipanja in absorpcije nanodelcev plemenitih kovin so do 40 x večje kot pri drugih kovinah. Svetlost, barvna intenzivnost in široka paleta barv in optičnih lastnosti plazmsonskih nanodelcev je razlog za njihovo uporabnost v številnih aplikacijah, od odkrivanja biomolekul,

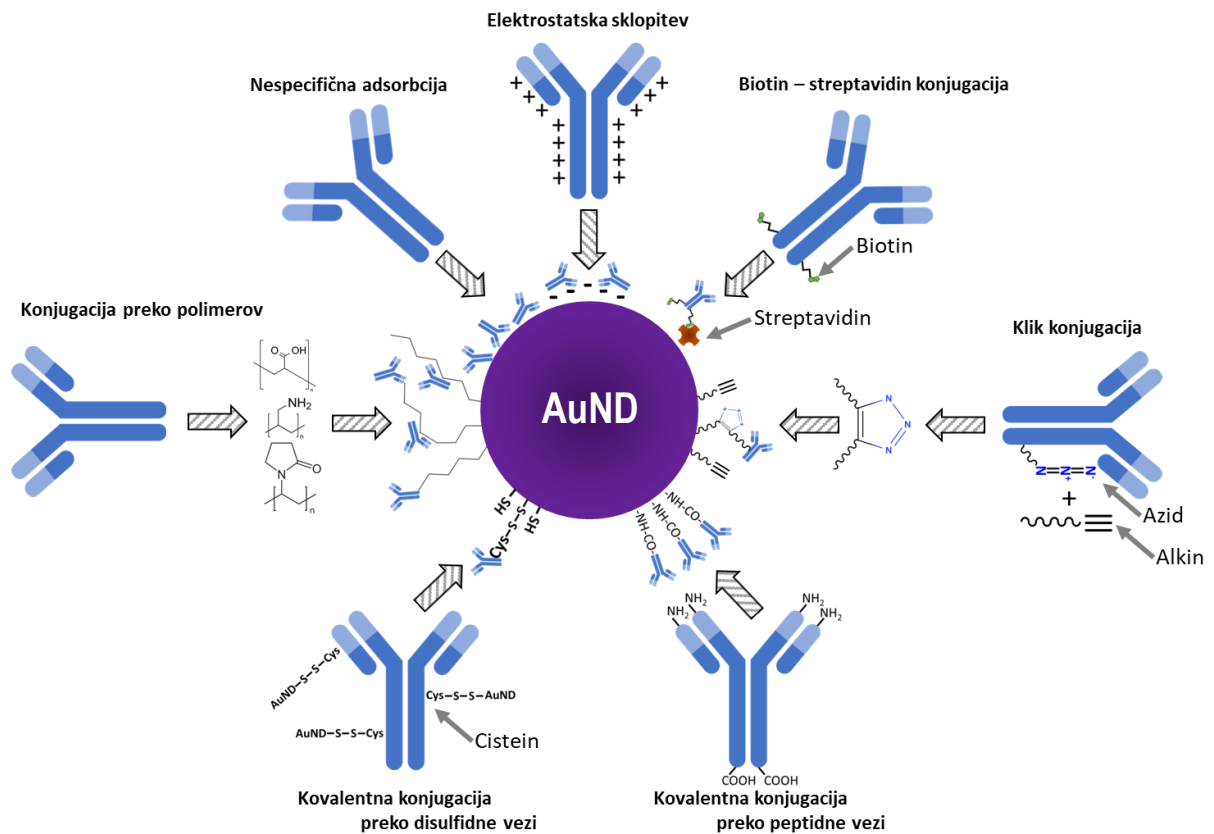


molekul do materialov za pridobivanje sončne energije ter do odkrivanja in uničevanja rakavih celic [31], [69], [70], [80].

### 3.2 Funkcionalizacija

Inertne lastnosti zlata, ki so bile dokazane na osnovi kliničnih študij, so bile prav tako potrjene tudi pri AuND, zaradi tega so ti prvenstveno primerni za biološke in in-vivo aplikacije [31], [82]–[85]. Obstajajo dokazi, da AuND lahko blagodejno vplivajo na tkiva, pri čemer spodbujajo nastanek kolagena in delitev celic, kar je v zadnjih letih pritegnilo interes kozmetične industrije [86]–[88]. AuND imajo, kljub svoji inertnosti, zaradi velikega razmerja med površino in volumnom, krčenja osnovne mreže in površinske plazmonske resonance, površinski naboj [89]. Ta v določenih primerih omogoča vzpostavitev kovalentne vezi in nekovalentno vezavo spojin na površino AuND [1], [90], [91]. Poznani so različni vezavni mehanizmi, ki jih lahko skupno imenujemo z besedo "konjugacija". Pri konjugaciji se na površino nanodelcev pripnejo različne spojine od preprostih molekul ali ligandov, do polimerov in celo kompleksnih proteinov, kot so protitelesa in antigeni [90].

Vezava med protitelesi/antigeni in AuND je odvisna od: ionske privlačnosti med negativno nabitim AuND in pozitivno nabitim protitelesom/antigenom, hidrofobne privlačnosti in dativne (koordinirane) vezave med površinskimi elektroni AuND in žveplovimi atomi aminokislin. Kemijske interakcije med protitelesi in površino nanodelcev se običajno dosežejo z kemisorpcijo prek tiolnih derivatov; z uporabo bifunkcionalnih povezovalcev, z uporabo ionske sklopitve ter z uporabo adapterskih molekul. Za tovrstno biokonjugacijo je uporabljen tako kovalenten in nekovalenten načina imobilizacije. Prvenstveno se protitelesa/antigeni ali druge funkcionalizirane skupine nespecifično adsorbirajo na AuND z nekovalentnimi načini vezave, ki temeljijo na kombinaciji elektrostatičnih in hidrofobnih interakcij, kar ohrani negativen naboj AuND. V primeru zadostnega naboja AuND lahko to zagotavlja stabilnost v koloidni disperziji [4], [26], [90].



Slika 5: Shema različnih mehanizmov konjugacije proteinov oziroma specifičnih protiteles IgG na površini AuND

**Ionska** oziroma **elektrostatska sklopitev** poteka po mehanizmu različnega naboja površine dveh reagirajočih partnerjev za vezavo obeh komponent skupaj v konjugat. Površinski naboji protiteles so odvisni od pH. Pri večini pogojev spajanja, koristimo pH 7,5, kar je skladno s pogoji v telesu. Ker so AuND najpogosteje pripravljene in stabilizirane s citratom, imajo negativen naboj, kar v raztopini povzroči elektrostatično interakcijo med obema reaktantoma. Ta metoda je zelo preprosta, zato se pogosto uporablja v laboratorijih. Njena slabost je v tem, da je stabilnost produktov slaba, saj lahko na ionske interakcije zlahka vplivajo dejavniki, kot so pH, ionska moč, ter koncentracija in narava topila. Poleg stabilnosti je težava tudi v orientaciji posamičnih protiteles na površini nanodelcev. Optimalna orientacija molekule na površini nanodelcev je ključnega pomena. V primeru uporabe protiteles mora biti njihovo reaktivno območje usmerjeno stran od površine nanodelcev in biti prosto za interakcije s tarčami v raztopini. Največja pomanjkljivost tega postopka je ravno naključna narava elektrostatske sklopitve, ki lahko povzroči neugodno prostorsko vezavo. Dodatna potencialna pomanjkljivost je vpliv naboja protitelesa na celoten naboj konjugata, ki lahko povzroči aglomeracijo nanodelcev [92]–[94].

**Tiolna sklopitev** poteka s funkcionalnimi skupinami tiola in je široko uporabljena metoda za pritrjevanje biomolekul, kot so proteini, peptidi, protitelesa in nukleinske kisline, na površino nanodelcev. Ta metoda vključuje tvorbo kovalentne vezi med tiolno (-SH) skupino na biomolekuli in površino AuND prek vezi Au-S. Konjugacija z AuND na osnovi tiola je preprosta in učinkovita metoda, saj ima veliko biomolekul tiolne skupine, ki jih je mogoče enostavno spremeniti za pritrnitev na površine AuND, pri čemer se tvori značilna -S-S- vez med dvema tiolnima skupinama. Poleg tega je vez Au-S močna in stabilna, kar ima za posledico trajno pritrnitev biomolekule na površino AuND. Za izvedbo konjugacije z AuND na osnovi tiola je na biomolekulo potrebno najprej vezati tiolno skupino, to je mogoče storiti s kemično modifikacijo ali genskim inženiringom. AuND površino nato aktiviramo z reagentom, kot je 2-iminotiolan ali N-sukcinimidil 3-(2-piridilditio) propionat (SPDP), ki na površino AuND uvede tiol-reaktivne skupine. S tiolom modificirano biomolekulo nato dodamo na površino aktiviranega AuND, kjer tiolna skupina reagira s tiolno reaktivnimi skupinami na površini AuND in tvori vez Au-S. Konjugacija z AuND na osnovi tiola je vsestranska metoda, ki se lahko uporablja za različne aplikacije, kot so biosenzorji, dostava zdravil in slikanje. Vendar pa je pomembno optimizirati reakcijske pogoje, kot sta pH in temperatura, da zagotovimo učinkovito konjugacijo in preprečimo nespecifično vezavo [95]–[97].

**Nespecifična adsorpcija:** nekatere biomolekule, kot so proteini in peptidi, se lahko adsorbirajo na površino AuND z nespecifičnimi interakcijami, kot so van der Waalove sile in hidrofobne interakcije. Nespecifična adsorpcija je preprosta in hitra metoda za pritrnitev biomolekul na površino AuND, vendar lahko povzroči šibko in reverzibilno vezavo, kar lahko omeji njeno uporabnost v nekaterih aplikacijah. Ena od glavnih prednosti nespecifične adsorpcije je, da ne zahteva nobene kemične modifikacije biomolekule, kar lahko poenostavi proces konjugacije. Vendar lahko nespecifična adsorpcija povzroči tudi nespecifično vezavo drugih biomolekul in nečistoč, kar lahko moti želeno interakcijo. Poleg tega nespecifična adsorpcija morda ne zagotavlja stabilne in trajne pritrnitve biomolekule na površino AuND, kar pogosto omeji njeno uporabnost [1], [57].

**Biotin-avidin/streptavidin konjugacija** na AuND je metoda za pritrjevanje biotiniliranih biomolekul na površino AuND prek interakcij z visoko afiniteto med biotinom in avidinom ali streptavidinom. Biotin je majhna molekula, ki jo je mogoče enostavno pritrčiti na biomolekule, kot so proteini in nukleinske kisline, z uporabo biotinilacijskih reagentov. Avidin in streptavidin sta proteina, ki imata zelo visoko afiniteto za biotin, z disociacijskimi konstantami v nanomolarnem do pikomolarnem območju. Za izvedbo konjugacije biotin-avidin/streptavidin

je površina AuND najprej modificirana z avidinom ali streptavidinom, kar je mogoče doseči z različnimi metodami, kot je fizikalna adsorpcija, kovalentna vezava ali samosestavljanje enoplastne plasti. Biotinilirana biomolekula se nato doda na modificirano površino AuND, kjer medsebojno deluje z avidinom ali streptavidinom prek interakcije biotin-avidin/streptavidin. Posledica tega je močna in stabilna pritrđitev biotinilirane biomolekule na površino AuND. Konjugacija biotin-avidin/streptavidin z AuND je vsestranska metoda, ki se lahko uporablja za različne aplikacije, kot so biosenzorji, dostava zdravil in slikanje. Ena od prednosti te metode je visoka specifičnost in afiniteta interakcije biotin-avidin/streptavidin, ki lahko zmanjša nespecifično vezavo in poveča občutljivost in selektivnost LFIA testa [1], [98], [99].

**Kovalentna sklopitev** AuND je metoda za pritrđitev biomolekul na površino AuND s tvorbo kovalentne vezi med biomolekulo in površino AuND. Rezultat te metode je močna in stabilna pritrđitev biomolekule na površino AuND, kar je lahko koristno za aplikacije, ki zahtevajo dolgoročno stabilnost in vzdržljivost. Za izvedbo konjugacije s kovalentno vezjo se površina AuND najprej modificira s funkcionalnimi skupinami, kot so tioli (-SH), amini (-NH<sub>2</sub>) ali karboksilne kisline (-COOH), ki lahko reagirajo z ustreznimi funkcionalnimi skupinami na biomolekuli. Biomolekula se nato doda modificirani površini AuND, kjer reagira s funkcionalnimi skupinami z različnimi kemijskimi reakcijami, kot je izmenjava tiol-disulfid, spajanje amin-karboksilne kisline ali klik kemija. Posledica tega je nastanek kovalentne vezi med biomolekulo in površino AuND. Kovalentna konjugacija AuND zagotavlja stabilno in trajno pritrđitev biomolekule na površino AuND, kar je lahko koristno za različne aplikacije, kot so biosenzorji, dostava zdravil in slikanje. Poleg tega lahko kovalentna vez zagotovi visoko specifičnost in selektivnost biomolekule za površino AuND, kar lahko zmanjša nespecifično vezavo in poveča občutljivost in natančnost LFIA testa. Pri tem je treba opozoriti, da je konjugacija AuND s kovalentno vezjo tudi bolj zapletena in dolgotrajnejša metoda v primerjavi z drugimi metodami konjugacije in lahko zahteva optimizacijo, da se zagotovi želena učinkovitost spajanja in funkcionalnost konjugirane molekule [26], [90], [100].

**Fotokemijska konjugacija** AuND je metoda za pritrđitev biomolekul na površino AuND s fotokemijsko reakcijo. Ta metoda temelji na zmožnosti fotokemijske reakcije površine AuND z določenimi molekulami, kot so aromatični ketoni in benzofenoni, ko so izpostavljeni ultravijolični (UV) svetlobi. Za izvedbo fotokemijske konjugacije je treba površino AuND najprej modificirati s fotoaktivno molekulo, kot so npr. aromatski ketoni ali benzofenon. Biomolekula se nato doda modificirani površini AuND, kjer prek nekovalentnih interakcij sodeluje s fotoaktivirano molekulo. Površina AuND je nato izpostavljena UV svetlobi, ki sproži

fotokemijsko reakcijo med fotoaktivno molekulo in površino AuND. Posledica tega je kovalentna vezava biomolekule na površino AuND prek fotoaktivacijske molekule [101], [102].

Fotokemijska konjugacija zagotavlja metodo za pritrjevanje biomolekul na površino AuND na točno določeno mesto z nadzorovanim načinom. Poleg tega ne zahteva nobene kemijske modifikacije biomolekule in se lahko izvaja v blagih pogojih, ki potencialno lahko ohranijo aktivnost in delovanje biomolekule. Pri tem še vedno obstaja tveganje, da bo prišlo do poškodbe večinskega deleža biomolekul [1].

**Konjugacija prek histidinske oznake** je metoda za pritrjevanje biomolekul na površino AuND z uporabo histidinske oznake (His-tag) in kovinskega kelatorja. Kelacija je proces tvorbe kompleksa s kovinskim ionom z usklajevanjem več donorskih atomov okoli kovinskega iona. Ligandi, vključeni v kelacijo, so običajno anorganski ioni ali organske molekule, kot je His-tag, ki je kratko aminokislinsko zaporedje, sestavljeno iz 6–10 histidinskih ostankov. His-tag omogoča specifično vezavo proteina ali peptida na kovinski kelator, kot je nitrilotriocetna kislina ali iminodiacetna kislina, ki je imobilizirana na površini AuND. Za izvedbo konjugacije z AuND, ki temelji na His-oznaki, se površina AuND najprej modificira s kovinskim kelatorjem, ki se nato uporabi za zajemanje His-označenega proteina ali peptida iz raztopine. His-tag se veže na kovinski kelator na zelo specifičen način, kar omogoča vezavo proteina ali peptida na površino AuND na določeno mesto. Ta metoda ne zahteva kemijske modifikacije biomolekule ali površine AuND, postopek pritrditve pa je mogoče izvesti v blagih pogojih in zagotavlja učinkovito metodo za pritrjevanje biomolekul na površino AuND na mestu specifičen in nadzorovan način. His-tag se pogosto uporablja pri izražanju in čiščenju rekombinantnih proteinov, zaradi česar je ta metoda združljiva s številnimi obstoječimi protokoli in delovnimi tokovi. Poleg tega je mogoče imobilizirane proteine ali peptide, označene z His, enostavno odstraniti s površine AuND s kelacijo kovin. Vendar pa lahko uporaba His-tag moti aktivnost ali delovanje proteina ali peptida, His-tag pa lahko prispeva k nespecifični vezavi na površino AuND, hkrati pa ni primeren za vse biomolekule in aplikacije.

**Klik konjugacija** je metoda za pritrditev biomolekul na površino AuND z uporabo bioortogonalnih kemijskih reakcij, ki jih imenujemo klik kemija. Ta se nanaša na razred reakcij, ki so zelo selektivne, učinkovite in biokompatibilne, zaradi česar so idealne za aplikacije biokonjugacije. Za izvedbo klik konjugacije z AuND se površina AuND najprej modificira s funkcionalno skupino, kot je alkin ali azid, ki lahko reagira s komplementarno funkcionalno skupino na biomolekuli, kot je azid ali alkin. Bioortogonalna kemijska reakcija klicanja, kot je

z bakrom katalizirana cikloadicija azid-alkina ali cikloadicija azid-alkina s sevom, se nato uporabi za kovalentno povezovanje dveh funkcionalnih skupin, ki tvorita stabilen konjugat. Metoda zagotavlja zelo specifično in učinkovito pritrjevanje biomolekul na določeno mesto na AuND na nadzorovan način. Bioortogonalna narava kemije klikov omogoča reakcijo v prisotnosti bioloških molekul, ne da bi posegali v njihovo aktivnost ali funkcijo. Poleg tega se lahko klik kemija izvede v blagih pogojih, ki lahko ohranijo aktivnost in delovanje biomolekule. Vendar pa lahko uporaba kemije klika zahteva dodatne korake za modifikacijo biomolekule in površine AuND, kar je lahko dolgotrajno in drago. Poleg tega niso vse biomolekule združljive s klik reakcijami [103]–[106].

**Konjugacija prek polimerov** je metoda za pritrjevanje biomolekul na površino AuND s pomočjo vmesne polimerne plasti, ki lahko zagotovi stabilno in biokompatibilno površino na AuND za pritržitev biomolekul. Za izvedbo polimerne konjugacije z AuND se na površini najprej imobilizira polimerni sloj. Polimer je mogoče funkcionalizirati z različnimi funkcionalnimi skupinami, kot so aminske, karboksilne ali hidroksilne skupine, ki lahko reagirajo s komplementarnimi funkcionalnimi skupinami na biomolekuli. Biomolekula se nato pritrdi na polimerno plast z uporabo metode kovalentne ali nekovalentne vezi, kot je konjugacija na osnovi tiola ali elektrostatične interakcije. Vendar pa lahko uporaba polimerne plasti v postopek konjugacije povzroči dodatno kompleksnost in spremenljivost, kar lahko vpliva na ponovljivost in doslednost rezultatov. Poleg tega lahko polimerna plast prispeva k nespecifični vezavi ali interferenci z aktivnostjo biomolekul, kar nas pri določenih aplikacijah lahko skrbi [36], [107]–[109].

### 3.3 Uporaba AuND v LFIA testih

LFIA testi so običajna in preprosta metoda za odkrivanje številnih vrst biomolekul in se uporabljajo v diagnostiki za številne vrste bolezni, vključno z nalezljivimi boleznimi, rakom in alergijami. AuND se uporabljajo v LFIA testih kot oznake zaradi svojih edinstvenih optičnih in fizikalnih lastnosti, ki jim omogočajo konjugacijo s ciljnim spojinami. Konjugacija predstavlja vezavo nanodelcev z molekulami, kot so protitelesa, nukleinske kisline, liposomske komponente ali druge biološko aktivne molekule [1].

## 4 METODE SINTEZE AuND

AuND lahko pripravimo s pomočjo različnih kemijskih ali fizikalnih metod, pri čemer ima vsaka metoda določene prednosti in slabosti. Metode delimo na postopke od spodaj navzgor, ki vključujejo sinteze ali sestavljanje nanodelcev iz atomov ali molekul, in na postopke od zgoraj navzdol, ki opisujejo zmanjšanje dimenzij večjih materialov ali struktur za pridobitev nanodelcev želenih velikosti [110]. Za majhne količine AuND večina raziskovalnih skupin v znanstvene namene uporablja metode, kot so: Turkevicheva, Brust-Schifffrinova, sinteza z  $\text{NaBH}_4$ , rast semen, sinteza vitamina C in ostale zelene metode sinteze, ki uporabljajo različne rastlinske izvlečke za redukcijo  $\text{Au}^{3+}$  v  $\text{Au}^0$  [19]. Te metode omogočajo določeno stopnjo fleksibilnosti, vendar niso primerne za doseganje visoke produktivnosti AuND z zahtevanimi končnimi lastnostmi, s čimer bi jih lahko uporabili v LFIA testih. Pregled podatkov o metodah sinteze AuND, ki jih uporabljajo vodilna svetovna podjetja na polju nanotehnologije, je praktično nedostopen. V strokovni literatura pa sta bili kljub temu omenjeni dve ključni metodi, ki se uporabljata za sintezo AuND:

- redukcija raztopin  $\text{Au}^{3+}$  in  $\text{Au}^{1+}$ , ki je šaržni postopek in omogoča pripravo AuND iz 350 L raztopine; sintetizirani AuND so različnih oblik [19], [20];
- impulzna laserska ablacija Au tarče, ki je lahko šaržni ali kontinuiran postopek, kjer fokusirani laserski žarki povzročajo ablacijo Au v plin ali kapljevino. Postopek omogoča doseganje AuND okroglih in popačenih oblik [21], [22], [23].

Glede na zapisano je USP metoda, katere ključni prednosti sta kontinuiran potek in možen nadzor velikosti ter oblik nastalih nanodelcev, odlična alternativna rešitev za doseganje visoke produktivnosti [42]. Postopek omogoča doseganje AuND okroglih in popačenih oblik.

### 4.1 Turkevicheva metoda

Sinteza AuND po Turkevichevi metodi (razvita je bila leta 1951) je preprosta in široko uporabljena tehnika za pripravo AuND z ozko porazdelitvijo velikosti. Ta metoda vključuje redukcijo zlatih ionov v prisotnosti stabilizatorja (običajno citrata), ki pomaga nadzorovati velikost in obliko nastalih nanodelcev.

Proces sinteze vključuje več korakov, vključno s pripravo prekurzorja zlata, redukcijo zlatih ionov in stabilizacijo nastalih AuND. Zlatov (III) klorid ( $\text{HAuCl}_4$ ) je najpogosteje uporabljen prekurzor za to metodo. Običajno se ga raztopi v deionizirani vodi, da se tvori raztopina s

koncentracijo 0,1 do 1 mM Au. Prekurzor se reducira z redukcijskim sredstvom, kot je natrijev borohidrid ( $\text{NaBH}_4$ ) ali trinatrijev citrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ). Pri tej metodi je citrat najpogosteje uporabljen reducent. Citratni ioni reducirajo ione zlata tako, da tvorijo kompleks z ioni zlata, ki nato reducira ione zlata v AuND. Reakcija se najpogosteje izvaja z močnim mešanjem pri temperaturi vrelišča raztopine in običajno poteka od 30 do 60 min. Potek reakcije je viden v spremembi barve v rdečo oziroma v kakšno drugo barvo v primeru sinteze, ko je zahtevano doseganje drugih oblik AuND [19], [26], [111].

Ko so AuND sintetizirani, jih je treba stabilizirati, da se prepreči njihova aglomeracija, s čimer se ohrani njihova velikost in oblika. Za stabilizator se pri tej metodi uporablja citrat, tako da se citratni ioni vežejo na površino AuND in s tem preprečujejo njihovo združevanje oziroma stabilizirajo njihovo velikost in obliko. Koncentracija citrata vpliva na velikost in obliko. Višje koncentracije povzročijo nastanek bolj sferičnih nanodelcev, nižje koncentracije pa povzročijo nastanek bolj anizotropnih nanodelcev [26].

Kljub stabilizaciji je raztopino z AuND pogosto treba filtrirati pri sobni temperaturi, da odstranimo vse velike agregate. Nastala raztopina stabiliziranih AuND se lahko hrani več mesecev brez posebnih pogojev shranjevanja.

Metoda je znana po izdelavi monodisperznih AuND z dobro stabilnostjo, nastali AuND imajo visoko stopnjo biokompatibilnosti, zaradi česar so idealni za široko paleto aplikacij ne samo v nanotehnologiji, ampak tudi v biomedicini.

## 4.2 Sinteza z Brust-Schiffrinovo metodo

Metoda Brust-Schiffrina, znana tudi kot metoda dvofazne sinteze, je široko uporabljena metoda za sintezo AuND z nadzorovano velikostjo in obliko. Ta metoda vključuje redukcijo zlatih ionov v prisotnosti tiolnega stabilizatorja v dvofaznem sistemu, ki ga sestavljata vodna in organska faza. Metoda je znana po izdelavi monodisperznih AuND z dobro stabilnostjo in z visoko stopnjo biokompatibilnosti. Metodo sta prva razvila Richard Brust in David Schiffrin leta 1994, od takrat pa so jo številni raziskovalci spremenili in izboljšali. Pri tej metodi se AuND sintetizirajo z redukcijo zlatih ionov z redukcijskim sredstvom v prisotnosti tiolnega stabilizatorja, običajno 1-dodekantiola (DDT). Podobno kot pri metodi Turkevicha je osnovni prekurzor za sintezo 0,1 do 1 mM vodna raztopina zlatovega (III) klorida. Redukcija se običajno doseže z reducenti, kot sta natrijev borohidrid ( $\text{NaBH}_4$ ) ali hidrazin. Natrijev borohidrid je najpogosteje uporabljen redukcijski agent v sklopu te metode [111].



Da bi dosegli redukcijo, se raztopina prekursorja zmeša s tiolnim stabilizatorjem, običajno 1-dodekantiolom v organski fazi. Nato se med močnim mešanjem počasi doda redukcijsko sredstvo. Reducent reducira zlate ione in tvori AuND, ki se pokažejo kot značilna rdeče/vijolična barva raztopine [112].

Tiol je pri tej sintezi primarni stabilizator. Tiolne skupine se vežejo na površino AuND prek močne tiolne (-SH) vezi. Nastalo mešanico je treba prečistiti, tako da se organska faza običajno spere z vodo, s čimer se odstranijo nereagirani reagenti in presežek stabilizatorja. Nastala organska raztopina stabiliziranih AuND je dolgoročno stabilna pod sobnimi pogoji [97].

Izbira stabilizatorja je ključni dejavnik pri nadzoru velikosti in oblike AuND, sintetiziranih s to metodo. Uporabimo lahko različne stabilizatorje, vključno s tioli, amini in fosfini. Uporaba dolgoverižnega alkiltiola, kot je oktadekantiol, kot stabilizatorja lahko povzroči nastanek bolj sferičnih nanodelcev, medtem ko uporaba krajše verige tiola, kot je 1-dodekantiol (DDT), povzroči nastanek bolj anizotropnih nanodelcev. Izbira reducenta je prav tako pomemben dejavnik pri nadzoru velikosti in oblike, običajno se uporablja močno redukcijsko sredstvo. Količina uporabljenega reducenta vpliva na velikost nastalih AuND, pri čemer višje koncentracije povzročijo večje nanodelce. Temperatura reakcijske zmesi vpliva na velikost in obliko nanodelcev, pri čemer višje temperature povzročijo nastanek bolj sferičnih nanodelcev, medtem ko nižje temperature povzročijo nastanek bolj anizotropnih nanodelcev. To je posledica različne hitrosti redukcije, ki je hitrejša pri višjih temperaturah, kar povzroči nastanek manjših in bolj sferičnih nanodelcev. Tudi reakcijski čas je še en dejavnik, ki vpliva na velikost in obliko nastalih AuND. Daljši reakcijski časi povzročijo nastanek večjih nanodelcev, medtem ko krajši reakcijski časi povzročijo nastanek manjših nanodelcev. Pomembno je omeniti, da lahko krajši reakcijski časi vodijo do ožje porazdelitve velikosti nanodelcev. Koncentracija zlatih soli v raztopini prav tako vpliva na velikost in obliko nanodelcev, višje koncentracije soli privedejo do tvorbe večjih nanodelcev, nižje koncentracije pa do tvorbe manjših nanodelcev [113], [114].

### 4.3 Sinteza z lasersko ablacijo

Sinteza AuND z lasersko ablacijo je razmeroma preprosta, a učinkovita metoda za pripravo AuND različnih velikosti in oblik. Ta postopek vključuje uporabo visokozmogljivega laserskega žarka za ablacijo Au tarče, ki proizvede oblak zlate pare ali plazme, ki posledično v kapljevinskem ali plinastem mediju kondenzira v nanodelce. Pri tej metodi je laserski žarek

uporabljen kot orodje za prenos energije na ciljni material, zaradi česar ta izhlapi in posledično tvori nanodelce. Nastale nanodelce je mogoče zbrati in prečistiti za uporabo v številnih aplikacijah [20].

Postopek sinteze AuND z lasersko ablacijo običajno vključuje več korakov, vključno s pripravo tarčnega materiala, samim postopkom laserske ablacije in čiščenjem nanodelcev po sintezi. Prvi korak v procesu sinteze AuND z lasersko ablacijo je priprava tarčnega materiala (Au), ki mora biti primerne velikosti in oblike. Zlata tarča mora biti visoke čistosti, da zagotovimo, da so tudi nastali AuND visoke čistosti [115]. Poleg tega mora biti tarča brez kakršnih koli površinskih primesi ali oksidnih plasti, ki bi lahko motile postopek. Ko je tarčni material pripravljen, se začne postopek laserske ablacije. Ta postopek običajno vključuje uporabo laserskega žarka visoke moči, ki je usmerjen na zlato tarčo v nadzorovanem okolju. Laserski žarek je običajno osredotočen na površino ciljnega materiala, kar povzroči, da ta izhlapi in tvori oblak zlate pare ali plazme [23]. Ta zlata para se nato kondenzira v nanodelce, ki se običajno zberejo na substratu, ki je nasproti tarče ali v kapljevini, v katero je tarča potopljena. Velikost in obliko nastalih nanodelcev je mogoče nadzorovati s prilagajanjem različnih parametrov med postopkom laserske ablacije. Ti parametri so odvisni od energije, trajanja impulza, hitrosti ponavljanja in valovne dolžine laserskih žarkov. Z ustrezno izbiro parametrov je tako mogoče izdelati nanodelce ciljnih velikosti in oblik od okroglih, paličastih do trikotnih.

Energija laserskih žarkov odločilno vpliva na velikost in obliko AuND. Laserski žarek z večjo energijo omogoča nastanek večjih nanodelcev, medtem tisti z manjšo energijo sintetizira manjše nanodelce [116]. To je posledica dejstva, ker laserski žarek z večjo energijo povzroči večje segrevanje tarče in s tem večjo ablacijo atomov zlata, kar se kaže v nastanku večjih AuND. Tudi trajanje impulza laserskega žarka vpliva na velikost in obliko nastalih AuND. Krajši impulzi povzročijo nastanek manjših nanodelcev, medtem ko daljši impulzi sintetizirajo večje nanodelce. Pojasnilo za takšen vpliv je v tem, da krajše trajanje impulza povzroči hitrejše segrevanje in ohlajanje tarče, kar zmanjša ablacijo atomov zlata. Zelo pomembna je tudi valovna dolžina laserskega žarka zaradi absorpcijskih lastnosti zlate tarče. Absorpcijski koeficient zlata se namreč spreminja z valovno dolžino, kar vpliva na stopnjo absorpcije energije in hitrost segrevanja tarče.

Izbira tekočega medija vpliva tudi na velikost in obliko nanodelcev, saj tekoči medij med postopkom laserske ablacije odvaja in absorbira toploto, ki jo ustvari laser, in ohlaja nanodelce, ko nastanejo. Različni tekoči mediji imajo različne toplotne kapacitete in toplotne prevodnosti, kar lahko vpliva na hitrost ohlajanja nanodelcev ter njihovo velikost in obliko. Na primer voda

ima visoko toplotno kapaciteto in toplotno prevodnost, kar povzroči hitro ohlajanje nanodelcev in nastanek manjših, bolj okroglih delcev. Nasprotno pa imajo organska topila, kot je etanol, nižjo toplotno kapaciteto in toplotno prevodnost, kar povzroči počasnejše hitrosti ohlajanja in nastajanje večjih, bolj anizotropnih nanodelcev. Izbira stabilizatorja lahko vpliva tudi na velikost in obliko AuND [21], [22], [117]. Stabilizatorji, kot so površinsko aktivne snovi ali polimeri, se lahko adsorbirajo na površino nanodelcev in preprečijo njihovo aglomeracijo ali združevanje. Različni stabilizatorji imajo različne afinitete do površine AuND, kar lahko vpliva na njihovo velikost in obliko. Na primer cetiltrimetilamonijev bromid je pogosto uporabljen stabilizator, ki ima visoko afiniteto za družine ravnine  $\{111\}$  PCK kristalne rešetke. To lahko povzroči nastanek bolj anizotropnih nanodelcev z izpostavljenimi družinami ravnin  $\{111\}$  PCK kristalne rešetke. V nasprotju s tem je polivinilpirolidon (PVP), ki ima visoko afiniteto za družine ravnin  $\{100\}$  PCK kristalne rešetke, in lahko povzroči nastanek bolj sferičnih delcev [118]. Po končanem postopku laserske ablacije je treba nastale nanodelce očistiti, da se odstranijo vse nečistoče ali ostanki materialov, ki so lahko nastali med postopkom sinteze. Ena pogosta metoda čiščenja nanodelcev je centrifugiranje, ki povzroči, da se ločijo glede na njihovo velikost in gostoto. Druge metode čiščenja lahko vključujejo filtracijo, dializo ali obarjanje [119], [120].

#### 4.4 Sinteza z rastjo semen

Metoda sinteza z rastjo semen je široko uporabljena tehnika za sintezo AuND, kjer je možno nadzirati njihovo velikost in obliko. Ta metoda opisuje redukcijo majhne količine zlatega prekursorja v prisotnosti stabilizatorja, čemur sledi dodajanje reducenta in rast nanodelcev na semenskih delcih. Metoda rasti semen lahko proizvede visoko monodisperzne in enotne AuND z visoko stopnjo ponovljivosti in stabilnosti [111].

Prvi korak v metodi je priprava "semen" – semenske delce je mogoče pripraviti z različnimi metodami, vključno s Turkevichevo metodo, citratno redukcijsko metodo in Brust-Schiffrinovo metodo. Najprej se pripravi suspenzija semen, ta se doda raztopini, ki vsebuje višjo koncentracijo prekursorja zlata, stabilizatorja in reducenta. Reducirno sredstvo je običajno blago, kot je askorbinska kislina, ki reducira ione zlata, da tvorijo atome zlata, ki se nato pritrdijo na semenske AuND, ki začnejo rasti. Metodo lahko razdelimo na dve stopnji: stopnjo nukleacije in stopnjo rasti. Med fazo nukleacije se atomi zlata pritrdijo na površino semenskih delcev in tvorijo majhne grozde. Velikost in oblika grozdov sta določeni z velikostjo in obliko semenskih delcev. V fazi rasti grozdi še naprej rastejo in se združujejo v večje nanodelce.

Hitrost rasti in končna velikost nanodelcev sta odvisni od koncentracije zlata v prekursorju, stabilizatorja in reducenta ter temperature in pH raztopine. Metoda sinteze semenske rasti omogoča natančen nadzor velikosti in oblike AuND. Velikost semenskih delcev je mogoče nadzorovati s prilagajanjem koncentracije zlata v prekursorju in stabilizatorja med fazo priprave semena. Velikost nastalih nanodelcev je določena z velikostjo semenskih delcev in koncentracijo prekursorja zlata, stabilizatorja in reducenta v fazi rasti [121], [122].

Obliko nanodelcev je mogoče nadzorovati tudi s prilagajanjem koncentracije stabilizatorja in temperature raztopine. Stabilizacijsko sredstvo igra ključno vlogo pri metodi sinteze rasti semen, saj nadzoruje površinsko kemijo semenskih delcev in nastalih nanodelcev. Na splošno uporaba citrata kot stabilizatorja povzroči nastanek okroglih delcev semen, medtem ko lahko uporaba drugih stabilizatorjev, kot je cetiltrimetilamonijev bromid ali polivinilpirolidon (PVP), povzroči nastanek bolj anizotropnih semen [121]. Obliko semenskih delcev je mogoče nadzorovati tudi s prilagajanjem pH raztopine. Na primer pri vrednostih pH pod 7, so s citratom stabilizirani semenski delci običajno bolj okrogli, medtem ko so pri vrednostih pH nad 7 bolj anizotropni. Pri rasti koncentracija prekursorja vpliva na velikost nastalih nanodelcev. Višje koncentracije prekursorja povzročijo nastanek večjih nanodelcev. Koncentracija stabilizatorja vpliva na površinsko kemijo semenskih delcev in nastale nanodelce. Na primer, uporaba CTAB kot stabilizatorja lahko povzroči nastanek bolj anizotropnih nanodelcev. Izbira reducenta vpliva na velikost in obliko nastalih nanodelcev. Blago redukcijsko sredstvo, kot je askorbinska kislina, povzroči nastanek manjših in bolj monodisperznih nanodelcev. Močnejše redukcijsko sredstvo, kot je natrijev borohidrid ( $\text{NaBH}_4$ ), povzroči nastanek večjih in bolj polidisperznih nanodelcev. Temperatura raztopine vpliva na obliko nanodelcev tako, da višje temperature povzročijo nastanek bolj okroglih AuND, medtem ko nižje temperature povzročijo nastanek bolj anizotropnih nanodelcev [123], [124].

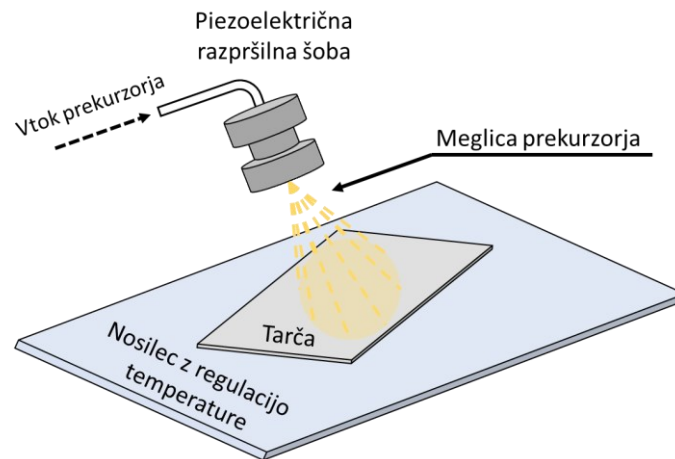
## 5 SINTEZA Z USP

USP je postopek, ki se uporablja za sintezo nanomaterialov z visoko čistostjo, homogenostjo in posebnimi lastnostmi. Ta tehnika se običajno uporablja pri proizvodnji kovinskih, keramičnih ali polprevodnih nanomaterialov, z modifikacijo pa tudi tankih filmov za elektronske, optične in energetske aplikacije. Ena od glavnih prednosti ultrazvočne razpršilne pirolize je njena sposobnost proizvodnje delcev nano velikosti z visoko stopnjo enakomernosti in čistosti. Ker proces poteka v zaprti komori, so delci zaščiteni pred kontaminacijo z zunanjimi viri. Poleg tega uporaba ultrazvočnih valov omogoča natančen nadzor velikosti in porazdelitve kapljic, kar ima za posledico bolj enakomerno nanašanje oz. nadzor velikosti. Druga prednost je vsestranskost postopka. USP je mogoče uporabiti za sintezo širokega nabora materialov, vključno s kovinami, keramiko, polprevodniki in polimeri. Zaradi tega je dragoceno orodje za raziskovalce na številnih različnih področjih, od elektronike do biomedicinskega inženiringa [42], [125].

Postopek vključuje tri glavne korake: atomizacijo, pirolizo in zbiranje. Atomizacija je postopek pretvorbe prekursorja, ki pretvarja raztopino z ioni zlata v fino meglico kapljic. Ta meglica ali aerosol nastane zaradi delovanja visokofrekvenčnega ultrazvočnega piezokristala na raztopino, s čimer ustvarja zvočne valove s frekvenco nad 20 kHz. To povzroči, da tekočina razpade na majhne kapljice, običajno s premeri v območju od 0,1 do 10  $\mu\text{m}$  [126]–[128].

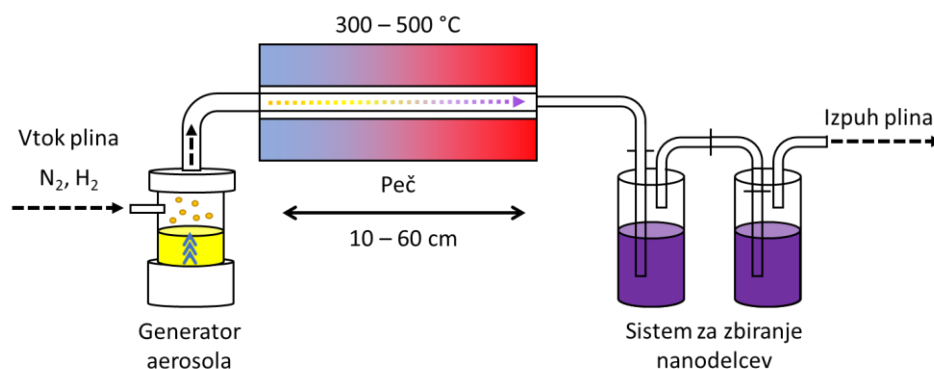
Piroliza, ki v splošnem predstavlja toplotno razgradnjo materialov pri povišanih temperaturah v inertni atmosferi brez kisika, omogoča segrevanje kapljic pri visoki temperaturi, običajno med 100 do 1200 °C. Med pirolizo tečejo v topilu in v topljencu fizikalni procesi in kemijske reakcije, ki povzročijo nastanek trdnih ali poltrdnih nanodelcev.

Na koncu se metode USP ločijo na dve področji. Eno področje zajema nanos delcev na podlago, kjer tvorijo tanek film (Slika 6). Substrat je lahko kateri koli material z ravno površino, na primer steklo, silicij ali kovina. Postopek nanašanja se običajno izvede tako, da se substrat postavi v neposredno bližino razpršilnika in pirolizne komore, kar omogoči, da se delci usedejo na površino [129].



Slika 6: USP metoda naprševanja

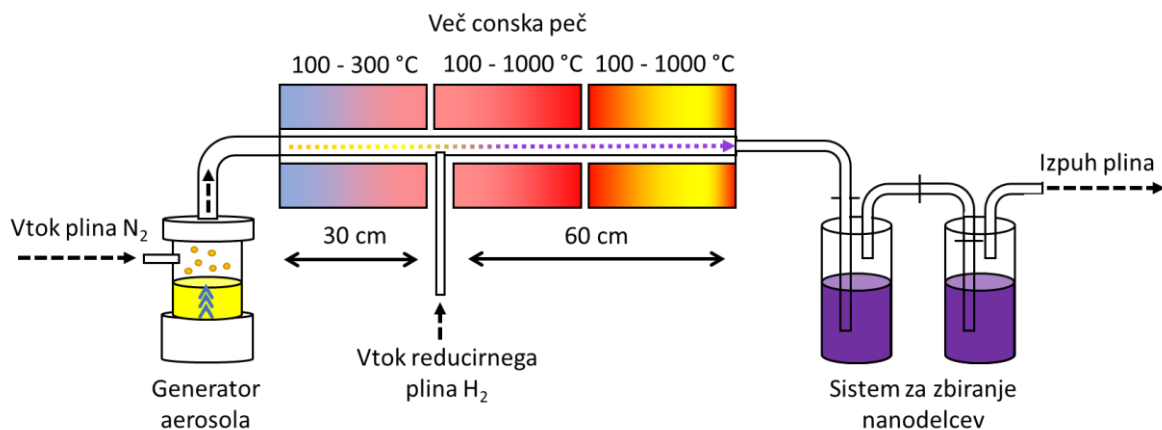
Druga možnost zbiranja nanodelcev je USP kontinuirna sinteza velikih količin nanodelcev, katere jo mogoče uloviti z elektrostatičnimi filtri, mehanskimi filtri ali zbiralnimi steklenicami. Sistem zbiranja nanodelcev v tekočem mediju v zbiralnih steklenicah ima za rezultat nastanek koloidne suspenzije. Na Slika 7 je shematsko prikazan osnovni postopek USP, kjer poteka zbiranje nanodelcev v steklenicah. S prilagoditvijo procesnih parametrov, kot so koncentracija topljenca v prekursorju, hitrost pretoka plinov, temperatura pirolize in načini zbiranja, je mogoče nadzorovati končne lastnosti nanodelcev. Druga prednost je ta, da je možno enostavno povečati kapacitivnost sinteze nanodelcev. S povečanjem velikosti pirolizne komore in hitrosti pretoka plinov je mogoče dvigniti volumen meglice in s tem količino topljenca, ki se pretvori v nanodelce v razmeroma kratkem času. V USP procesu je mogoče tudi povečati število reakcijskih cevi. Eden od izzivov v USP procesu je zahteva in nadzor nastanka suspenzije, da se izognemo aglomeraciji ali usedanju nanodelcev v tekočem mediju. Poleg tega so lahko nanodelci, proizvedeni s to metodo, nagnjeni k oksidaciji ali razgradnji, kar zahteva zagotavljanje pogojev, da ohranijo svoje lastnosti [130], [131].



Slika 7: Shematski prikaz osnovnega USP postopka

Za pripravo AuND, ki smo jih potrebovali v tej nalogi, smo uporabili modificirano USP napravo lastne zasnove in konstrukcije, ki je locirana v Zlatarni Celje, d. o. o. Osnove principa delovanja in osnovnih konstrukcijskih zahtev USP procesa so bile patentirane v Zlatarni Celje, d. o. o. [132].

Modificirana USP naprava temelji na pirolizi oziroma na kemijski razgradnji aerosolov različnih spojin pri povišani temperaturi, kjer je ključna modifikacija v ločitvi postopkov evaporacije od redukcije in zgoščevanja s konstrukcijsko izvedbo cevi na 3 ločena ogrevalna območja. Prva cona peči, ki deluje do 300 °C, omogoča sušenje oziroma evaporacijo topila, v drugi coni, ki deluje do 900 °C, poteka redukcija topljenca, medtem ko v tretji coni, ki deluje do 900 °C, poteka zgoščevanje topljenca in nastanek nanodelcev. Med conama 1 in 2 je v modificiranem USP vgrajen sistem za vtok reducirnega plina, ki je najpogosteje H<sub>2</sub>. Dodatek H<sub>2</sub> poviša stopnjo konverzije topljenca v zelene produkte, s čimer se poviša kapacitivnost sinteze. Shema konstrukcije modificiranega USP je prikazana na Slika 8.



Slika 8: Shematski prikaz modificiranega USP postopka

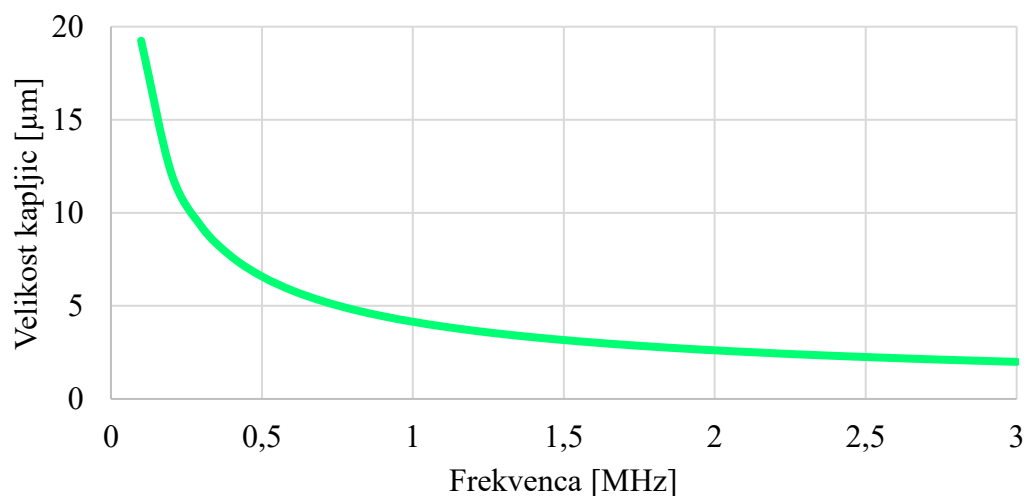
Postavljena modificirana USP naprava, ki je namenjena industrijski proizvodnji za doseganje višje produktivnosti AuND, je prikazana na Slika 9. Ta naprava je bila koriščena za vsa eksperimentalna testiranja sintez AuND, ki so bila predmet raziskav tega doktorskega dela.



Slika 9: Modificirana USP naprava v Zlatarni Celje, d. o. o.

## 5.1 Mehanizem

Osnovne komponente modificirane USP naprave so generator aerosola, reakcijska cev, visokotemperaturna reakcijska peč in zbiralni sistem. Velikosti sintetiziranih AuND so odvisne od frekvence ultrazvoka in koncentracije raztopljenega prekursorja v kapljicah raztopine. Frekvenca zvočnih valov, ki se generirajo v generatorju aerosola, določa velikost kapljic. Zaradi nihanja ultrazvoka pod površino raztopine se kinetična energija molekul raztopine hitro poveča. To povzroči, da majhne kapljice premagajo površinsko napetost in se odtrgajo od površine. Ta učinek je znan kot aerosolizacija in proizvaja kapljice aerosola mikrometrskih velikosti. Z visokofrekvenčnim ultrazvokom se ustvarijo kapljice različnih velikosti, odvisno od frekvence, kar je prikazano na Slika 10.



Slika 10: Velikost kapljic aerosola v odvisnosti od frekvence piezo kristala v USP generatorju



Kapljice prekursorja se transportirajo v reakcijsko cev v toku inertnega plina  $N_2$ . V prvi coni pri  $T = 100\text{--}300\text{ }^\circ\text{C}$  poteka evaporacija topila iz kapljic aerosola, tako da nastane posušen preostali topljenec, ki ob vstopu v cono 2 reagira z reducirnim plinom  $H_2$ . Ker je v reakcijski coni  $T > 300\text{ }^\circ\text{C}$ , to ustvarja pogoje za toplotno razgradnjo in redukcijo topljenca v porozne nanodelce, ki se v tretji coni pri  $T > 500\text{ }^\circ\text{C}$  zgostijo v nanodelce okroglih oblik. Nastali nanodelci se nato zbirajo v zbiralnem sistemu.

S spremembo parametrov USP naprave je možno primarno vplivati na velikost nanodelcev in na njihovo obliko. Odločujoč dejavnik, ki vpliva na obliko nanodelcev, je poznavanje in nadzorovanje mehanizma njihovega nastanka. Poznana sta dva ključna mehanizma: **od kapljice do delca (DTP)**, ali **iz plina v delec (GTP)**.

### DTP

Ta mehanizem *pretvorbe kapljice v trdno in trdno v trdno* je na splošno sestavljen iz nastanka kapljic, transporta teh kapljic v ogrevalno cono, izhlapevanja topila in toplotne pretvorbe topljenca v končne nanodelce. Ko topilo v kapljici z raztopljenim materialom začne izhlapevati, se ta skrči, s čimer se poveča masni delež topljenca v kapljici. Topljenec tako lahko začne precipitirati, preden je dosežena enakomerna nasičenost v kapljici, saj je difuzija topljenca počasnejša od izhlapevanja topila. Ker trdni topljenec zaradi prenasičenosti precipitira na površino kapljice, se lahko preostanek topila ujame v središču. Nato začne izhlapevati topilo skozi novonastalo površinsko skorjo, kar upočasni hitrost izhlapevanja. Hitrost izhlapevanja neposredno vpliva na hitrost nukleacije nanodelcev, ki prvenstveno določa njihovo končno morfologijo (izhlapevanje je odvisno od številnih okoliških dejavnikov: parni tlak, temperatura). Reakcije, kot je npr. toplotna razgradnja, se pojavljajo tudi v kapljicah pred izhlapevanjem topila in po njem in lahko bistveno vplivajo na morfologijo nastalih nanodelcev [39], [42].

### GTP

Mehanizem *pretvorbe iz plina v delec* sledi prenasičenosti plinaste faze s topljencem izbranega materiala, kar povzroči nukleacijo in tvorbo novih delcev. Delci lahko nastanejo s kemijskimi reakcijami topljenca v plinasti fazi ali s fizikalnimi procesi, kot je ohlajanje vroče pare.

Nastale velikosti nanodelcev, njihova porazdelitev velikosti, morfologija in dosežena koncentracija so odvisne od dveh procesov, ki potekata v aerosolnem reaktorju. Prvi proces je nukleacija-kondenzacija, kjer monomer (molekula ali atom) nastane s kemijsko reakcijo ali z znižanjem temperature, dokler ne pride do nukleacije. Razmerje nasičenosti se poveča in rast

monomera poteka s kondenzacijo monomera na delce. Če ni trkov, lahko nastanejo okrogli nanodelci, ki se oblikovno ne spremenijo do zbiralnega sistema. Pojavi se lahko tudi površinska reakcija na delcih, ki spodbuja njihovo rast. Drug proces je nukleacija-koagulacija, kjer visoka koncentracija delcev omogoča trke in njihovo koalescenco. Delci se po trkih združijo s sintranjem, tako postanejo okrogli, pri čemer razmerje med stopnjo trkov in koalescenco določa njihovo končno morfologijo. Pri rasti, omejeni na trke, je hitrost sintranja visoka, kar omogoča nastanek okroglih delcev med trki [39], [42].

Pri USP sintezi ni mogoče zagotoviti nastanka AuND po samo enem mehanizmu, vendar lahko z ustrezno izbiro prekursorja in nadzorovanjem nekaterih tehnoloških parametrov vplivamo na dominantno enega ali drugega mehanizma.

## 5.2 Sinteza

Sinteza AuND je bila izvedena na modificirani USP napravi, ki je v prostorih Zlatarne Celje, d. o. o. (Slika 9).

Znano je, da imajo različni prekursorji različne topnosti v topilih, kar pomeni, da imajo različne reakcijske temperature in s tem reaktivnosti. Za pripravo prekursorjev se večinoma koristi demineralizirana voda, ki ima funkcijo primarnega topila, kar pomeni, da je treba za sintezo AuND koristiti vodotopne soli, komplekse ali ligande Au. V eksperimentalnem delu smo se zato osredotočili na uporabo tetrakloroavrične kisline ( $\text{HAuCl}_4$ ), ki ima dobro topnost v vodi [33], [129], in na zlatov (III) acetat ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{AuO}_6$ ), ki je topen v vodi pri nizkem pH (1–2) [133]. Topnost tega v vodi smo dosegli s konstantnim mešanjem raztopine z magnetnim mešalom, pri čemer je bila po kapljicah dodajana koncentrirana HCl, tako da je bil pH vzdrževan med 1 in 2. Za preliminaren poskus USP sinteze smo pripravili dva prekursorja z ekvivalentno koncentracijo Au 1 g/L, ki sta imela rumeno barvo.

Reakcijske temperature za izbrana prekursorja in pretoke plinov v USP napravi smo določili na osnovi podatkov iz literature [33], [39], [129], [133], [134] in so prikazani v Preglednica 2. Frekvenca aerosolizacije je znašala 1,65 Mhz.

Preglednica 2: Parametri USP sinteze izbranih prekursorjev AuND

Prekursor	Pretok prekursorja [L/h]	T. Cona 1 [°C]	T. Cona 2 [°C]	T. Cona 3 [°C]	Pretok plina N <sub>2</sub> [L/min]	Pretok plina H <sub>2</sub> [L/min]
Zlatov (III) klorid	0,25	200	400	400	5	2,5
Zlatov (III) acetat	0,25	150	600	600	5	2,5

AuND so bili zbrani v zbirnih steklenicah, ki so bile hlajene na 6 °C. V prvem poskusu je bila v zbirnih steklenicah demineralizirana voda brez dodatkov, medtem ko je bila v drugem poskusu demineralizirana voda z raztopljenim stabilizatorjem PVP 40K (Thermo Scientific) s koncentracijo 2,5 g/L. Ta koncentracija se je v predhodnem delu izkazala, kot najbolj optimalna iz vidika zbiranja, shranjevanja in rokovanja s suspenzijo [39], [135]–[137]. Lastnosti izbranega stabilizatorja so podrobneje opisane v poglavju 6 Stabilizacija nanodelcev.

### 5.3 Karakterizacija AuND

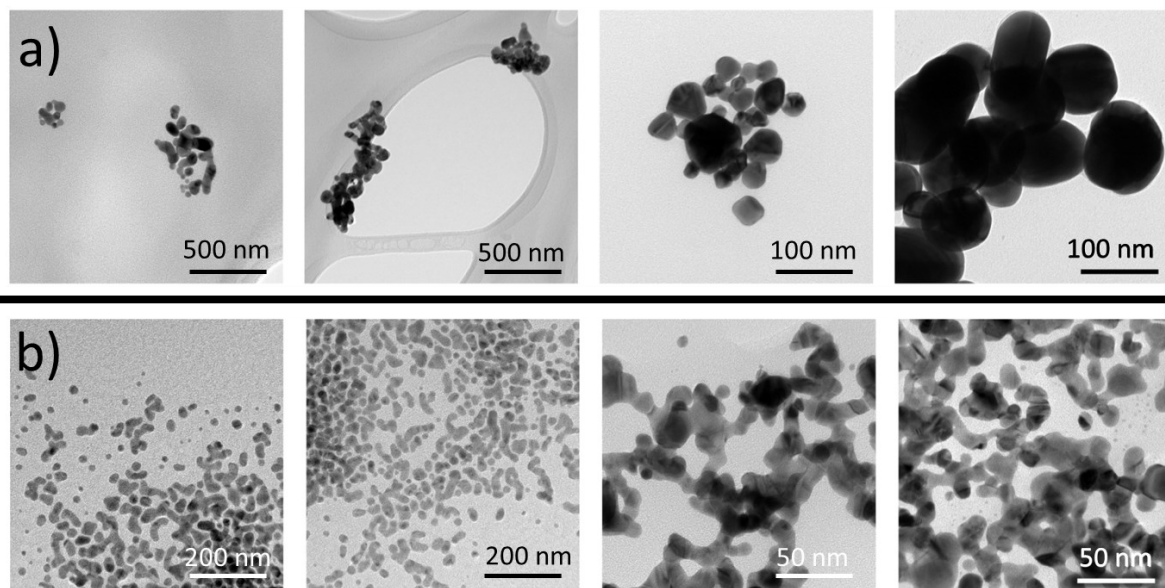
#### 5.3.1 Presevna elektronska mikroskopija

Mikrostrukturni pregled AuND smo v prvi stopnji opravili s presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) na mikroskopu JEOL 2100 FEG, Japonska. Za TEM opazovanje smo nanесли kapljico suspenzije z AuND na bakreni mrežni nosilec z ogljičnim filmom in ga pustili sušiti v eksikatorju 24 ur. Preiskovali smo dva vzorca AuND, ki sta bila sintetizirana iz dveh različnih prekurzorjev.

Pregled mikrostrukture AuND je pokazal bistveno razliko v nastalih velikostih in tudi v morfologiji v odvisnosti od vrste uporabljenega prekurzorja. V primeru USP sinteze iz zlatovega (III) klorida imajo AuND okroglo obliko (Slika 11 a) in so večji (> 100 nm), medtem ko so AuND, nastali iz zlatovega (III) acetata, nepravilnih oblik (Slika 11 b) – 11b in manjši (≈ 50 nm).

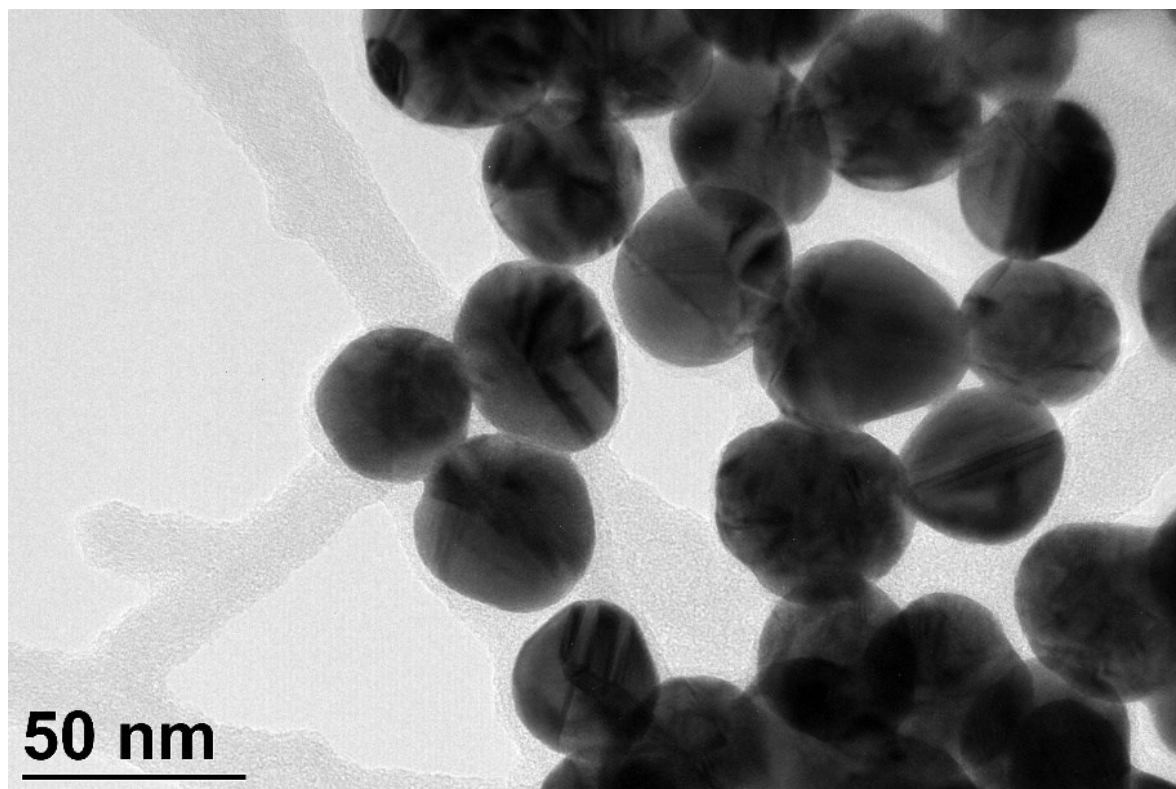
Morfološka razlika AuND je očitna tudi v barvi suspenzije, kot je prikazano na Slika 13. Suspenzija z AuND, ki so bili sintetizirani iz zlatovega (III) klorida, ima značilno vijolično barvo, medtem ko je suspenzija z AuND, ki so bili sintetizirani iz zlatovega (III) acetata, temnejše barve. To posredno nakazuje, da je med USP sintezo najverjetneje prišlo do večje mere aglomeracije AuND.

Pregled literature in študija teoretičnih osnov s fokusom na konjugaciji ter uporabi AuND v LFIA testih je pokazala izrazite prednosti uporabe manjših in okroglih nanodelcev [25]–[27]. Na osnovi poznavanja delovanja USP smo za pripravo manjših velikosti AuND uporabili nizko koncentracijo Au v prekurzorju 0,5 g/L. Mikrostrukturni pregled AuND je potrdil okroglo obliko in velikost nanodelcev okoli 50 nm, kot je prikazano na Slika 12.

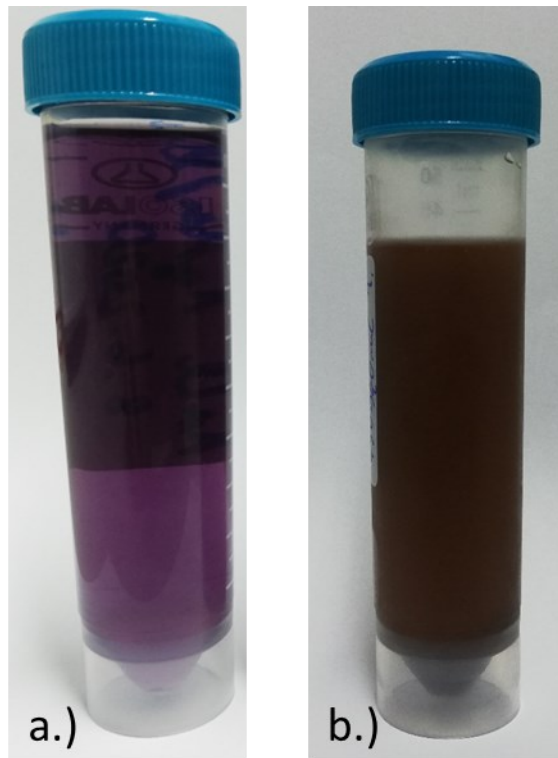


Slika 11: AuND, sintetizirani iz prekursorja s koncentracijo 1 g (Au)/L iz:

a) zlatov (III) klorid, b) zlatov (III) acetat



Slika 12: AuND, sintetizirani iz iz prekursorja s koncentracijo 0,5 g (Au)/L iz zlatovega (III) klorida



Slika 13: Suspenzija AuND, nastala z USP sintezo iz: a) iz zlatovega (III) klorida in b) zlatovega (III) acetata

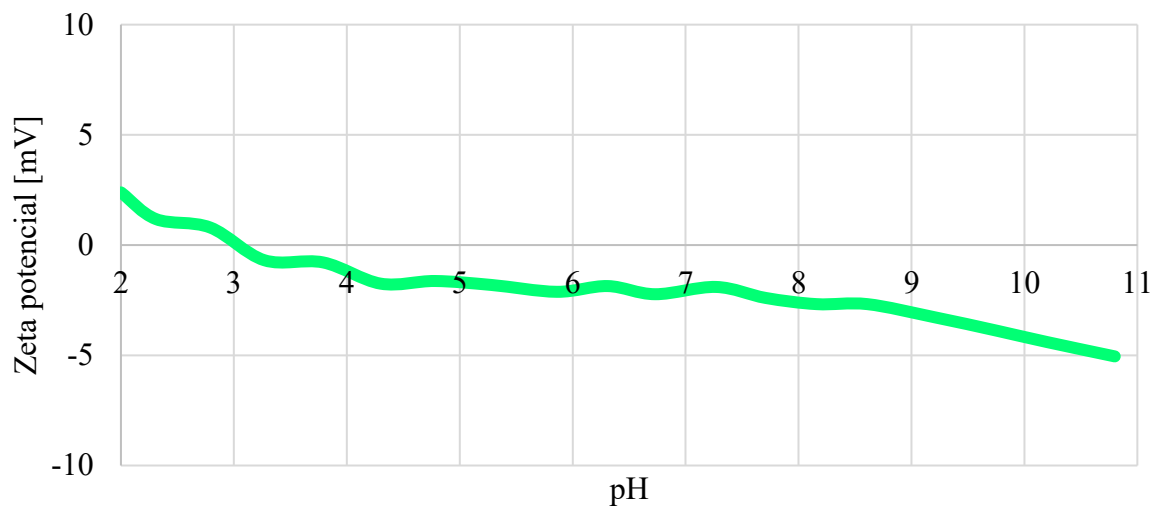
### 5.3.2 ICP-OES

Preiskave z optično emisijsko spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo z metodo ICP-OES, ki ima ocenjeno napako  $\pm 3\%$  (Agilent 720/725 ICP-OES, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) so bile izvedene z namenom določanja koncentracij sintetiziranih AuND v ppm Au.

### 5.3.3 Zeta potencial

Meritve zeta potenciala so bile izvedene na Malvern ZetaSizer Nano ZS z namenom določitve stabilnosti in površinskega naboja nestabiliziranih AuND. Meritev smo izvedli samo na nestabiliziranih nanodelcih, sintetiziranih iz prekursorja zlatovega (III) klorida. Koncentracija Au v analizirani raztopini je znašala okoli 50 ppm. Ker vzorec raztopine AuND ni bil stabiliziran in je med časom od sinteze do meritve ves čas potekala aglomeracija, točne koncentracije ni bilo mogoče določiti. Za meritve smo suspenziji AuND dodali HCl in znižali pH na 1, s to suspenzijo smo nato napolnili merilno celico inštrumenta. Parametri materialnih lastnosti, vpisani v merilni sistem, so bili naslednji: absorpcija – 0,010, lomni količnik – 1,59, disperzijske lastnosti – voda, temperatura – 25 °C, merilni kot: 173° back scatter. Rezultati

meritev Zeta potenciala so prikazani na Slika 14 in nakazujejo na zelo nizek površinski naboj AuND in s tem zelo slabo stabilnost oz. izrazito tendenco AuND k aglomeraciji.

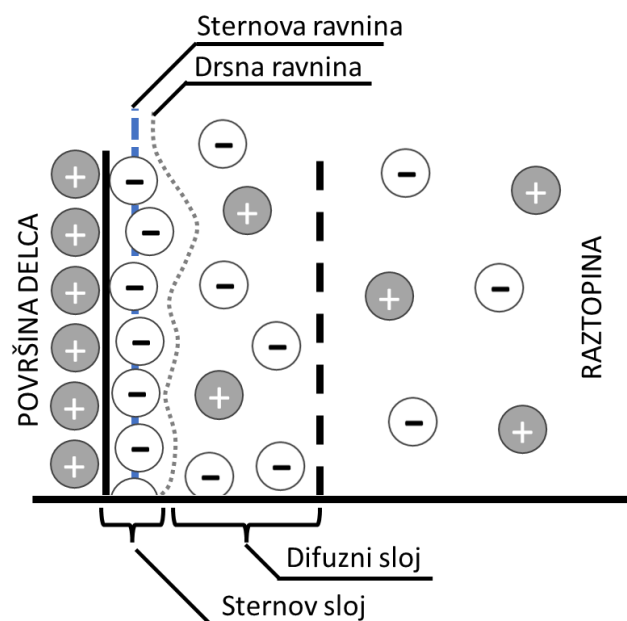


Slika 14: Vrednosti zeta potenciala nestabiliziranih AuND, sintetiziranih z USP v odvisnosti od pH

Na osnovi opravljenega eksperimentalnega dela in dobljenih rezultatov raziskovalnega dela različnih vrst karakterizacij smo ugotovili, da uporaba AuND, sintetiziranih iz zlatovega (III) acetata v USP zaradi njihove neustrezne oblike oziroma morfologije, ne bi bila uspešna za konjugacijo s ciljnim antigeni, tako da jih posledično kasneje ne bi bilo možno uporabiti v hitrih testih. Nasprotno temu pa so TEM preiskave AuND, ki so bili sintetizirani iz zlatovega (III) klorida, odkrile oblike in velikosti – na kratko morfologijo, ki bi lahko bila primerna za konjugacijo z različnimi antigeni. Tudi dodatne meritve površinskega naboja teh AuND so pokazale izredno nizek površinski naboj, kar je posredno potrdilo skladnost s potrebnim pogojem, vezanim na stanje površine, ki je zahtevan za konjugacijo. S tem je bila dana osnova za potrditev hipoteze, da AuND, pripravljene z USP sintezo iz prekursorja na osnovi zlatovega (III) klorida, predstavljajo tiste, s katerimi je možno izvesti njihovo konjugacijo s ciljnim antigeni SARS-CoV-2 in rekombinantim IgG, tako da bodo uspešno delovali v LFIA testu kot oznake za potrditev potencialne prisotnosti protiteles bolezni covid-19.

## 6 STABILIZACIJA NANODELCEV

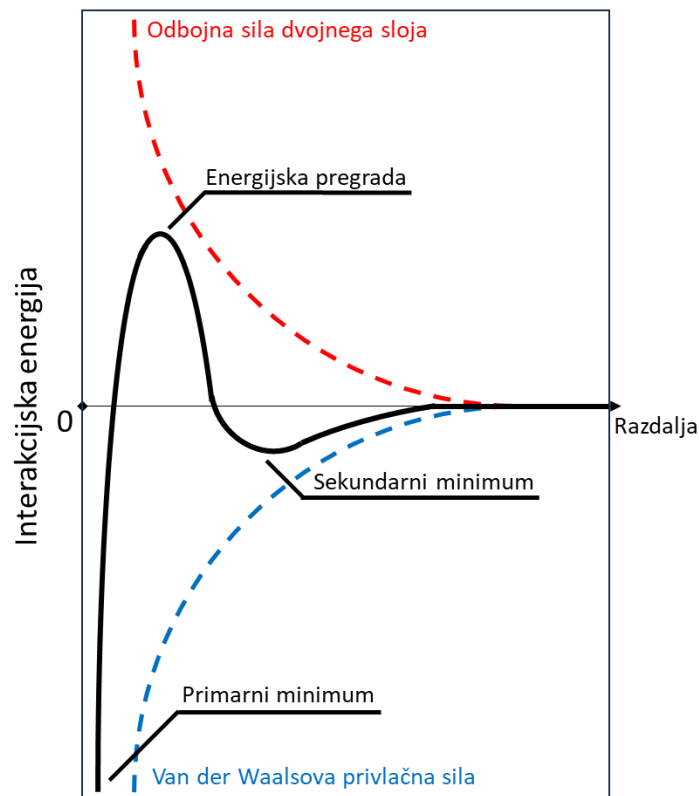
Delci, ko pridejo v stik z vodo, v večini primerov pridobijo površinski naboj. Ta naboj je lahko posledica disociacije površinskih skupin iz površine delca v raztopino ali adsorpcije ionov iz raztopine na površino delca. Ta površinski naboj vpliva na porazdelitev bližnjih ionov v vodnem mediju. Ioni z nasprotnim nabojem (proti-ioni) se privlačijo proti površini, ioni z enakim nabojem (ko-ioni) pa se od površine odbijajo. Vse to skupaj s toplotnim gibanjem delcev povzroči nastanek dvojne električne plasti, kot je prikazano na sliki 15. Model, katerega je predlagal Stern, opisuje dvojno električno plast, katera je razdeljena na dva dela: Sternovo plast in difuzno plast, upošteval pa je tudi možnost specifične adsorpcije ionov. Ta dva dela ločuje Sternova ravnina. Natančneje, adsorbirani ioni so tisti, ki so z elektrostatičnimi in/ali Van der Waalsovimi silami pritrjeni na površino in se nahajajo v Sternovi plasti – tj. med površino in Sternovo ravnino. Ioni, ki se nahajajo izven Sternove ravnine, tvorijo difuzni del dvojne plasti. Na porazdelitev ionov v difuznem delu vplivajo elektrostatične sile in naključno toplotno gibanje. Znotraj difuzne plasti je namišljena meja, imenovana drsna ravnina, znotraj katere ioni in delci tvorijo stabilno enoto. Ko se delec premika, se ioni znotraj te meje premikajo z delcem, vendar se ioni onkraj meje ne premikajo z delcem. Potencial na tej meji se imenuje zeta ( $\zeta$ ) potencial. Čeprav površinskega potenciala ni mogoče neposredno izmeriti, ga je mogoče povezati s potencialom  $\zeta$ . Slednjo je možno izmeriti elektrokinetično in je sorazmerna s površinskim potencialom [138].



Slika 15: Shematski prikaz dvojne električne plasti

Teorija, imenovana po Derjaguinu, Landauju, Verweyju in Overbeeku kot DLVO, je splošno sprejet teoretični okvir za razumevanje stabilnosti koloidnih suspenzij, vključno z nanodelci. Teorija DLVO pojasnjuje ravnotežje med privlačnimi in odbojnimi silami med delci v suspenziji, kar določa stabilnost suspenzije in ta je odvisna od dveh nasprotujočih si sil: privlačne van der Waalsove sile in odbojne elektrostatične sile. Van der Waalsova sila je privlačna sila, ki nastane zaradi interakcije dipolov in induciranih dipolov v delcih, medtem ko je elektrostatična sila odbojna sila, ki nastane zaradi interakcije nabojev na delcih. Teorija DLVO obravnava energijo interakcije med dvema delcema, ki je podana z vsoto van der Waalsove energije in elektrostatične energije. Van der Waalsovo energijo lahko izračunamo s pomočjo Hamakerjeve konstante, ki je odvisna od dielektričnih lastnosti in geometrije delcev ter okoliškega medija. Elektrostatično energijo lahko izračunamo z uporabo elektrostatičnega potenciala, ki je odvisen od gostote površinskega naboja in ionske moči medija. Stabilnost koloidne suspenzije je odvisna od ravnotežja med privlačno van der Waalsovo silo in odbojno elektrostatično silo. Skupna potencialna energija glede na razdaljo med delci kaže tri značilnosti: dva minimuma in energijsko pregrado. Oblika krivulje (slika 16) (višina pregrade in globina minimumov) je odvisna od velikosti medsebojno delujočih sil. Velikost odbojnih sil, ki določajo višino energijske pregrade, je odvisna od več dejavnikov. Debelejša kot je električna dvojna plast, večji bo odboj med delci in s tem tudi stabilnost suspenzije. Debelina dvojne električne plasti je odvisna od ionske jakosti in pada z naraščanjem ionske jakosti, posledično pa se zmanjšuje tudi višina potencialne energijske pregrade. Z dodatnim povečanjem ionske moči se energetska pregrada še zmanjša, kar povzroči sekundarni minimum. Delci so reverzibilno flokulirani in suspenzija ostane "kinetično" stabilna. Po tem, ko so odbojne sile šibke in se skupni potencial interakcije približa Van der Waalsovemu potencialu, so delci v primarnem minimumu, kjer so nepovratno aglomerirani [139]–[141].





Slika 16: Shematski prikaz celotne interakcijske energije v odvisnosti od razdalje med dvema delcema

Teorija DLVO zagotavlja kvantitativni okvir za razumevanje stabilnosti nanodelcev in drugih koloidnih suspenzij in ima nekatere omejitve, kot so predpostavka o okroglih delcih, zanemarjanje učinkov površinske hrapavosti in heterogenosti ter zanemarjanje drugih dejavnikov, ki lahko vplivajo na stabilnost nanodelcev, kot je prisotnost adsorbiranih plasti ali površinskih napak. Kljub temu teorija DLVO ostaja orodje za napovedovanje in nadzor stabilnosti suspenzij nanodelcev [142].

## 6.1 Mehanizmi stabilizacije AuND

Stabilnost suspenzij AuND je ključni dejavnik, ki vpliva na njihovo delovanje in učinkovitost v praktičnih aplikacijah. Za izboljšanje njihove stabilnosti se je mogoče z ozirom na teorijo DLVO opreti na številne strategije stabilizacije [141].

**Površinska modifikacija s stabilizatorji** je ena najpogostejših strategij za stabilizacijo suspenzij AuND. Stabilizatorji, kot so površinsko aktivne snovi, polimeri in organske molekule, se lahko adsorbirajo na površino AuND in ustvarijo odbojno plast, ki preprečuje aglomeracijo ali flokulacijo delcev. Za stabilizacijo AuND se običajno uporabljajo površinsko aktivne snovi,

kot so cetiltrimetilamonijev bromid, natrijev dodecil sulfat (SDS) in Tween 20. Te površinsko aktivne snovi lahko tvorijo monosloj okoli nanodelcev, kar preprečuje nastanek velikih agregatov. Polimeri, kot sta polietilenglikol (PEG) in polivinilpirolidon (PVP), se lahko uporabljajo tudi kot stabilizatorji, ki tvorijo sterično odbojnost, ki preprečuje, da bi delci prišli v tesen stik [143]–[145].

**Elektrostatična stabilizacija** je metoda za stabilizacijo suspenzij AuND, ki vključuje uporabo nabitih stabilizatorjev, kot je poliakrilna kislina, za ustvarjanje odbojne sile med delci. Nabiti stabilizator se adsorbira na površino AuND in tvori elektrostatično dvojno plast, ki ustvarja odbojno silo med delci. Ta odbojna sila preprečuje, da bi delci prišli v tesen stik, s čimer preprečijo agregacijo ali flokulacijo [146].

**Prilagoditev pH** suspenzije vpliva na površinski naboj AuND, ki je odvisen od pH, s pozitivnim nabojem pri nizkih vrednostih pH in negativnim nabojem pri visokih vrednostih pH. S prilagoditvijo pH suspenzije na vrednost, kjer je absolutna vrednost površinskega naboja AuND največji, se poveča elektrostatična odbojnost med delci, kar preprečuje aglomeracijo ali flokulacijo [141], [146].

**Stabilizacija zaradi soli:** Dodatek soli v suspenzijo se lahko uporabi za stabilizacijo suspenzij AuND. Ioni soli lahko preprečijo odbojne sile med delci, s čimer zmanjšajo elektrostatično odbojnost in omogočijo delcem, da bi prišli v tesen stik. Vendar pa lahko pri določeni koncentraciji soli, ioni soli povzročijo zmanjšanje debeline dvosloja, kar povzroči flokulacijo ali agregacijo. Zato je treba eksperimentalno določiti optimalno koncentracijo soli za stabilizacijo [141], [146].

**Temperaturno povzročena stabilizacija:** Temperaturo lahko uporabimo za stabilizacijo suspenzij AuND. Ko temperatura narašča, se Brownovo gibanje delcev poveča, kar preprečuje, da bi delci prišli v tesen stik in se aglomerirali ali flokulirali. Zato lahko segrevanje suspenzije uporabimo za stabilizacijo suspenzij AuND, vendar obstaja nevarnost, da s povišano temperaturo dosežemo ravno nasproten učinek in povzročimo pospešeno aglomeracijo [141], [146].

**Ultrazvočno obdelavo** je mogoče uporabiti za razpršitev aglomeriranih ali flokuliranih AuND. Ultrazvočni valovi ustvarjajo akustično kavitacijo, ki ustvarja visoke strižne sile, te razbijejo aglomerirane ali flokulirane delce. Tudi v tem primeru vnos dodatne energije lahko povzroči sintranje aglomeratov [146].

## 6.2 Izbira stabilizatorja

Izbira stabilizatorja za nanodelce v suspenziji je odvisna od vrste nanodelcev, zahtevami glede stabilnosti in najpomembneje: predvideno uporabo. Na izbiro vplivajo tudi lastnosti nanodelcev, kot so njihova velikost, površinski naboj in kemijska sestava. Če imajo nanodelci močan pozitivni ali negativni površinski naboj, se lahko za ustvarjanje elektrostatične stabilizacije uporabi stabilizator z nasprotnim nabojem. V primeru nevtralnega površinskega naboja nanodelcev je najučinkovitejša sterična stabilizacija z uporabo neionskih površinsko aktivnih snovi ali polimerov [32]. Opravljene meritve Zeta potenciala suspenzije nestabiliziranih AuND, sintetiziranih z USP, so pokazale izredno nizek površinski naboj in močno tendenco k aglomeraciji (slika 14).

Druga zahteva izbire stabilizatorja vključuje lastnosti samega stabilizatorja, kot so njegova molekulska masa, hidrofobna ali hidrofilna narava in združljivost z nanodelci. Stabilizator se mora učinkovito adsorbirati na površino nanodelcev in ustvariti stabilno pregrado, ki preprečuje združevanje ali sedimentacijo nanodelcev. Poleg tega mora biti stabilizator združljiv s predvideno uporabo nanodelcev, kot je biokompatibilnost za biomedicinske aplikacije ali kemijska stabilnost za industrijske procese [31]. Te lastnosti so posebej izpostavljene v primeru uporabe v hitrih testih, saj imamo opravka s protitelesi in antigeni, ki poleg oznake predstavljajo ključno funkcionalno komponento, ki je potrebna za uspešno delovanje testa.

Na tej osnovi je treba posebno pozornost nameniti pH oziroma kislosti ali alkalnosti okolja, saj to vpliva na delovanje protiteles na več načinov. Vezava protiteles na antigene je ključni korak v imunskem odzivu in je učinek, ki ga koristimo v hitrih testih za vezavo analita. pH okolja lahko vpliva na vezavno afiniteto in stabilnost interakcij protitelo-antigen. Na splošno imajo protitelesa običajno optimalno vezavno afiniteto in stabilnost pri fiziološkem območju pH telesa, ki je rahlo alkalno, s pH okoli 7,4 [147]. Odstopanja od tega območja pH lahko potencialno vplivajo na sposobnost protiteles, da se učinkovito vežejo na antigene. Konformacija ali oblika protiteles je kritična za njihovo delovanje. Spremembe v pH lahko spremenijo konformacijo protiteles, kar lahko vpliva na njihovo sposobnost prepoznavanja in vezave na antigene. Protitelesa imajo specifične regije, imenovane antigen-vezavno mesto, ki se vežejo na antigene. Spremembe v pH lahko porušijo konformacijo vezavnega mesta protitelesa, kar lahko vpliva na njegovo sposobnost vezave na antigene z visoko specifičnostjo [148], [149]. Spremembe pH izven optimalnega območja lahko določajo učinkovitost in uspešnost encimske aktivnosti protiteles, kar lahko zmanjša njihovo sposobnost nevtralizacije

antigenov. Področje Fc protiteles medsebojno deluje z receptorji Fc na imunskih celicah, kot so makrofagi in naravne celice ubijalke, tako, da sproži imunske odzive, kot sta fagocitoza in od protiteles odvisna celična citotoksičnost. pH lahko vpliva na vezavno afiniteto med regijo Fc protiteles in receptorji Fc, kar lahko deluje na sposobnost protiteles, da vključijo imunske celice in sprožijo imunske odzive [150]. Na kratko lahko sklenemo, da je pH ključna omejitev v izbiri stabilizatorjev, saj je funkcionalnost hitrega testa omejena na raztopine s pH 7,4, ki vsebujejo puferske spojine za zagotavljanje ustreznega pH.

Pri izbiri stabilizatorja je treba upoštevati tudi njegovo topnost in disperzibilnost v topilu ter zahtevano koncentracijo za učinkovito stabilizacijo. S pregledom literature in z ozirom na uspešno preliminarno izvedene eksperimente smo se osredotočili na uporabo treh stabilizatorjev: polivinilpirolidon (PVP), polietilenglikol (PEG) in trinatrijev citrat.

### 6.2.1 PVP

Polivinilpirolidon (PVP) je vodotopen sintetični polimer, ki je sestavljen iz ponavljajočih se enot monomera vinilpirolidona. Običajno se uporablja kot stabilizator ali površinsko aktivna snov v različnih aplikacijah, vključno s sintezo in stabilizacijo AuND [85], [151]. Za stabilizacijo AuND se uporablja zaradi svoje sposobnosti, da tvori zaščitno plast na površini nanodelcev, ki preprečuje njihovo združevanje ali aglomeracijo. Mehanizem stabilizacije vključuje adsorpcijo molekul PVP na površino AuND, kar tvori sterično pregrado, ki preprečuje, da bi nanodelci prišli v tesen stik in se združili. Pirolidonske skupine v PVP lahko medsebojno delujejo s površino AuND s šibkimi Van der Waalsovimi silami, vodikovimi vezmi ali elektrostatičnimi interakcijami, odvisno od specifičnih pogojev procesa sinteze ali modifikacije površine [121], [152], [153]. Uporaba PVP kot stabilizatorja ponuja številne prednosti pri sintezi in stabilizaciji AuND. Zagotavlja koloidno stabilnost in pri določenih metodah sinteze, kot sta Turkevicheva in Brust-Schreffinova, tudi nadzor nad njihovo velikostjo in obliko [19]. PVP je prav tako mogoče enostavno odstraniti s površine AuND s pranjem ali drugimi metodami blage obdelave, pri čemer ostanejo stabilni AuND z visoko stopnjo čistosti za nadaljnjo funkcionalnost ali uporabo. Poleg tega je PVP biokompatibilen in se pogosto uporablja v različnih biomedicinskih aplikacijah, zaradi česar je primeren za stabilizacijo AuND v biomedicinske namene.

### 6.2.2 PEG

Polietilenglikol (PEG) je sintetični polimer, sestavljen iz ponavljajočih se enot etilenglikola. Običajno se uporablja kot stabilizator ali površinsko aktivna snov v različnih aplikacijah,

vključno s sintezo in stabilizacijo AuND. PEG je hidrofilni polimer, ki tvori zaščitno plast okoli površine AuND in preprečuje agregacijo ali aglomeracijo. Mehanizem stabilizacije vključuje adsorpcijo molekul PEG na površino AuND, kar ustvarja sterično pregrado, ki preprečuje, da bi nanodelci prišli v tesen stik in se združili. Hidrofilna narava PEG pomaga ustvariti odbojno silo med AuND, kar zavira njihov stik in agregacijo [84], [133], [154]. PEG je biokompatibilen in se pogosto uporablja v različnih biomedicinskih aplikacijah, vključno z dostavo zdravil in medicinskim slikanjem. Ko se uporablja za stabilizacijo AuND, lahko PEG pomaga izboljšati njihovo biokompatibilnost, zaradi česar so primerni za uporabo v bioloških sistemih. PEG je znan po svojih "prikritih" (angleško "stealth") lastnostih [155], saj lahko zmanjša adsorpcijo proteinov ali drugih biomolekul na površino nanodelcev, kar lahko pomaga zmanjšati njihovo zaznavo od imunskega sistema in izboljša čas njihovega kroženja *in vivo*. To je lahko še posebej pomembno za biomedicinske aplikacije, kjer je zaželena podaljšana cirkulacija in zmanjšano imunsko prepoznavanje. PEG je mogoče zlahka odstraniti s površine AuND s pranjem ali drugimi obdelavami, pri čemer ostanejo stabilni nanodelci z visoko stopnjo čistosti za nadaljnjo funkcionalizacijo ali uporabo. To omogoča natančen nadzor nad površinskimi lastnostmi AuND, kar olajša njihovo nadaljnjo obdelavo [133].

### 6.2.3 Trinatrijev citrat

Natrijev citrat je sol citronske kisline, ki je šibka organska kislina in se naravno pojavlja v mnogih rastlinah. Običajno se uporablja kot stabilizator pri sintezi in stabilizaciji AuND. Natrijev citrat stabilizira AuND s postopkom, znanim kot elektrostatična stabilizacija. Citratni ioni se adsorbirajo na površini AuND in s karboksilatnimi skupinami tvorijo negativno nabito plast, kar ustvarja odbojno elektrostatično pregrado med nanodelci. To elektrostatično odbijanje preprečuje agregacijo ali aglomeracijo AuND in se na ta način stabilizirajo. Natrijev citrat se pogosto uporablja v biomedicinskih aplikacijah zaradi svoje biokompatibilnosti in nizke toksičnosti, zaradi česar je primeren za stabilizacijo AuND, ki so namenjeni biološki ali medicinski uporabi [31], [84], [126].

Molekulska masa polimernih stabilizatorjev, kot sta PVP in PEG, lahko vpliva na stabilizacijo AuND. Polimerni stabilizatorji se adsorbirajo na površino nanodelcev in ustvarijo sterično pregrado, ki preprečuje nanodelcem, da bi prišli v tesen stik in se združili. Molekulska masa polimernega stabilizatorja vpliva na velikost in debelino sterične pregrade, pri čemer polimeri z višjo molekulkso maso na splošno zagotavljajo večjo in debelejšo sterično oviro okoli nanodelcev. Ta povečana sterična ovira lahko pomaga preprečiti agregacijo ali aglomeracijo, kar vodi k izboljšani stabilnosti. Debelejše polimerne plasti lahko tudi zmanjšajo dostopnost

površine nanodelca za druge molekule, kot so proteini ali drugi stabilizatorji, kar lahko dodatno poveča stabilnost. Molekulska masa polimernega stabilizatorja lahko vpliva na površinsko pokritost polimera na površini nanodelca. Polimeri z višjo molekulkso maso lahko zagotovijo večjo pokritost površine, kar pomeni, da se na nanodelec adsorbira več polimernih molekul. Ta povečana površinska pokritost lahko povzroči bolj gosto zapakirano polimerno plast na površini nanodelca, kar lahko izboljša stabilnost nanodelcev z zagotavljanjem učinkovitejše sterične pregrade proti agregaciji. Prav tako lahko masa polimernega stabilizatorja vpliva na moč in naravo interakcij med polimerom in površino nanodelcev. Polimeri z višjo molekulkso maso lahko kažejo močnejše interakcije s površino nanodelcev preprosto zaradi večjega števila tvorjenih van der Waalsovih ali vodikovih vezi, kar lahko dodatno poveča stabilnost nanodelcev. Molekulska masa polimernega stabilizatorja lahko vpliva tudi na njegovo topnost v reakcijskem mediju in viskoznost raztopine. Polimeri z višjo molekulkso maso imajo lahko nižjo topnost in večjo viskoznost, kar lahko vpliva na kinetiko procesa stabilizacije, konjugacije in končen namen uporabe nanodelcev [144], [153], [156]–[158].

Z ozirom na te predstavljene lastnosti smo eksperimentalno ovrednotili več tržno dosegljivih PVP in PEG z različnimi molskimi masami. Seznam ovrednotenih stabilizatorjev je razviden v Preglednica 3.

Preglednica 3: Ovrednoteni stabilizatorji

<b>Ime</b>	<b>Molekulska masa [g/mol]</b>	<b>Proizvajalec</b>	<b>Lot#</b>
Natrijev citrat	258,06	Merck KGaA (Nemčija)	AM1546248013
PEG 200	Povprečno 200	Sigma-Aldrich (Nemčija)	BCCD3709
PEG 400	Povprečno 400	Sigma-Aldrich (Belgija)	BCCC5566
PEG 6000	Povprečno 6000	Sigma-Aldrich (Nemčija)	BCCC6603
PVP 10K	Povprečno 10.000	Sigma-Aldrich (Kitajska)	WXBD4486V
PVP 40K	Povprečno 40.000	Thermo Scientific	R24H055
Saharoza	342,30	Sigma-Aldrich (Nemčija)	STK0598

### 6.3 Liofilizacija

Liofilizacija je postopek, pri katerem se tekočino ali trdno snov zamrzne in nato posuši v vakuumu. Izraz "lioofilizacija" izhaja iz grških besed "lyo", ki pomeni "zrahljati" ali "raztopiti", in "phylaxis", ki pomeni "zaščita". Je široko uporabljena tehnika za podaljševanja roka trajanja pokvarljivih materialov, zlasti občutljivih bioloških snovi, z odstranjevanjem vlage, ne da bi pri tem povzročili znatno škodo njihovi strukturi ali funkciji zaradi povišane temperature. Liofilizacija ima veliko aplikacij na različnih področjih, vključno s farmacijo, konzerviranjem hrane, biotehnologijo in ohranjanjem občutljivih materialov, kot so zgodovinski dokumenti ali umetniška dela, saj omogoča dolgotrajno skladiščenje pokvarljivih materialov, hkrati pa ohranja njihovo kakovost in celovitost, saj odstranjevanje vlage pomaga preprečiti kvarjenje, razgradnjo in rast mikrobov [137], [159]–[161].

Postopek liofilizacije običajno vključuje naslednje korake:

**Zamrzovanje.** Material, ki ga želimo liofilizirati, zamrznemo z nadzorovano hitrostjo hlajenja, da se strdi v stabilno, steklasto stanje. Ta korak je ključen, saj lahko negativno vpliva na nanodelce. Rast kristalov lahko povzroči agregacijo ali združevanje AuND, kar se odraža v spremembah njihove velikosti, oblike in porazdelitve. Združevanje nanodelcev lahko povzroči nastanek večjih grozdov ali agregatov, ki imajo lahko drugačne lastnosti v primerjavi s posameznimi nanodelci [162]. Na površinske lastnosti AuND, kot so njihov površinski naboj, kemijska sestava in obnašanje, lahko bistveno vpliva rast kristalov. Tako agregacija, ki jo povzroča rast kristalov, lahko povzroči spremembe v površinskem naboju nanodelcev, kar lahko vpliva na njihovo stabilnost in disperzibilnost v raztopini. Poleg tega lahko rast kristalov na površini nanodelcev spremeni sestavo površine ali spremeni lastnosti površinske plazmonske resonance, kar lahko vpliva na njihove optične in katalitične lastnosti [44].

Rast kristalov ima prav tako lahko negativen vpliv na organske spojine, kot so protitelesa, saj se lahko povzroči fizični stres na molekulah protiteles, kar lahko vodi do denaturacije ali razgrnitve proteinske strukture. Denaturacija pomeni izgubo tridimenzionalne strukture in konformacije protitelesa, kar je ključnega pomena za njegovo biološko aktivnost in specifičnost vezave. Denaturirana protitelesa lahko izgubijo sposobnost prepoznavanja ciljnih antigenov in učinkovite vezave nanje, kar zmanjša njihovo učinkovitost. Rast kristalov lahko sproži tudi agregacijo molekul protiteles, kar povzroči nastanek proteinskih agregatov. Proteinski agregati so večje grude proteinov, ki so lahko netopne in lahko kažejo spremenjene lastnosti v primerjavi s posameznimi molekulami protiteles [163]. Agregacija protiteles lahko povzroči zmanjšano

biološko aktivnost, spremenjeno farmakokinetiko in morebitne pomisleke glede imunogenosti [163], [164].

Vpliv rasti kristalov je mogoče izničiti oziroma zmanjšati z dvema pristopoma. Prvi pristop vključuje izredno hitro ohlajevanje, ki ne dopušča rasti kristalov in tvori amorfen material, vendar je navedene pogoje izredno težko zagotoviti, kadar imamo opravka z večjimi količinami reagentov. Drug pristop vključuje uporabo kriostabilizatorjev (krioprotektori oz. kriokonzervansi). Kriostabilizatorji pomagajo zmanjšati nastajanje ledenih kristalov z zaviranjem ali nadzorom rasti ledenih kristalov med zamrzovanjem. Delujejo kot osmotski agensi, znižajo zmrzišče raztopine in zmanjšajo velikost in število nastalih ledenih kristalov, s čimer zmanjšajo morebitno škodo na biološkem materialu. Kriostabilizatorji lahko olajšajo predelavo občutljivih materialov po odmrzovanju z zmanjšanjem nastalih poškodb, ki jih povzročijo procesi zamrzovanja in odmrzovanja. Pomagajo lahko zmanjšati poškodbe celic ali tkiva, ohraniti stabilnost proteinov in nanodelcev [43], [162], [165], [166].

**Primarno sušenje** (sublimacija): Zamrznjen material je izpostavljen znižanemu tlaku, pri tem se uporabi toplota, ki omogoča, da zamrznjena voda neposredno preide iz trdnega v plinasto stanje (sublimacija), ne da bi prešla skozi tekočo fazo. Ta postopek odstrani večino vode iz materiala.

**Sekundarno sušenje** (desorpcija): Po primarnem sušenju se temperatura nekoliko dvigne, da se z desorpcijo iz materiala dodatno odstranijo vse preostale vezane molekule vode. Ta korak se običajno izvaja pri višji temperaturi in nižjem tlaku v primerjavi s primarnim sušenjem.

Liofilizacijo so izvajali s parametri, prikazanimi v Preglednica 4.

Preglednica 4: Parametri liofilizacije

	Temperatura [°C]	Čas [h]	Tlak [Pa]
Zamrzovanje	-40	4	atmosferski
Primarno sušenje	+20	12	1–4
Sekundarno sušenje	+30	33	1–4

Liofilizacija je v sklopu priprave oznak AuND predstavljala ključen korak, saj je omogočala odstranitev topila, to je vode, in ostanka HCl. S posušenimi AuND je bilo možno pripraviti nove raztopine z različnimi koncentracijami AuND z uporabo različnih kemikalij, tako da je bil dosežen stabilni pH, ki je bil potreben za izvedbo konjugacije AuND in s tem delovanje hitrih testov. V postopku liofilizacije AuND je bilo treba uporabiti kriostabilizatorje [24], [161].



## 6.4 Izbira kriostabilizatorjev

**Disaharidi**, kot sta trehaloza in saharoza, se običajno uporabljajo kot krioprotektorji v različnih bioloških in biotehnoških aplikacijah, vključno s postopkom liofilizacije nanodelcev. Uporaba je povezana z njihovimi edinstvenimi lastnostmi, ki jim omogočajo učinkovito zaščito pred poškodbami ob zamrzovanju in sušenju. Disaharidi imajo visoko temperaturo posteklenitve, kar pomeni, da lahko ob ohlajanju ali sušenju tvorijo steklasto, amorfno stanje, namesto da kristalizirajo. To steklasto stanje pomaga imobilizirati molekule in prepreči njihovo premikanje ali kemijske reakcije, kar lahko zmanjša tveganje poškodb med zamrzovanjem in sušenjem. Disaharidi imajo visoko sposobnost vezave vodikovih vezi z molekulami vode. Med sušenjem z zamrzovanjem lahko disaharidi nadomestijo molekule vode in tvorijo zaščitno hidratacijsko lupino okoli biomolekul, nanodelcev ali drugih občutljivih struktur, ki preprečujejo njihovo denaturacijo ali agregacijo med sušenjem. Disaharidi lahko ustvarijo osmotski gradient, ki pomaga zmanjšati nastajanje ledenih kristalov med zamrzovanjem. Znižajo lahko zmrziščno točko in zmanjšajo količino nastalega ledu, kar zmanjša potencialno škodo, ki jo povzroči tvorba ledenih kristalov, kot so mehanski stres in učinki koncentracije. Hidroksilne skupine, prisotne v disaharidih, lahko tvorijo vodikove vezi z biomolekulami ali nanodelci, kar pomaga stabilizirati njihovo strukturo in preprečiti agregacijo ali denaturacijo med sušenjem in rehidracijo. Disaharidi so zelo topni v vodi in med sušenjem tvorijo steklasto stanje. Lahko so tudi podvrženi reverzibilnim prehodom med amorfnim in kristalnim stanjem, kar omogoča učinkovito sušenje in rehidracijo brez izgube aktivnosti ali strukture [24], [43], [44], [160], [164], [167].

**PVP** lahko tvori zaščitno prevleko okoli nanodelcev ali drugih občutljivih struktur med sušenjem z zamrzovanjem, kar pomaga preprečiti njihovo agregacijo ali denaturacijo. Zavira lahko nastajanje ledenih kristalov in zmanjša mehanski stres ter učinke koncentracije, povezane z zamrzovanjem, kar lahko pomaga ohranjati stabilnost in strukturo nanodelcev. PVP ima površinske lastnosti, ki mu omogočajo disperzijo in stabilizacijo nanodelcev v raztopini. Lahko prepreči združevanje ali usedanje nanodelcev med sušenjem in rehidracijo, kar pomaga ohranjati njihovo enakomerno porazdelitev in stabilnost. PVP je zelo hidrofilen, kar pomeni, da ima močno afiniteto do vode. Med sušenjem lahko PVP ustvari zaščitno hidratacijsko lupino okoli nanodelcev ali drugih biomolekul, kar zmanjša njihovo izpostavljenost v zraku in prepreči denaturacijo ali agregacijo. PVP ima visoko temperaturo steklastega prehoda, kar mu omogoča, da med sušenjem tvori steklasto, amorfno stanje, namesto da kristalizira. To steklasto stanje

lahko imobilizira molekule in prepreči njihovo premikanje ali kemijske reakcije, kar jih pomaga zaščititi pred poškodbami med sušenjem z zamrzovanjem. PVP je topen v vodi in se med sušenjem zlahka raztopi in tvori steklasto stanje. Lahko je tudi podvržen reverzibilnim prehodom med amorfnim in kristalnim stanjem, kar omogoča učinkovito sušenje in rehidracijo brez izgube aktivnosti ali strukture [24], [43], [44], [160], [164], [167].

## 6.5 Sinteza z izbranimi stabilizatorji

Za vrednotenje vpliva stabilizatorjev smo z USP izvedli pet eksperimentov sinteze AuND iz prekursorja zlatovega (III) klorida pri koncentraciji Au = 0,5 g/L s parametri, kot so prikazani v preglednici 2. V vseh eksperimentih je bila uporabljena enaka masna koncentracija posameznega stabilizatorja v zbiralnem sistemu z demineralizirano vodo (2,5 g/L). Tako sta bili edini spremenljivki v vsakem eksperimentu drugačna kemijska sestava polimernega stabilizatorja (preglednica 5) in različno število polimernih molekul. USP sinteza je potekala 1 h, AuND so bili zbrani v zbirnem sistemu z V = 0,5 L pri T = 10 °C.

Preglednica 5: Seznam uporabljenih polimernih stabilizatorjev

Stabilizator	PEG 200	PEG 400	PEG 6000	PVP 10K	PVP 40K
--------------	---------	---------	----------	---------	---------

Po vsakem eksperimentu USP sinteze smo nastali suspenziji AuND z izbranim stabilizatorjem dodali še dva dodatna stabilizatorja, in sicer natrijev citrat in saharoza, tako da je bila njuna posamična koncentracija 1 g/L. Z ICP-OES je bila zatem izmerjena koncentracija Au v posamezni suspenziji, rezultati so prikazani v Preglednica 6.

Preglednica 6: Koncentracija Au v suspenzijah različnih stabilizatorjev v ppm

Stabilizator	PEG 200 [2,5 g/L]	PEG 400 [2,5 g/L]	PEG 6000 [2,5 g/L]	PVP 10K [2,5 g/L]	PVP 40K [2,5 g/L]
AuND [ppm]	5,4	9,1	64,7	63,2	83,4
+citrat [1 g/L]	5,1	9,3	65,0	62,9	83,3
+saharoza [1 g/L]	5,5	8,9	63,3	63,1	82,8
+citrat [1 g/L] & saharoza [1 g/L]	5,4	9,0	64,2	63,1	83,6

Nastalim suspenzijam smo odvzeli 20 mL vzorca in vsakega liofilizirali z LIO-2000 FLT (Kambič, d. o. o., Semič, Slovenija), tako da smo dobili posušene AuND (Slika 17).



Slika 17: AuND v različnih suspenzijah; stanje pred liofilizacijo

Nastale posušene AuND smo ponovno rehidrirali z 20 mL demineralizirane vode, temu je sledil postopek dodatnega mešanja 30 s v ultrazvočni kopeli. Rehidrirane suspenzije smo pustili 1 h mirovati, s tem smo omogočili vsem večjim oziroma nestabilnim in aglomeriranim delcem, da so se posedli. Na gladini suspenzije je bil zatem odvzet vzorec z  $V = 1$  mL za določitev vsebnosti Au z ICP-OES. Izmerjene koncentracije Au so prikazane v Preglednica 7.

Preglednica 7: Izmerjene vsebnosti Au v različnih suspenzijah po redisperziji liofiliziranih

AuND v ppm

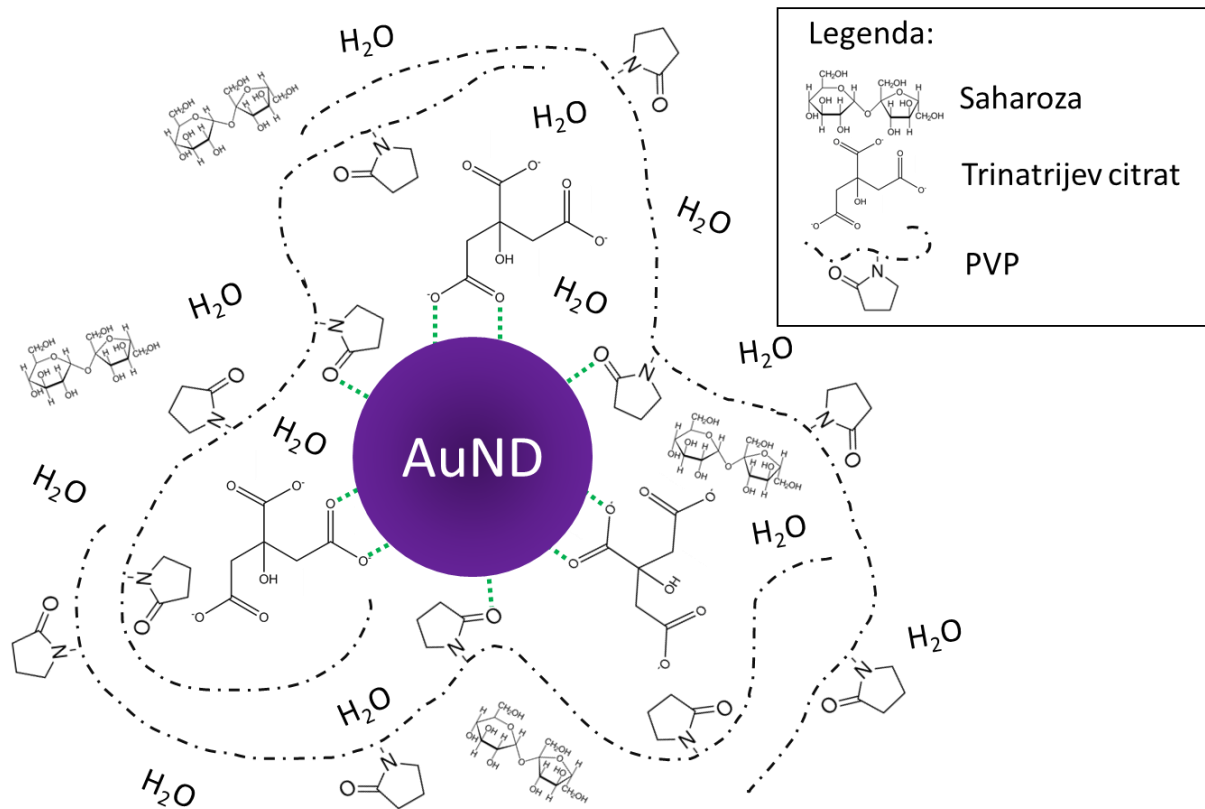
Stabilizator	PEG 200 [2,5 g/L]	PEG 400 [2,5 g/L]	PEG 6000 [2,5 g/L]	PVP 10K [2,5 g/L]	PVP 40K [2,5 g/L]
AuND [ppm]	1,2	0,7	33,2	41,9	69,0
+citrat [1 g/L]	0,4	0,8	37,1	40,2	77,8
+saharoza [1 g/L]	0,9	1,1	32,1	40,7	70,1
+citrat [1 g/L] & saharoza [1 g/L]	2,3	2,4	35,2	52,3	81,2

## 6.6 Mehanizem stabilizacije AuND

Poskusi stabilizacije AuND, ki so bili pripravljene z USP z uporabo različnih stabilizatorjev, so odkrili, da PVP zagotavlja višjo stopnjo stabilizacije kot PEG. To lahko pripišemo višji molekularni masi PVP, ki je po vsej verjetnosti odločilen dejavnik za tovrstno stabilizacijo. Višja stopnja stabilizacije je povezana tudi z učinkovitostjo lovljenja AuND v zbirnih steklenicah, ki je bila zelo visoka. Rezultati so pokazali še, da naknadni dodatek citrata poviša stabilnost AuND, medtem ko je dodatek saharoze zanemarljiv. V sklepnem delu je bilo ugotovljeno, da

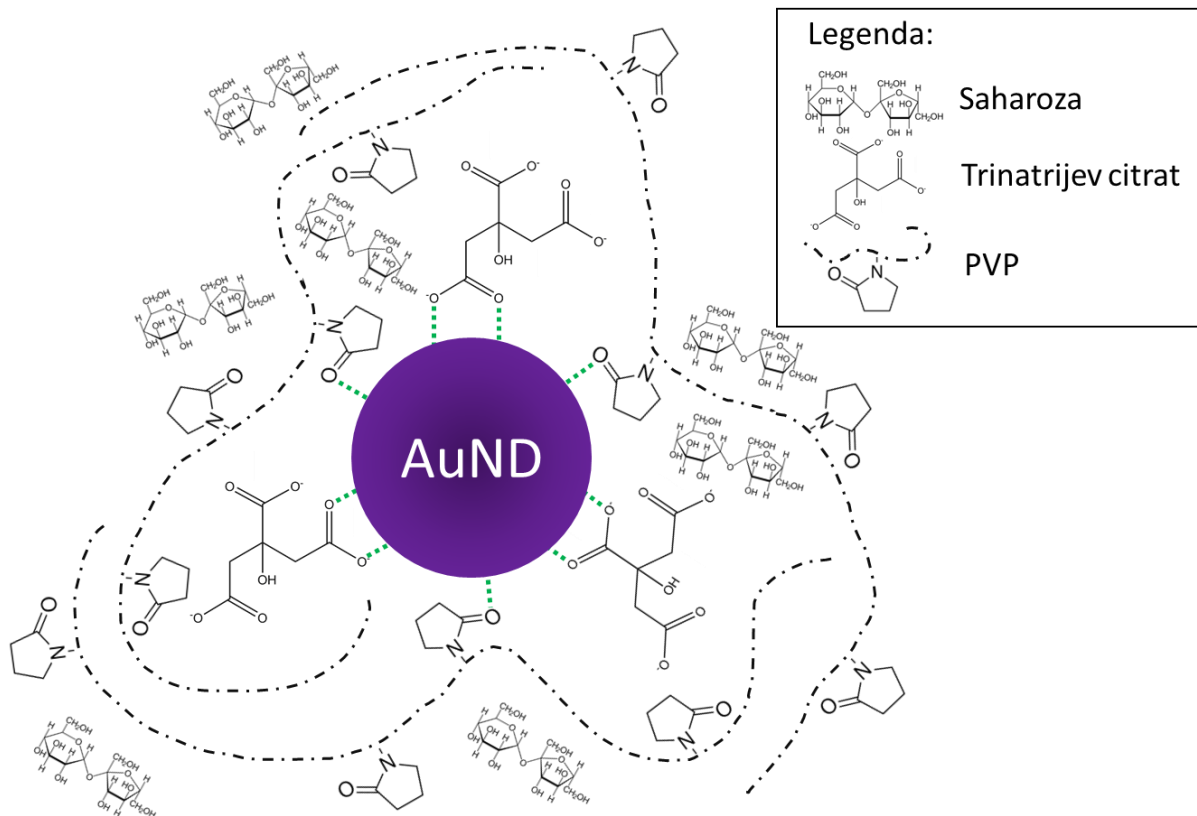
kombinacija stabilizatorjev PVP 40K (2,5 g/L), natrijevega citrata (1 g/L) in saharoze (1 g/L) daje najvišjo stabilnost AuND suspenzije pred, med liofilizacijo in po njej.

Na tej osnovi je bil postavljen verjetni mehanizem poteka vezave stabilizatorjev na površino AuND, ki je prikazan na sliki 18. V prvi stopnji se v zbiralni steklenici na površino AuND najprej veže PVP, ki ustvarja sterično stabilizacijo. Prekritje površine AuND najverjetneje ni popolno in omogoča, da z naknadnim dodatkom natrijevega citrata ta mesta zapolnimo.



Slika 18: Mehanizem stabilizacije AuND v suspenziji

V procesu liofilizacije suspenzije AuND, ki vsebuje še citrat in saharozo, ta prevzame pomembno vlogo, saj skupaj s PVP preprečuje kristalizacijo vode in omogoča tvorbo steklaste faze, ki imobilizira nanodelce. Ob začetku sušenja, kjer se odstrani voda, saharozna nadomesti proste vodikove vezi, kar stabilizira obliko, podobno kot v suspenziji. Shema predlaganega mehanizma je prikazana na sliki 19. Kombinacija saharoze in PVP tvori stabilno porozno matrico oz. kriogel, ki imobilizira nanodelce. Veliko število mest, kjer lahko saharozna tvori vodikovo vez, zagotavlja izredno hitro in učinkovito rehidracijo AuND, ko ponovno dodamo topilo.



Slika 19: Mehanizem stabilizacije suhih AuND

## 7 KONJUGACIJA

V kemiji se konjugacija nanaša na združevanje ali povezovanje dveh ali več molekul ali spojin v eno celoto. To lahko vključuje kovalentno vez, kjer si atomi delijo elektrone, da tvorijo kemijsko vez ali nekovalentne interakcije, kot so vodikove vezi, van der Waalove sile ali elektrostatske interakcije. Konjugacija se pogosto uporablja za spreminjanje lastnosti ali funkcij molekul ali spojin, na primer pri konjugaciji biomolekul ali ligandov na nanodelce ali druge površine.

### 7.1 Izbira lovilnih molekul

#### 7.1.1 Protitelesa

Protitelesa, znana tudi kot imunoglobulin, so skupina glikoproteinov, ki sodelujejo pri specifičnih obrambnih mehanizmih vretenčarjev. Sproščajo se iz celic plazmatk (limfociti B) po aktivaciji, ki jo posreduje antigen (virus, bakterija, parazit) in imajo različne efektorske

funkcije. Svojo funkcijo opravljajo tako, da se specifično vežejo na antigene in omogočajo sprožitev imunskega odziva v telesu z aktiviranjem reakcijske kaskade, ki poveča nastanek drugih IgG. Najpomembnejše funkcije protiteles so [1], [61], [150], [168]:

- odstranjevanje patogenov in toksinov iz okuženega organizma,
- aktivacija drugih komponent imunskega mehanizma, kot npr. IgM in IgG, ki aktivirajo kaskado imunskih reakcij, kar ima za posledico odpiranje por v tarčni membrani celice;
- aktivnost pri opsonizaciji in fagocitozi, celični citotoksičnosti in odzivih na parazite ali pri alergijah, ki sproščajo svoja nabita zrnca (histamina, prostaglandinov itd.) in sodelujejo pri izločanju parazitov s pomočjo eozinofilcev [169].

Pri razvoju hitrega testa smo se ciljno osredotočili na sočasno zaznavo prisotnosti protiteles za virus SARS-CoV-2. Vezano na poznani imunski odziv okužbe s tem virusom je potek bolezni covid-19 naslednji:

1. Prepoznavanje: Ko virus vstopi v telo, ga imunski sistem prepozna kot tujek. To sproži nastanek protiteles, ki so specializirani proteini, katere proizvajajo imunske celice, imenovane celice B. Protitelesa so zasnovana tako, da specifično prepoznajo virus in se nanj vežejo.
2. Nevtralizacija: Ko se protitelesa vežejo na virus, lahko virusu preprečijo okužbo zdravih celic. Ta postopek, znan kot nevtralizacija, lahko nevtralizira virus in prepreči njegovo nadaljnje širjenje v telesu.
3. Opsonizacija: Protitelesa IgG in IgM lahko tudi označijo virus za uničenje v sodelovanju z drugimi deli komplementarnega imunskega sistema. Ta proces poveča sposobnost imunskih celic, da prepoznajo in zajamejo virus, kar vodi do njegovega uničenja.
4. Aktivacija komplementarnega dela imunskega sistema: protitelesa lahko aktivirajo tudi skupino proteinov v krvi, ki so del komplementarnega imunskega sistema. Ta skupina lahko neposredno napade virus tako, da tvori membranski napadalni kompleks, ki lizira virusno ovojnico, kar povzroči uničenje virusa.
5. Spominski odziv: Po začetnem imunskem odzivu se nekatere celice B spremenijo v spominske celice B, ki lahko ob ponovni izpostavljenosti hitreje in učinkoviteje proizvedejo protitelesa. Ta spominski odziv pomaga imunskemu sistemu vzpostaviti hitrejši in močnejši odziv v primeru, da bi bila oseba v prihodnosti ponovno izpostavljena virusu [170]–[173].

Znotraj imunskega odziva, se pri obolenju s covidom-19 tvorijo ključna protitelesa IgA, IgM in IgG.

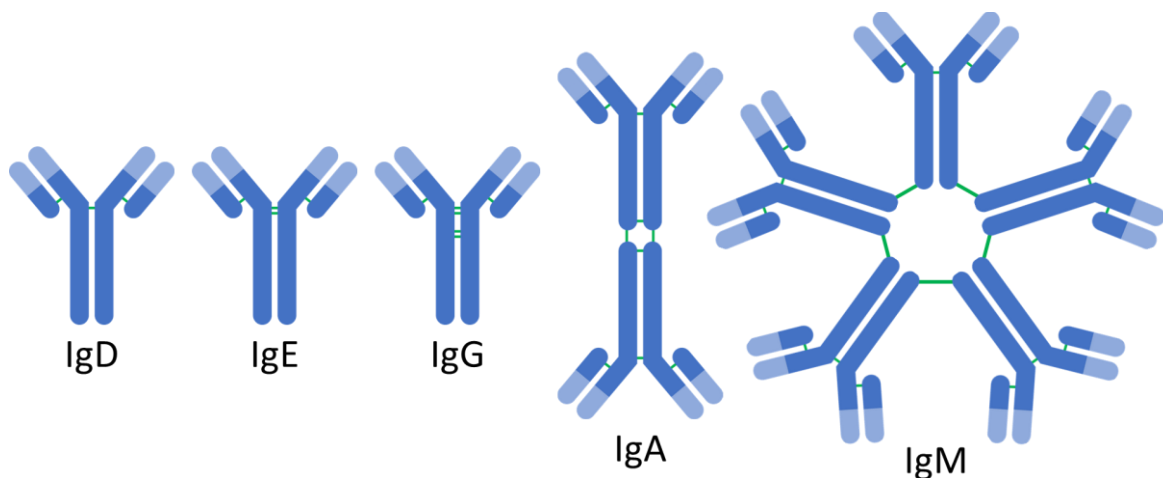
**IgA** je protitelo, ki je običajno v izločkih sluznice, kot so slina, solze ter dihala in prebavila. Ima ključno vlogo pri obrambi pred patogeni na površini sluznice. Med okužbo s covidom-19 se lahko koncentracija IgA v krvi poveča zgodaj v okužbi, saj virus vstopi v dihalne poti in sproži imunski odziv. Vendar pa koncentracije IgA v krvi ne obstanejo dolgo na visoki ravni [149], [174].

**IgM** je prvi razred protiteles, ki jih imunski sistem proizvede kot odziv na okužbo. To je običajno prvo protitelo, ki ga je mogoče zaznati v krvi po nedavni okužbi. Med okužbo s covidom-19 se koncentracija IgM v krvi poveča v zgodnjih fazah okužbe in nato sčasoma upade, ko imunski odziv napreduje. Protitelesa IgM so na splošno kratkotrajna in jih sčasoma nadomestijo protitelesa IgG [175].

**IgG** je najpogostejši razred protiteles v krvi in povzroči dolgotrajno imunost. Protitelesa IgG se običajno proizvedejo v večjih količinah pozneje v imunskem odzivu in lahko ostanejo v krvi dlje časa. Med okužbo s covidom-19 je lahko koncentracija IgG v krvi sprva nizka, vendar se lahko poveča, ko imunski odziv napreduje in je okužba nadzorovana. Protitelesa IgG naj bi zagotovila imunost proti prihodnjimi okužbami z istim virusom [171].

Z zaznavo različnih protiteles bi tako lahko teoretično sledili napredku bolezni covid-19, kar bi zdravstvenim delavcem dalo zgodnjo informacijo, ali imajo opravka z nedavno okužbo ali z obolenjem, ki traja že več dni.

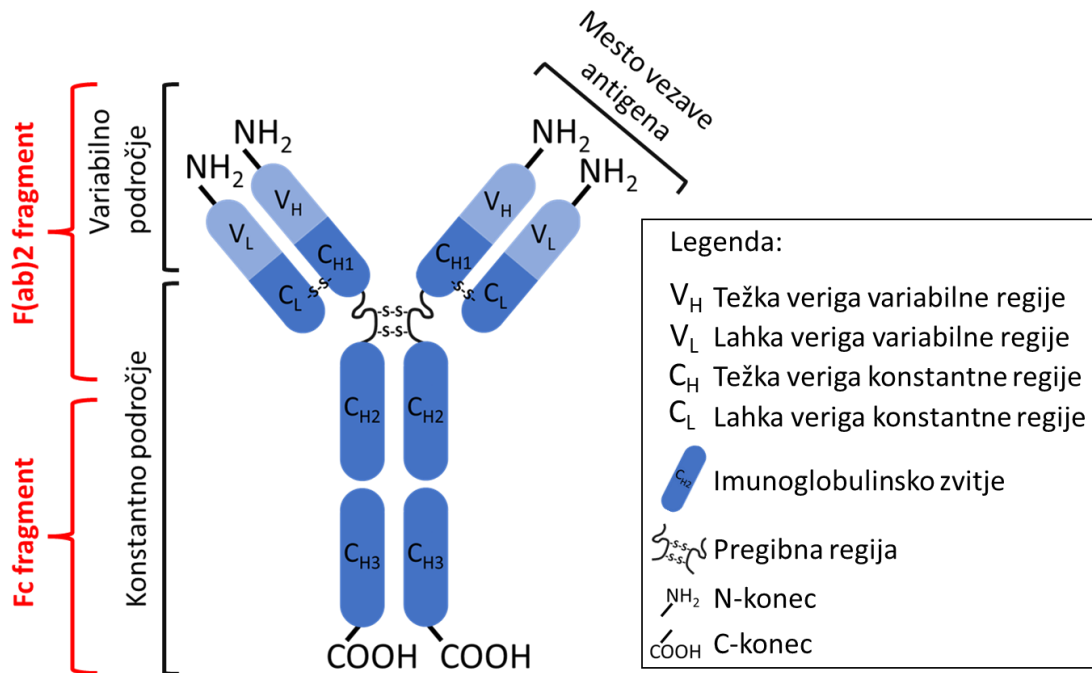
Različna protitelesa imajo različne strukture, ki so prikazane na sliki 20. Vsem je skupno, da imajo značilno Y strukturo, ki je ključnega pomena za njihovo delovanje.



Slika 20: Različne strukture protiteles [169], [176]

Protitelesa so sestavljena iz različnih komponent. Če se osredotočimo na protitelesa IgG, jih lahko opišemo kot polipeptidne verige dveh vrst – težke verige z maso 55–70 kDa in lahke verige z maso 24–25 kDa. Medtem ko obstaja pet vrst težkih verig ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  in  $\mu$ ), sta lahkih verig le dve vrsti ( $\kappa$  in  $\lambda$ ). Celotna molekula IgG je kombinacija 2 enakih težkih verig, povezanih z disulfidnimi mostovi z 2 enakima lahkima verigama. Poleg disulfidnih mostov med verigami obstajajo tudi intrakatenarni disulfidni mostovi, ki prispevajo k stabilnosti molekule. Obstojče različne težke verige povzročijo pet vrst protiteles IgG: IgA, IgD, IgE, IgG in IgM, odvisno od vrste težke verige, iz katere je sestavljena molekula. Ta strukturna razlika se nanaša tudi na njihovo posebno funkcionalnost. Protitelo je mogoče najti v monomernih oblikah (kot IgG), v dimerih ali tetramerih. Lahka veriga je sestavljena iz dveh posebnih regij: variabilne domene na njenem N-končnem delu in konstantne domene. Podobno težka veriga vsebuje variabilno domeno in tri ali štiri konstantne domene ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$ ). Variabilne regije lahkih in težkih verig skupaj tvorijo posebne cone, znane kot divergentne hipervariabilne regije ali regije, ki določajo komplementarnost, pomembne za interakcijo molekul z antigenom. Tri od teh regij so v variabilni domeni lahke verige in tri v domeni variabilni domeni težke verige. Te regije so ločene z okvirji, ki so sestavljeni iz visoko ohranjenih sekvenc. Narava komplementarnost daje molekuli visoko specifičnost vezave antigena, ki se med protitelesi razlikuje. Ustvari se lahko na milijone različnih protiteles, od katerih ima vsako posebno specifičnost. Med petimi že predstavljenimi oblikami protiteles je IgG najpogostejši in glavni plazemski glikoprotein z N-vezanimi oligosaharidi v domeni  $C_{H2}$  (slika 21). Oligosaharidne verige (v povprečju dve do osem verig ogljikovih hidratov) so deli, povezani z asparaginom, ki so na Fc regiji molekule IgG in sestavljajo vrsto diantenarnih kompleksnih struktur z nekaterimi presekačimi se ostanki N-acetilglukozamina ali fukoze. Biantenarni oligosaharidni kompleksi tvorijo mostove čez domene na Fc regiji z uporabo svojih krakov  $\alpha(1-6)$  za interakcijo s polipeptidom sosednje domene, in svojih krakov  $\alpha(1-3)$  za medsebojno interakcijo, da tvorijo most med dvema domenama [169], [176].





Slika 21: Domene IgG protitelesa [169], [176]

### 7.1.2 Antigeni

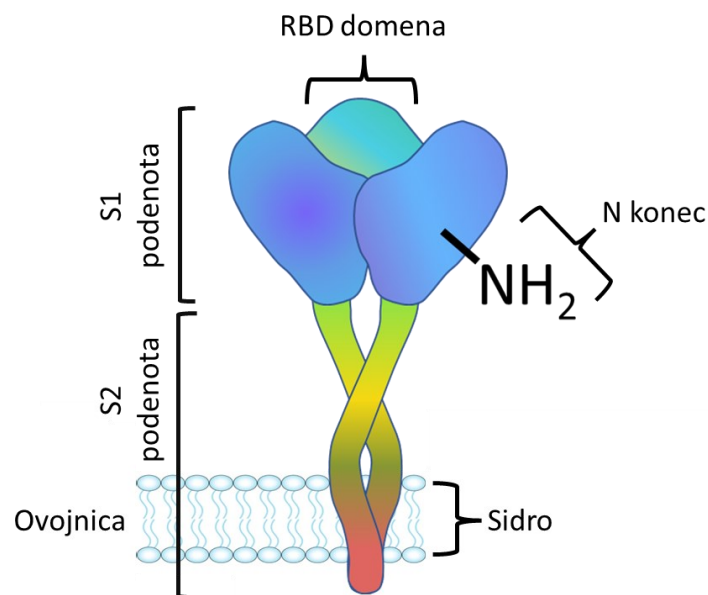
Antigeni so snovi, ki so sposobne inducirati imunski odziv v telesu. Lahko so molekule ali deli molekul npr.: proteini, ogljikovi hidrati, lipidi ali nukleinske kisline, ki jih imunski sistem prepozna kot tuje. Ob vstopu v telo, sprožijo imunski sistem, ki proizvede specifične molekule, imenovane protitelesa, ki so zasnovana tako, da prepoznajo antigen in se nanj vežejo. Ta proces vezave pomaga nevtralizirati ali odstraniti antigen in s tem zaščiti telo pred morebitno škodo povzročiteljev okužb, kot so bakterije, virusi ali paraziti [13], [150].

Antigeni so lahko pridobljeni iz različnih virov, vključno s patogeni, kot so virusi ali bakterije, pa tudi neinfektivnimi snovmi, kot so alergeni ali nekateri proteini, ki jih najdemo v hrani ali zdravilih. Poleg tega je mogoče izdelati spremenjene ali umetne antigene za diagnostične teste ali kot komponente cepiv za spodbujanje imunskega odziva brez povzročanja bolezni, kar pomeni, da niso vsi antigeni škodljivi; nekateri antigeni so lahko celo koristni za telo, na primer tisti v cepivih, ki pomagajo spodbuditi zaščitni imunski odziv proti specifičnim boleznim [13].

Pri razvoju lastnega hitrega testa smo želeli zaznati prisotnost protiteles, ki so specifična na SARS-CoV-2 in prek njih spremljati potek bolezni. Za ustrezno izbiro je treba razumeti mehanizem, s katerim se virus veže na človeške celice, saj je ta mehanizem ključen pri poteku bolezni in naravni odziv imunskega sistema je, da tvori protitelesa nanj in tudi na druge komponente virusa.

SARS-CoV-2 je virus, ki povzroča covid-19 in se veže na človeške celice s postopkom, ki vključuje predvsem njegove glikoproteine S in receptor ACE2 na površini človeških celic. Interakcija virusa in človeških celic se začne s tem, ko se bodičasti protein na površini virusa veže na receptor ACE2 na površini človeških celic.

Bodica virusa je sestavljena iz dveh podenot: S1 in S2. Struktura virusa je shematsko ponazorjena na sliki 22. Znotraj podenote S1 obstaja specifična regija, imenovana receptorsko vezavna domena (RBD), ki ima visoko afiniteto in selektivnost na receptor ACE2. Vezava RBD in ACE2 sproži niz dogodkov, ki vodijo do membranske fuzije virusa in gostiteljske celice. Ko se membrani virusne in gostiteljske celice združita, lahko genetski material virusa, vključno z njegovo RNK, vstopi v človeško celico. To virusu omogoči, da ugrabi celični stroj, s čimer se razmnoži in povzroči bolezen [15], [177], [178].



Slika 22: Struktura bodičastega S glikoproteina virusa SARS-CoV-2

### 7.1.3 Izbira komponent

Prvenstvena ideja delovanja hitrega testa je, da na AuND ulovimo značilna protitelesa IgA, IgG in IgM. To zahteva, da na površino nanodelcev konjugiramo fragmente virusa, na katere se protitelesa lahko vežejo. V ta namen smo se osredotočili na S1 podenoto bodičastega proteina, saj ta vsebuje reaktivno RBD domeno in prosti N-konec [173].

Za zaznavo različnih protiteles smo koristili živalska protitelesa na človeška protitelesa. Za nadzorno linijo smo koristili znano kombinacijo zajčjih IgG protiteles in protiteles na zajčji IgG, kot je prikazano v preglednici 8.

Preglednica 8: Seznam uporabljenih proteinov in njihova funkcija v testu

Ime	Tip	Cat. #	Izvor	Funkcija
SARS-CoV-2 bodičasti proteini S1 (ak 1-681)	rekombinantni antigen	AGX818	HEK293 celice	lovilni antigen
Protitelesa proti humanim IgA (specifičen na $\alpha$ verigo)	afinitetno izolirano protitelo	I1261	koza	testna linija za IgA
Protitelesa proti humanim IgG (specifičen na fab domeno)	afinitetno izolirano protitelo	I5260	koza	testna linija za IgG
Protitelesa proti humanim IgG (specifičen na $\mu$ verigo)	afinitetno izolirano protitelo	I2386	koza	testna linija za IgG
Protitelesa proti humanim IgG (specifičen na Fc domeno)	delipidiziran polni antiserum	I9135	zajec	Kontrolna linija
Protitelesa proti zajčjim IgG	monoklonski RMG03 recombinant	SAB5600127	koza	lovilno protitelo za kontrolno linijo

## 7.2 LFIA testi

LFIA je kratica za imunološki test s stranskim tokom. To je vrsta hitrega diagnostičnega testa, ki se uporablja za odkrivanje prisotnosti specifičnih snovi, kot so protitelesa ali antigeni, v vzorcu. Ciljna uporaba LFIA testov je za testiranje na kraju, saj se pridobijo rezultati v razmeroma kratkem času tj. po nekaj minutah. Testi LFIA so sestavljeni iz traku ali kasete s porozno membrano, ki vsebuje specifične molekule, kot so protitelesa ali antigeni, ki se lahko vežejo na tarčno snov oz. analit, ki se ga išče. Vzorec je običajno telesna tekočina, kot je kri, slina ali urin, in nanese se jo na testni listič ter teče skozi membrano prek kapilarnega delovanja. Če je ciljna snov prisotna v vzorcu, se bo vezala na specifične molekule na testnem traku. Test LFIA običajno vsebuje konjugat oznake in lovilne molekule, ki se vežejo na ciljne snovi. Ko vzorec še naprej teče skozi membrano, doseže območje, kjer je postavljena linija zajemnih molekul. Te zajemne molekule se bodo vezale na oznako in posledično tvorile vidno črto. Obarvanost te vrstice kaže na pozitiven rezultat in potrjuje prisotnost iskanega analita. Testi LFIA se pogosto uporabljajo za različne namene, vključno z odkrivanjem nalezljivih bolezni (kot so covid-19, HIV in gripa), za testiranje nosečnosti, testiranje zdravil in testiranje varnosti hrane. Še posebej so uporabni v primerih, kjer so potrebni hitri rezultati, na oddelkih za nujne primere in za oddaljena okolja ali okolja z omejenimi viri [1].

### 7.2.1 Princip delovanja

Delovanje dobro zasnovanega LFIA je preprosto: vzorec se nanese na vzorčno blazinico, ki zagotavlja, da se lastnosti vzorca ujemajo s tistimi, ki so potrebne za optimalno detekcijo (pH,

ionska moč, viskoznost, čistost in koncentracija blokirnih sredstev). Nato začne vzorec potovati vzdolž traku in doseže konjugatno blazinico, ki sprosti označeni detekcijski bioreceptor (protitelo, ki je konjugirano na nanodelec za detekcijo). Omočenje suhe konjugatne blazine sprosti oznake in omogoči prvo interakcijo med analitom in bioreceptorjem. Vzorec nato potuje skozi nitrocelulozno membrano (imenovano tudi detekcijska blazinica). V večini LFIA sta na membrani vsaj dve črti: testna črta, kjer zajemni bioreceptor veže iskani analit, pri čemer nastane črta, ki je najpogosteje vidna s prostim očesom in naznanja prisotnost ali odsotnost analita; in kontrolno linijo s selektivnim bioreceptorjem, ki potrди pravilno delovanje LFIA. Na koncu odvečen vzorec doseže vpojno blazinico, ki zagotavlja zadosten volumen posteljice za popoln pretok vzorca [1], [57], [58].

### 7.2.2 Izbira komponent

Pri izbiri osnovnih komponent hitrega LFIA testa je posebno pozornost treba posvetiti izbiri ustreznih membran, ki zagotavljajo lateralni vlek vzorca znotraj hitrega testa [1], [57], [58].

- *Vzorčna blazinica*

Vzorčna blazinica predstavlja del LFIA, kjer se nanese vzorec. Ta komponenta ima dve ključni funkciji, in sicer zagotavlja enakomerni pretok vzorca in standardizacijo pogojev pufra vzorca. Material in oblika, ki sta izbrana za vzorčno blazinico, lahko bistveno vplivata na celoten sistem. Geometrija in značilnosti vzorčne blazinice so pomembne za nadzor pretoka vzorca ter za konstrukcijsko debelino, poroznost in splošne dimenzije blazinice.

Dodatna funkcija vzorčne blazine je stopnja zadrževanja delcev glede na njihove velikosti. Blazinica lahko odstrani večje delce in tako omogoči ustrezno filtracijo vzorca. Če izbrana vzorčna blazinica ne zagotavlja želene stopnje zadrževanja delcev, je možno vgraditi dodatno blazinico (npr. membrane za filtracijo krvi).

V komercialno dostopnih blazinicah za vzorce se uporabljata dve glavni vrsti materiala: celulozna vlakna in tkane mreže. Vzorčne blazinice iz celuloznih vlaken so običajno debelejše ( $\geq 250 \mu\text{m}$ ) in cenejše, vendar so zahtevnejše za rokovanje, zlasti ko so mokre. Običajno imajo večje prostornine sloja ( $\geq 25 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) in imajo večjo toleranco za kemikalije, ki so prisotne v pufu.

Vzorčne blazinice iz tkanih mrež, kot so steklena vlakna, imajo dobro natezno trdnost in omogočajo enakomerno porazdelitev vzorca po konjugirani blazinici. Poleg tega lahko tkane mreže delujejo tudi kot filter za odstranjevanje delcev iz vzorca, preprečujejo blokado

nadaljnjih blazinic in lahko zadržijo minimalne količine vzorca, zahvaljujoč majhnim prostorninam plasti ( $\leq 2 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ). Vzorčno blazino je treba izbrati na podlagi vrste analita, ki ga želimo zaznati, količino razpoložljivega vzorca in vrsto vzorca. Če je analit v območju mikrometerske velikosti (bakterije in celice), mora imeti vzorčna blazinica veliko prostornino (celulozna vlakna), ki omogoča pretok analita vzdolž traku LFIA. Podobno je za vzorec, ki zahteva dosledno pufranje. Nasprotno pa mora biti za analizo majhnih količin vzorcev blazinica tanka (tkane mreže) [1], [10], [57], [58].

- *Konjugatna blazina*

Najpogosteje uporabljen material za konjugatno blazinico so steklena vlakna, čeprav se lahko uporabljata tudi celuloza in poliester. Pri izbiri materiala konjugatne blazinice je treba upoštevati več dejavnikov, kot so debelina, prostornina blazine in odpornost na nespecifično vezavo. Debelejša blazinica pomeni večjo prostornino (ob predpostavki podobne velikosti por), to pa omogoča shranjevanje večje količine oznak za detekcijo, počasnejši pretok in večjo občutljivost. To pa pomeni tudi slabšo mehansko trdnost konjugatne blazinice v mokrem stanju.

V konjugatne blazinice so pogosto poleg konjugiranih nanodelcev dodani pufer in reagenti za stabilizacijo in ponovno raztapljanje. Ključne sestavine konjugiranega pufera so sladkorji, zlasti sahara in trehaloza, ki imajo glavni funkciji ohranjanje naravne konformacije dehidriranih proteinov (hidroksilne skupine molekul sladkorja po sušenju zamenjajo vodo okoli proteina) in omogočajo njihovo hitro ponovno raztapljanje po ovlaženju. Običajno se uporabljajo v koncentracijah od 1 % do 10 % prostornine. Ko je izbran ustrezen pufer, lahko konjugat bioreceptor-nanodelec nanese na membrano bodisi z naprševanjem ali s postopkom potapljanja. Doziranje z zračnim curkom je najbolj zanesljiva brezkontaktna metoda za nanos nanodelcev, saj zagotavlja količinsko pokritost celotne membrane. Metoda potopitve se uporablja, kadar metoda zračnega curka ni mogoča. Njena glavna pomanjkljivost je ta, da dosežena pokritost z nanodelci ni enakomerna in lahko vodi do velike variabilnosti testov. Naknadni postopek sušenja je ključen za ohranjanje stabilnosti posušenega konjugata in določa učinkovitost sproščanja iz membrane. Če se konjugatna blazinica ne posuši popolnoma, lahko nastane sirupu podobna raztopina, ki ne more teči skozi membrano. Najprimernejša načina za sušenje konjugatne blazinice po nanosu sta topel zrak ( $T < 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) ali vakuumsko sušenje. Za množično proizvodnjo LFIA je topel zrak najprimernejša metoda in je običajno fiksiran na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , da ne vpliva na stabilnost bioreceptorjev [1], [10], [57], [58].

- *Kromatografska membrana*

Komercialne kromatografske membrane so na splošno opredeljene s časom kapilarnega pretoka, ki je čas, potreben, da sprednja stran vzorca prekrije dolžino membrane (običajno 4 cm), in je na splošno izražen kot  $s/4$  cm. Na splošno velja, da daljši kot je čas kapilarnega pretoka, počasnejša je hitrost pretoka. Ta parameter ni ključen samo za celotno trajanje testa, ampak ima tudi temeljno vlogo pri določanju občutljivosti in specifičnosti LFIA. Visoki časi kapilarnega pretoka omogočajo daljši čas interakcije med ciljno molekulo in bioreceptorjem, s čimer se poveča občutljivost testa. Hkrati dolgi časi kapilarnega pretoka povečajo tudi možnost nespecifične vezave. Zato je ključnega pomena oceniti membrane glede na različne čase kapilarnega pretoka. Izbran material kromatografske membrane določa vrsto interakcij, ki urejajo funkcionalnost membrane z zajemnimi bioreceptorji (tako za testno kot za kontrolno linijo). Nitroceluloza je najpogosteje uporabljen material za membrane zaradi močne vezave na proteine vključno s protitelesi in nastavljivih lastnosti vpijanja (različni časi kapilarnega pretoka in možnost spreminjanja vsebnosti površinsko aktivne snovi) [1], [10], [57], [58].

- *Absorpcijska membrana*

Zadnja blazinica v LFIA testu je absorpcijska (vpojna) blazinica. Njena vloga je nadzor količine vzorca, ki ga lahko sprejme trak LFIA testa. Če vpojne blazinice ni, ko tekočina doseže konec membrane, se pretok ustavi in tekočina homogeno izhlapi vzdolž traku. To pomeni, da se lahko vse oznake, ki niso dosegle zadnjega dela detekcijske ploščice, naberejo na traku in povzročijo t. i. signalni hrup v ozadju. Prav v tem delu vpojna blazinica zagotavlja, da vse oznake in celoten vzorec dosežejo konec traku. Mere vpojne blazine je treba oceniti glede na količino tekočine, ki mora preiti skozi membrano. Tako na primer v primeru LFIA testa, kjer se zahteva uporaba pralnega pufra, mora vpojna blazina zagotoviti zadosten volumen postelje, da se zagotovi popolno pranje membrane [1], [10], [57], [58].

### 7.3 Konjugacija z AuND

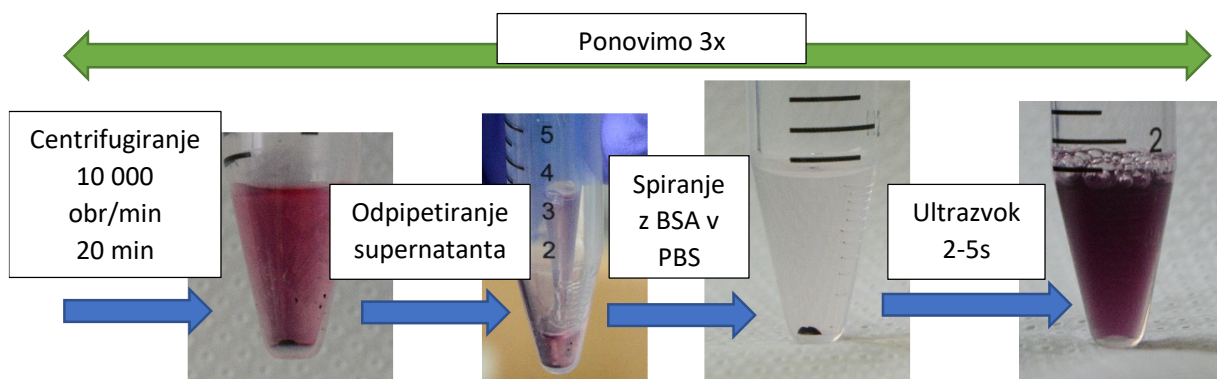
Izvedba konjugacije je navidezno enostaven postopek, kjer vmešamo različne proteine (antigene, protitelesa, ...) v suspenzijo oznak (nanodelcev). V najenostavnejšem primeru lahko pričakujemo naključno adsorpcijo molekul na površino oznake. Vendar takšen pristop v večini primerov ne zagotavlja ustrezne zanesljivosti za uporabo v diagnostičnih pripomočkih. Pri tem je treba zagotoviti dovolj stabilno in močno vez med površino oznake (AuND) in lovilnimi biomolekulami, ki sta v primeru razvoja hitrega testa, bili rekombinantni antigen SARS-CoV-

2 S1 (ak 1-681) za iskanje analita in monoklonska protitelesa proti zajčjim IgG za potrditev ustreznega delovanja kontrolne linije.

V začetnem delu raziskav smo povzeli poenostavljen osnovni protokol konjugacije, ki smo ga zasledili v literaturi [4]. Za potrditev uspešne konjugacije smo uporabili metodo UV-Vis, kjer je uspešna konjugacija zaradi spremembe hidrodinamskega radija in praktičnega testa funkcionalnosti na kromatografski kartici vidna kot zamik vrha krivulje.

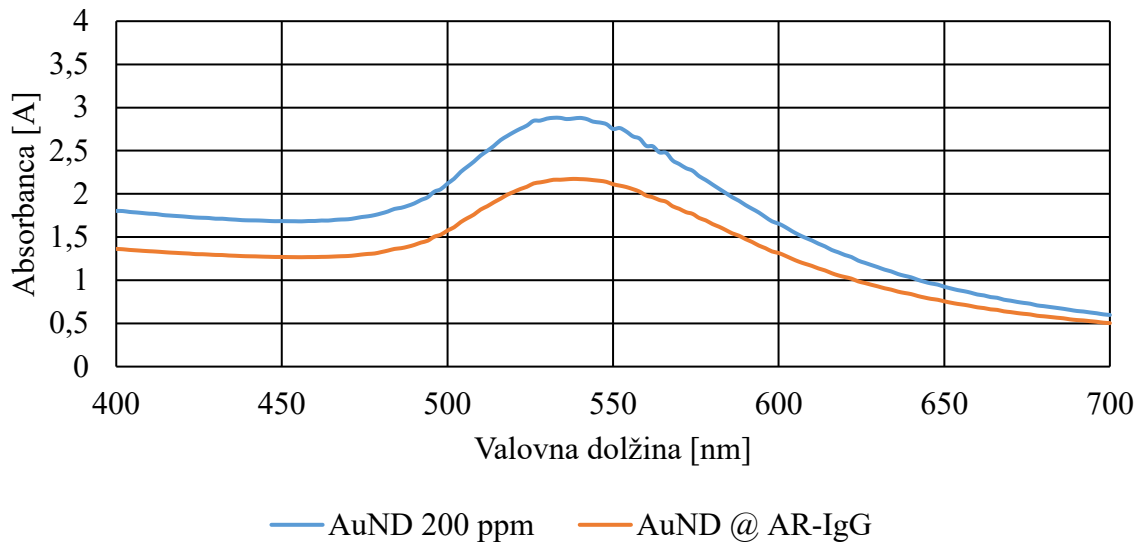
### 7.3.1 Preliminarni poskus konjugacije

V prvem poskusu smo pripravili suspenzijo na osnovi liofiliziranih AuND, ki so bili stabilizirani s PVP K40, s končno koncentracijo 200 ppm Au v fiziološki raztopini fosfatnega pufra (PBS). Tej suspenziji smo dodali 100  $\mu$ g protitelesa proti zajčjim IgG. Mešanico smo inkubirali pri sobni temperaturi za 30 min. Zatem smo začeli spirati konjugate, kjer smo suspenzijo centrifugirali pri 10.000 obr/min, 4 °C za 20 min. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in dodali raztopino 1 mg/mL govejega albumina v fiziološki raztopini fosfatnega pufra (BSA/PBS). Grudico, ki je nastala na dnu kivete, smo dispergirali z ultrazvočno kopeljo. Postopek smo ponovili 3 x (slika 23).



Slika 23: Ponazoritev korakov čiščenja AuND konjugata

Suspenzijo z AuND smo ovrednotili z UV-Vis metodo pred konjugacijo in po njej, kjer smo zaznali zamik v vrhu absorpcijskega spektra, kot je razvidno na sliki 24, iz 532 nm na 538 nm, kar posredno nakazuje spremembo v suspenziji. Nižja intenzivnost vrha konjugata AuND in protitelesi na zajčji IgG (AuND @AR-IgG) je posledica izgub nekonjugiranih AuND med čiščenjem.



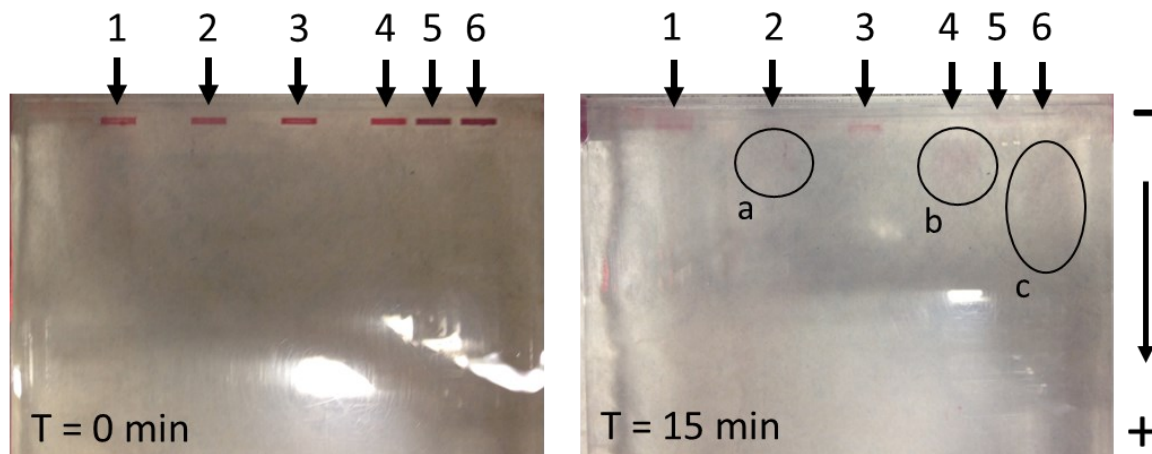
Slika 24: Izmerjen UV-Vis absorpcijski spekter suspenzije AuND pred konjugacijo in po njej

Za dodatno potrditev konjugacije smo pripravili vzorce iz suspenzij AuND 200 ppm in AuND @ AR-IgG in jih poskušali ovrednotiti z metodo gelske elektroforeze. Vzorci, ki so bili predmet raziskave, prikazuje Preglednica 9. Ker so predhodne meritve zeta potenciala pokazale skoraj nevtralen naboj AuND, smo testnim vzorcem suspenzij (2, 4 in 6) dodatno povečali naboj z dodatkom 1 % natrijevega dodecil sulfata (SDS), ki običajno povzroči presežek negativnega naboja. Pri vzorcih 3 in 4 smo z dodatkom dinatrijevega fosfata, ki predstavlja dodatni pufer, stabilizirali pH v suspenziji. Vzorca 5 in 6 sta predstavljal konjugat AuND in protitelesi na zajčji IgG. Kot je razvidno na sliki 25, po 15 min izpostavitve električnemu diferencialu (puščica 1) v primeru nemodificiranih AuND, ti niso potovali iz svojih začetnih žepkov. Malenkostna sprememba v barvi je bila posledica difuzije AuND iz vzorca v okoliški gel. Ta rezultat posredno in dodatno potrjuje nevtralen naboj AuND. Pri vzorcih 2 in 4, kjer je bil dodan SDS [179], so AuND potovali proti katodi, kar je dobro razvidno s slike 25 (področja, označena z a in b). V primeru konjugiranih AuND je dodatek SDS povzročil bistveno daljši tok, kot je to vidno na označenem področju c (slika 25). Sklepamo, da je to posledica nižjega naboja konjugiranih AuND, saj proteini, ki so vezani na njihovo površino, omogočajo večje število vezavnih mest za SDS in posledično ustvarjajo večji negativen naboj.



Preglednica 9: Seznam vzorcev

Število vzorca	Sestava	Dodan 1% SDS
1	AuND v PBS	
2	AuND v PBS	Da
3	AuND v 5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
4	AuND v 5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Da
5	AuND @ AR-IgG	
6	AuND @ AR-IgG	Da



Slika 25: Prikaz rezultatov potovanja nekonjugiranih in konjugiranih AuND iz različnih suspenzij z metodo gelske elektroforeze

**a** – Prikaz poti nekonjugiranih AuND (modifikacija z 1 % SDS)

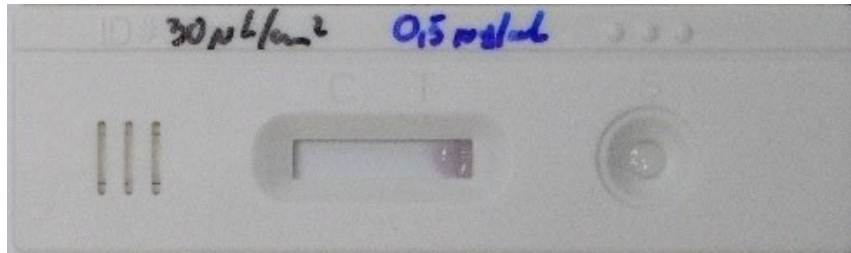
**b** – Prikaz poti nekonjugiranih AuND (modifikacija s presežkom pufru in z 1 % SDS)

**c** – Prikaz poti konjugiranih AuND (modifikacija z 1 % SDS)

Kljub dobri monodisperznosti in stabilnosti AuND sintetiziranih z USP v preliminarnem poskusu izdelave hitrega testa nismo dobili izrazite črte na kontrolni liniji, ki bi potrdila uspešno konjugacijo AuND s protitelesi na zajčji IgG. Nasprotno temu so rezultati gelske elektroforeze pokazali, da je po vsej verjetnosti prišlo do konjugacije AuND s protitelesi na zajčji IgG, kar je nakazovalo, da so AuND disperzni v velikosti ali naboju.

V naslednjem eksperimentalnem koraku konjugacije smo suspenzijo konjugata napršili na komercialno dostopno konjugatno blazinico s koncentracijo nanosa 30  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . Temu je sledil postopek sušenja pri 35 °C za 4 h. Tako pripravljene konjugatne blazine smo združili s kromatografsko membrano, na katero smo predhodno nanесли kontrolno linijo zajčjih protiteles proti človeškim IgG, specifičnih na Fc domeno. Kljub navidezno uspešni konjugaciji in sprostitvi AuND iz konjugatne blazine, so se ti razmeroma hitro imobilizirali na kromatografski

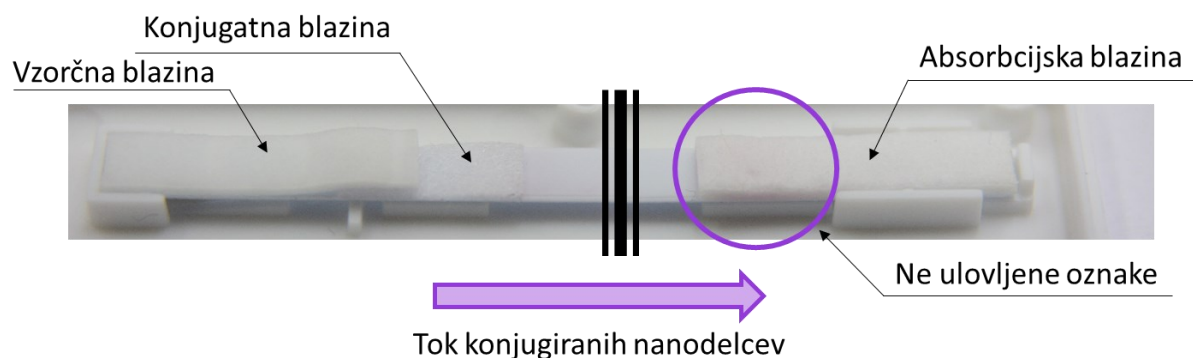
membrani, kot je prikazano na sliki 26. To je bil posreden dokaz, da so imeli AuND še vedno prosta mesta na svoji površini, kjer so lahko potekale nespecifične in naključne reakcije.



Slika 26: Prvi poskus ovrednotenja konjugiranih AuND v hitrem testu, kjer so se oznake imobilizirale na začetku kromatografske blazinice

### 7.3.2 Zmanjšanje deleža nespecifične vezave oznak

Da bi zmanjšali delež nespecifične vezave na površini AuND, smo uporabili visoko koncentracijo 10 mg/mL BSA/PBS (pred tem 1 mg/mL), in to takoj po konjugaciji AuND s protitelesi na zajčji IgG. Temu je sledil je postopek dodatne inkubacije konjugata za čas 30 min. Ustreznost izbrane koncentracije BSA/PBS smo preverili s praktičnim poskusom, kjer smo uspešno zabeležili popolno sprostitev in tok AuND skozi celotno dolžino hitrega testa, kot je razvidno na sliki 27. Poskus je tudi odkril, da nismo dosegli uspešne konjugacije AuND, saj je prišlo do minimalne imobilizacije oznak in s tem šibke obarvanosti na kontrolni liniji, kot je razvidno s slike 28.



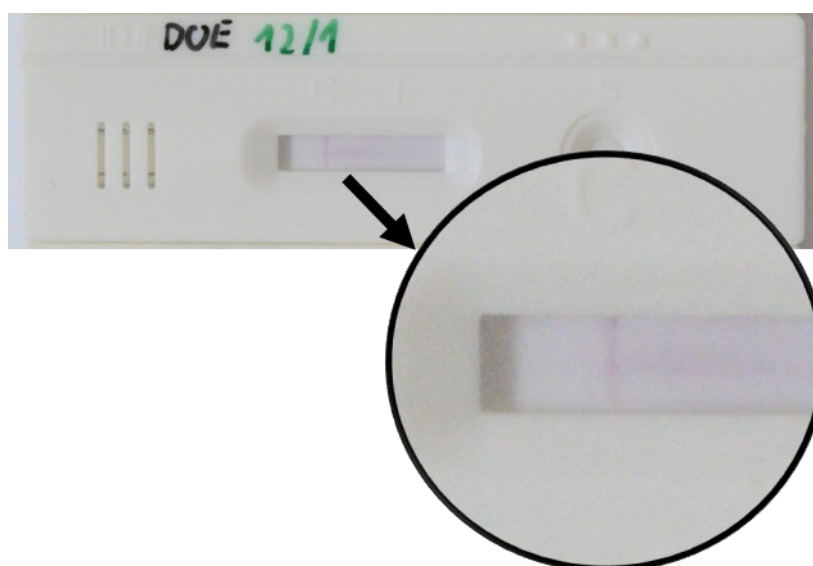
Slika 27: Prikaz popolne sprostitev oznak iz konjugatne blazine in tok do vzorčne blazine



Slika 28: Šibka obarvanost kontrolne linije

### 7.3.3 Optimizacija konjugacije AuND

AuND, ki smo jih uporabili za oznake, so bili sterično stabilizirani s PVP 40K. Predpostavili smo, da ne moremo izključiti, da bi se lahko med inkubacijo proteinov vezale ne samo s površino AuND, temveč tudi s polimerom, ki ga v večji meri odstranimo pri korakih čiščenja. V ta namen smo v protokol konjugacije dodali predhodni korak čiščenja AuND. Potek čiščenja je bil naslednji: (i) prvotno suspenzijo s koncentracijo 200 ppm smo centrifugirali pri 10.000 obr/min, 4 °C in  $t = 20$  min; (ii) izvedli smo postopek odstranitve supernatanta, ki smo ga nadomestili s svežim PBS; (iii) nastalo grudico smo redispersgirali z ultrazvokom in celoten postopek čiščenja ponovili 2 x. S tem pristopom smo dosegli bistveno izboljšavo v intenzivnosti obarvanja kontrolne linije, kot je prikazano na sliki 29.

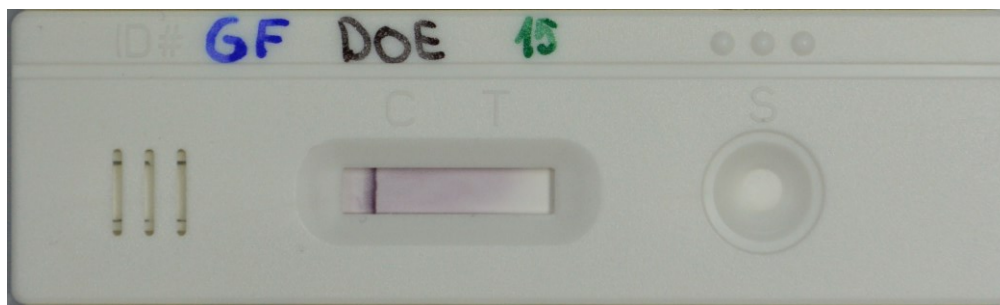


Slika 29: Prikaz intenzivnejše obarvanosti kontrolne linije po uvedbi dodatnega čiščenja konjugata

Citratni ioni se pogosto koristijo kot stabilizator in vezavno mesto za konjugacijo na AuND, še posebej je njihova uporaba poznana pri tistih nanodelcih, ki so bili sintetizirani s Turkevichevo metodo. Predhodni poskusi v naših eksperimentih so pokazali, da citratni ioni pripomorejo k stabilizaciji AuND, vendar pa v sklopljenem procesu USP in liofilizacije njihova prisotnost ne zagotavlja zahtevane vloge pri kriostabilizaciji. Skladno s temi omejitvami smo pripravili AuND, ki so bili sterično stabilizirani s PVP K40 in dodatno stabilizirani s trinatrijevim citratom in saharozo.

Eksperimente optimizacije konjugacije smo nadaljevali na posušeni AuND, iz katerih smo pripravili suspenzijo s koncentracijo 200 ppm Au. Suspenzijo smo prečistili s postopkom čiščenja 2 x in zatem izvedli konjugacijo. S tem pristopom smo dosegli visoko stopnjo

konjugacije AuND, saj se je kontrolna linija v hitrem testu intenzivno obarvala, kot je prikazano na sliki 30.



Slika 30: Intenzivna obarvanost kontrolne linije

S slike 29 je tudi razvidno, da se je del AuND imobiliziral na kromatografski membrani, kar bi lahko povzročilo kasneje težave pri ocenitvi rezultata hitrega testa, še posebej pri tistih mejnih vzorcih, kjer je analit prisoten v zelo nizki koncentraciji. Predpostavili smo, da je bila razlog za takšno imobilizacijo verjetna prisotnost ostanka stabilizatorjev, katerih koncentracija je bila razmeroma visoka, a nujno potrebna v predhodnem postopku liofilizacije. V ta namen smo pristopili k študiji optimalnega čiščenja konjugata tako, da smo spreminjali in raziskali ključne parametre, kot so vrtljaji centrifuge, čas in število ponovitev čiščenja – glej Preglednica 10.

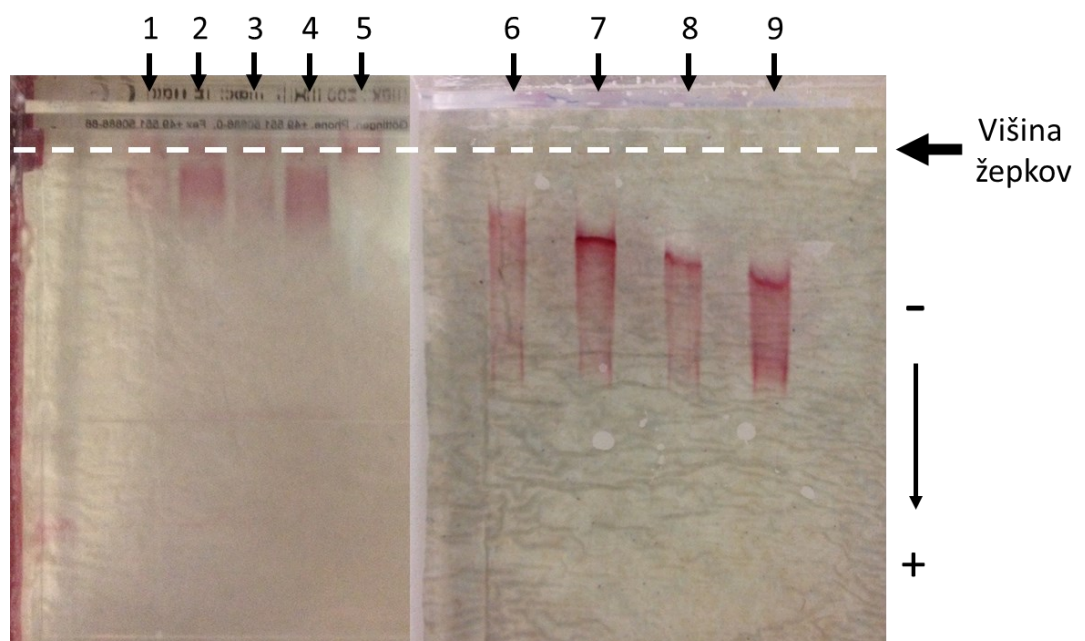
Opis priprave vzorcev je bil naslednji: (i) centrifugiranje 5 mL suspenzije z AuND, ki so bili stabilizirani s PVP K40, trinatrijevim citratom in saharozo; (ii) odstranitev 4 mL supernatanta in izvedba nadomestitve s 4 mL PBS; (iii) redispergiranje AuND s sonifikacijo za čas 30 s v ultrazvočni kopeli.

Preglednica 10: Prikaz parametrov, ki so bili raziskani pri optimizaciji čiščenja AuND konjugata

št. Vzorca.	Vrtljaji centrifuge [obr/min]	Temperatura [°C]	Čas [min]	Ponovitve [n]
1	10.000	4	10	1
2	10.000	4	10	2
3	5.000	4	10	1
4	5.000	4	10	2
5	10.000	20	10	1
6	10.000	4	20	2
7	10.000	4	40	1
8	5.000	4	20	2
9	5.000	4	40	1

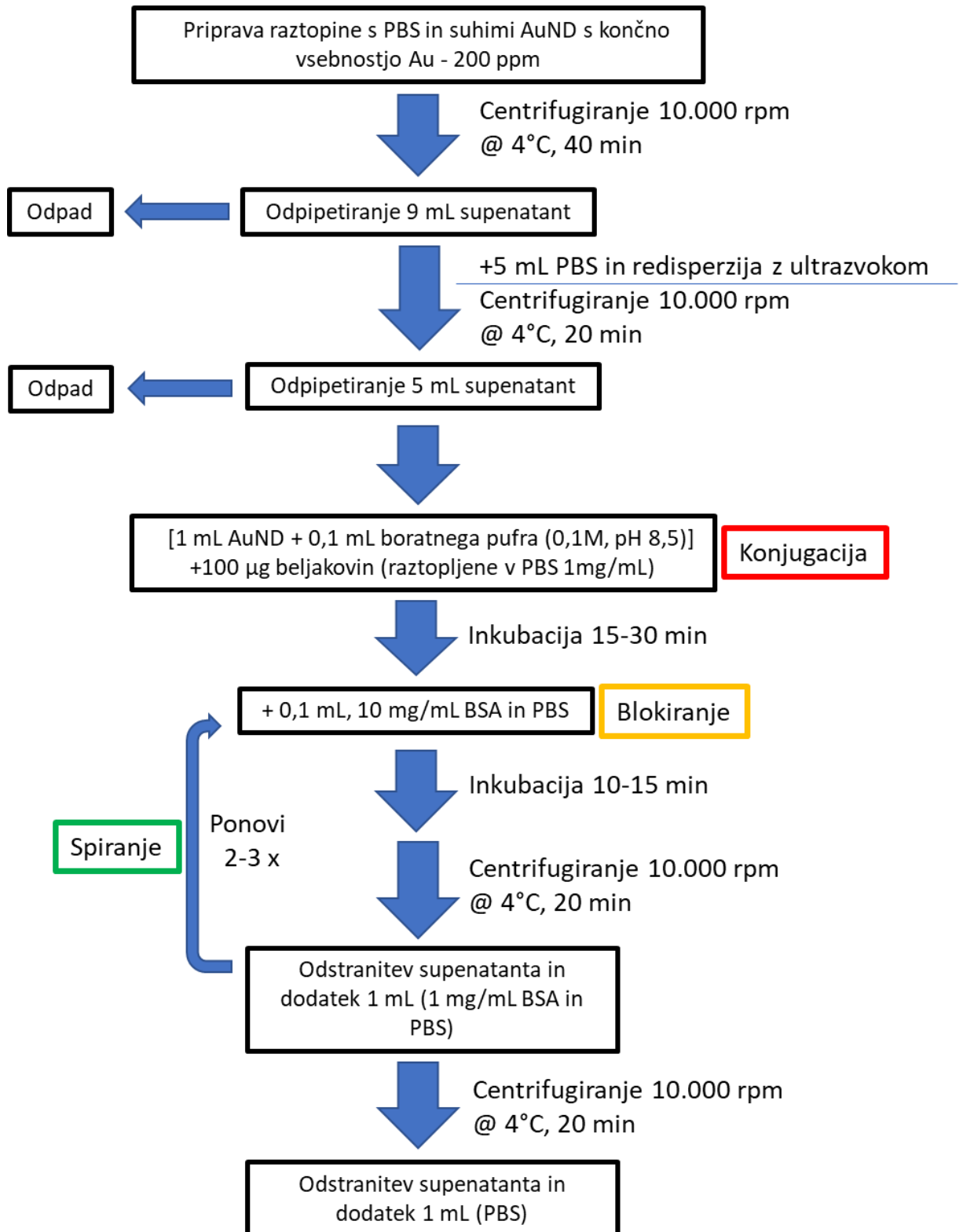
Vpliv optimiziranega čiščenja smo vrednotili z elektroforezo. Rezultati so prikazani na sliki 31 in nakazujejo, da ima pri prvi seriji poskusov (1–5) zaporedno centrifugiranje in spiranje večji vpliv na višanje koncentracije kot pa čas centrifugiranja. Daljši tok vzorcev 3 in 4 kaže, da nižji obrati preferenčno separirajo večje delce konjugata AuND. V sklopu testiranj optimiziranega čiščenja smo želeli ovrednotiti tudi vpliv temperature med centrifugiranjem. Za ta namen smo izbrali vzorec 5, ki smo ga centrifugirali pri temperaturi 20 °C. S poskusom elektroforeze smo odkrili, da je temperatura med centrifugiranjem ključnega pomena, saj previsoka T, kot je npr. sobna, povzroči izrazito spremembo v suspenziji, tako da se vpliv SDS izrazito oslabi.

Z drugim nizom testov (6–9), smo spremljali vpliv daljšega časa centrifugiranja in vpliv večkratnega spiranja in redispergiranja. Rezultati elektroforeze so pokazali, da z daljšim centrifugiranjem dosežemo boljše čiščenje in AuND z ožjo porazdelitvijo velikosti. Dodaten test z nižjimi obrati centrifuge je pokazal, da se pri tem prednostno separirajo težji delci. Ugotovili smo, da s centrifugiranjem in spiranjem odstranjujemo odvečne stabilizatorje, ki niso tesno vezani na površino AuND. S tem vplivamo tako na hidrodinamski radij kot na prosta mesta za vezavo SDS na površino AuND. Posledično smo s testiranjem z elektroforezo odkrili, da imajo vzorci od 6 do 9 daljšo pot toka. Najbolj izrazita pot je bila zaznana pri **vzorcu 7**, kjer smo dosegli izrazito črto, ki nakazuje tesen skupek AuND s podobno velikostjo. Na osnovi tega sklepamo, da optimalno čiščenje AuND dosežemo z daljšim časom centrifugiranja (> 40 min), pri visokih obratih (> 10.000 obr/min) in z manj koraki spiranja.



Slika 31: Rezultati elektroforeze AuND konjugata v testiranjih optimizacije čiščenja

Na osnovi opisanih poskusov in še dodatnih manjših optimizacij smo pripravili mehanizem (slika 32) konjugacije AuND, sintetiziranih z metodo USP in stabiliziranih s komplementarnimi stabilizatorji PVP K40, trinatrijevega citrata in saharoze.



Slika 32: Potek konjugacije AuND

## 7.4 Karakterizacija

### 7.4.1 UV-Vis

UV-Vis spektroskopija je tehnika, ki se uporablja za analizo elektronskih absorpcijskih spektrov molekul ali materialov v ultravijoličnem in vidnem območju elektromagnetnega spektra. Tehnika meri količino svetlobe, ki jo absorbira vzorec, kot funkcijo valovne dolžine in je zanesljiva tehnika za določanje absorpcijskega pasu in stopnje agregacije sintetiziranih nanodelcev. Meritve absorbančnega spektra pripravljenih suspenzij AuND so bile izmerjene s spektrofotometrom UV/VIS, Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Švica), z uporabo posebne mikroplošče, z naslednjimi parametri: volumen vzorca: 300  $\mu$ L, območje absorbance:  $\lambda = 400$  do 700 nm, št. utripa: 5 x.

Rezultati meritev so pokazali, da se je največja absorbanca pripravljenih suspenzij AuND pojavila pri 532 nm, kar kaže na stabilno stanje AuND. Barva suspenzije je bila temno vijolična. Značilen premik vrha na višje valovne dolžine [98] kaže na uspešno konjugacijo AuND z izbranimi biomolekulami.

### 7.4.2 Elektroforeza

Elektroforeza je laboratorijska tehnika, ki se uporablja za ločevanje in analizo makromolekul glede na njihovo velikost, obliko in električni naboj. Pri gelski elektroforezi se vzorec naloži na gelsko matriko, običajno iz agaroze ali poliakrilamida, in nato izpostavi električnemu polju. Molekule se premikajo skozi matriko gela z različnimi hitrostmi glede na njihovo velikost in naboj, ločitev je vidna kot različni pasovi v gelu, katerih položaj je sorazmeren z velikostjo in nabojem molekul.

Poskusi elektroforeze so bili izvedeni s PhastSystemom (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska), napravo za elektroforezo, v standardnem 0,3 % agaroznem gelu, 125 x TAE pufersko raztopino pri električnem diferencialu 180 V. Poskusi so potekali 15 min. Izbranim vzorcem smo dodali 1 % SDS, ki omogoča zanesljivo ločbo nekonjugiranih in konjugiranih AuND znotraj metode (slika 25).

### 7.4.3 Preizkus funkcionalnosti konjugata AuND

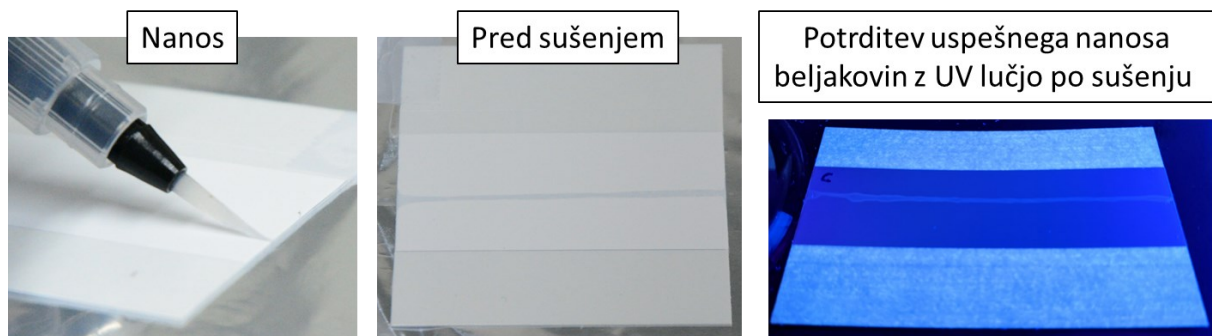
Za končno potrditev funkcionalnosti smo koristili praktični preizkus delovanja testa, kjer smo vrednotili vezavo konjugata AuND @ AR IgG na kontrolno linijo z zajčjimi protitelesi proti človeškemu IgG (specifični za Fc domeno).

#### 7.4.3.1 Priprava konjugatne blazine

Suspenzijo konjugata AuND in protitelesi na zajčji IgG z optično gostoto 1 (absorbanca 1) smo npršili na komercialno dostopno stekleno konjugatno blazino (GFDX103000, Glass fiber diagnostic pad, EMD Millipore, izdelano na Finskem), s koncentracijo nanosa  $30 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ , ki smo jo naknadno sušili pri  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  4 h.

#### 7.4.3.2 Priprava kontrolne črte

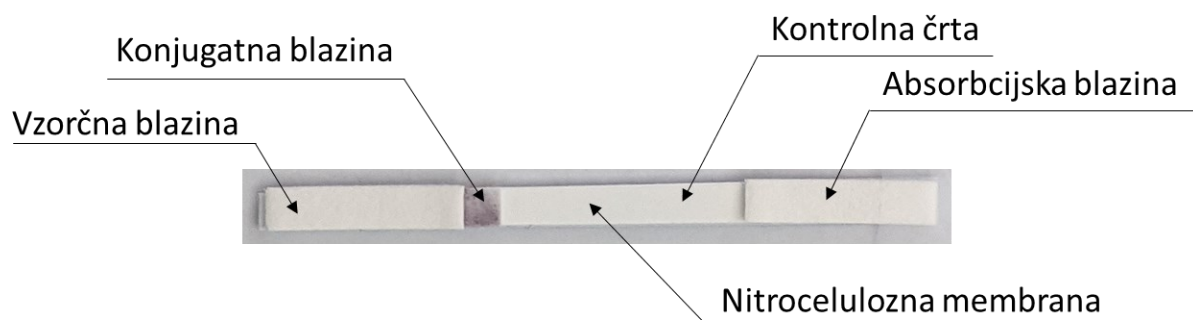
Kontrolno črto ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) smo ročno nanesli na nitrocelulozno membrano z uporabo silikonskega čopiča (Koi Water Brush #2, Sakura Color Products Corp., Osaka, Japonska, velikost: majhna) (slika 33). Koncentracija končnega nanosa je bila  $0,1 \mu\text{L}/\text{mm} \pm 0,1 \mu\text{L}$ . Membrane smo naknadno sušili pri  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  2 h.



Slika 33: Nanos kontrolne linije

#### 7.4.3.3 Sestava poskusnega testa

Konjugatno blazino in kromatografsko membrano smo sestavili skupaj z dodatno celulozno vzorčno in absorpcijsko blazino (slika 34) (CFSP173000 Cellulose fiber sample pads, EMD Millipore, izdelano v ZDA). Tako pripravljene lističe smo vstavili v kaseto. Za preizkus funkcionalnosti hitrega testa smo na vzorčno blazino dodali  $75 \mu\text{L}$  PBS.



Slika 34: Sestavljen poskusni LFIA listič hitrega testa



#### 7.4.4 SIMS

Metoda SIMS (sekundarna ionska masna spektrometrija) je analitična tehnika, ki se uporablja za karakterizacijo kemijske sestave trdnih površin in tankih filmov. Deluje tako, da površino vzorca obstreljuje s snopom visokoenergijskih ionov, kar povzroči izmet sekundarnih ionov s površine. Ti sekundarni ioni se nato zberejo in analizirajo z uporabo masnega spektrometra, ki loči ione na podlagi njihovega razmerja med maso in nabojem. Z merjenjem mase sekundarnih ionov, ki se izločijo s površine, lahko metoda SIMS identificira kemijske elemente, ki so prisotni v vzorcu, in njihovo relativno številčnost. Te informacije je mogoče uporabiti za posredno preučevanje sestave in strukture materialov ter za razumevanje površinskih kemijskih reakcij in procesov [180].

Za določitev kemijske sestave AuND konjugata po posameznih stopnjah konjugata smo analizirali tri izbrane vzorce suspenzij (poimenovani kot Vz5, Vz6 in Vz7). Pri tem so bili uporabljeni trije različni stabilizatorji in pufrska raztopina PBS, kot je prikazano v Preglednica 11.

Za izvedbo analize SIMS smo stabilizatorje (PVP, trinatrijev citrat, saharoza) raztopili z majhno količino demineralizirane vode, medtem ko so bili vzorci AuND konjugata v suspenziji. Kapljico vsakega vzorca suspenzije smo nanесли na Si substrat in jih 24 h pustili sušiti v eksikatorju.

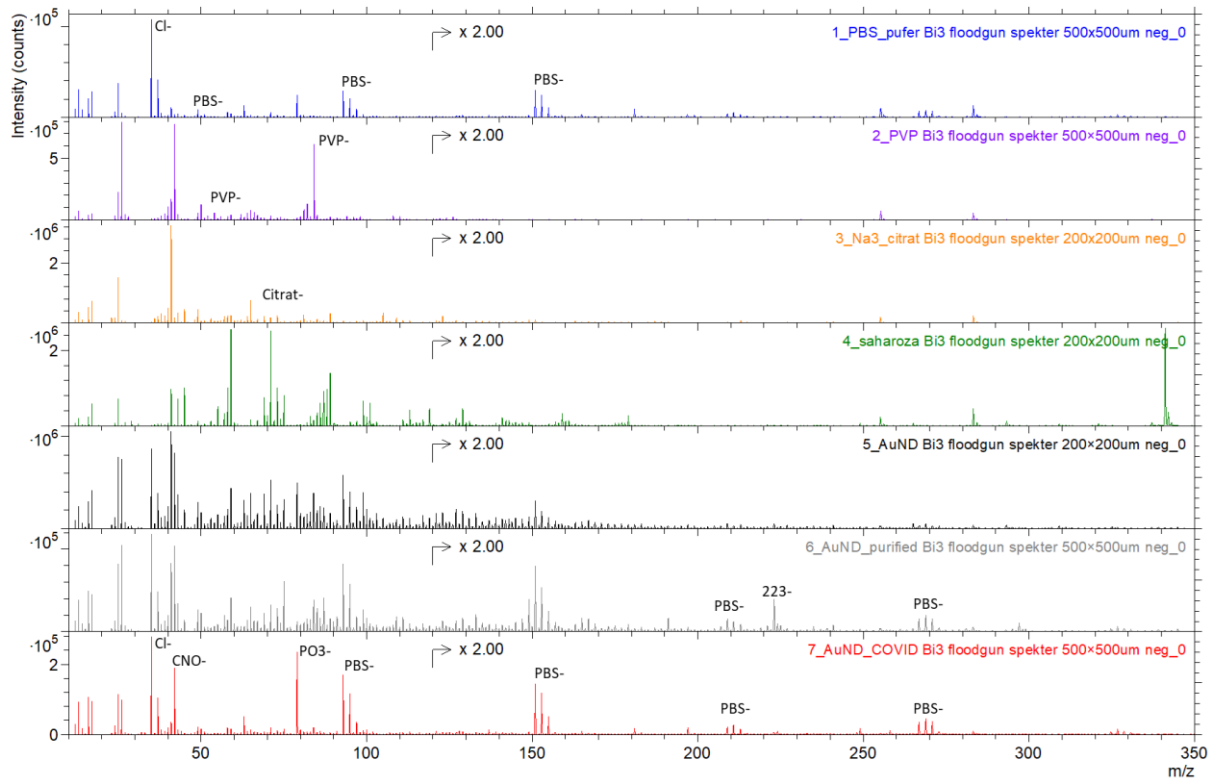
Preglednica 11: Seznam vzorcev, analiziranih z metodo SIMS

Št.	Vzorec
Vz1	PBS
Vz2	PVP
Vz3	Trinatrijev citrat
Vz4	Saharoza
Vz5	AuND + (PBS/PVP/Citrat/Saharoza)
Vz6	Prečiščeni AuND + (PBS/PVP/Citrat/Saharoza)
Vz7	AuND + (PBS/PVP/Citrat/Saharoza) konjugirani s SARS-CoV-2 S1 (ak 1-681)

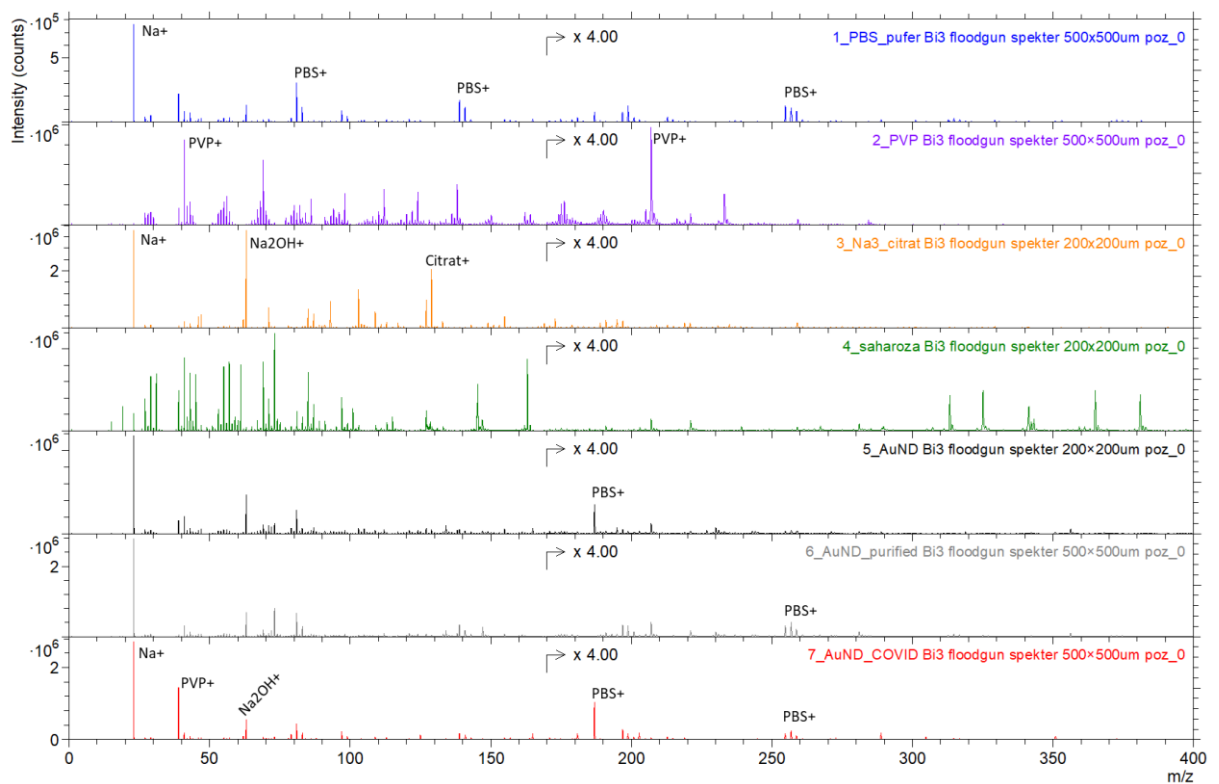
Na slikah 35 in 36, so prikazani spektri vseh izbitih sekundarnih ionov. Iz dobljenih spektrov SIMS lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Vsak korak čiščenja (kot je opisan na sliki 32) odstrani večjo količino PVP in citrata, kar je razvidno, če primerjamo spektre Vz5, Vz6 in Vz7 (osnovo za primerjavo predstavljajo spektri Vz 1-4).
- Prvi korak čiščenja odstrani večino saharoze, kar nakazuje primerjava spektrov Vz5 in Vz6.

- V Vz6 je bili zaznan nov signal negativnega izbitega iona z maso 223, za katerega ni podatkov v bazah. Zаметke signala z isto maso je mogoče zaslediti v vzorcu saharoze, iz česar sklepamo, da so to po vsej verjetnosti nečistoče degradirane saharoze.
- Signal 223 skoraj popolnoma izgine v Vz7.
- Kljub ponavljajočim korakom čiščenja, ki so potrebni za uspešno konjugacijo, so bili na osnovi negativnih izbitih inonov ( $\text{CNO}^-$ ) identificirani ostanki PVP tudi v Vz7.
- V Vz7 smo zasledili ostanke natrijevega citrata kot signal izbitih pozitivnih ionov ( $\text{Na}_2\text{OH}^+$ ).
- Prisotnost ostankov PVP in citrata v Vz7 nakazuje, da je v tem vzorcu možno izvesti konjugacijo.
- Ponavljajoči koraki čiščenja povzročijo višanje koncentracije PBS.



Slika 35: Spektri SIMS negativnih sekundarnih ionov, m/z področje 10–350



Slika 36: Spektri SIMS pozitivnih sekundarnih ionov, m/z področje 0–400

### 7.4.5 XPS

Metoda XPS (rentgenska fotoelektronska spektroskopija) je tehnika površinske analize, ki omogoča vpogled v informacije o elementarni sestavi in kemijskem stanju najvišjih plasti materiala. Deluje tako, da se vzorec obseva s snopom rentgenskih žarkov, kar povzroči izmet značilnih fotoelektronov s površine materiala. Te se zbere in analizira s spektrometrom, ki meri njihove kinetične energije, kar določa njihove vezavne energije. Energije vezave fotoelektronov so specifične za elemente in kemijska stanja atomov, iz katerih izvirajo, zaradi česar je XPS koristno orodje za kemično karakterizacijo površin. Z merjenjem veznih energij fotoelektronov lahko XPS identificira kemične elemente in njihova oksidacijska stanja na površini vzorca [181].

V ta namen smo na napravi PHI-TFA XPS (Physical Electronics Inc ZDA) izvedli površinske analize. Spektrometer je bil opremljen z Al-monokromatskim virom. Analizirano območje je bilo premera 0,4 mm, analizirana globina pa približno 3–5 nm. Kapljevinske vzorce smo nanесли na Si substrat, naknadno smo jih posušili v eksikatorju, analizirali smo suhi ostanek.

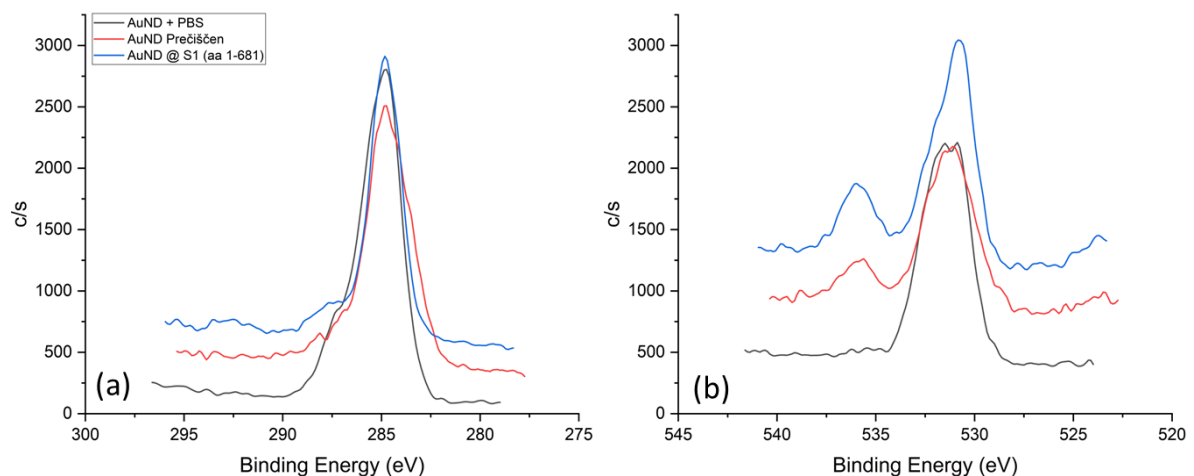
XPS smo uporabili za določitev kemijske sestave oziroma stanja površine AuND. Za pridobitev boljše primerjave spektrov smo analizirali tudi stabilizatorje, ki so prisotni skupaj z AuND v konjugatu. Za preiskave smo uporabili vzorce, pripravljene po enakem postopku kot v primeru analize SIMS – Preglednica 11.

Pri tem smo se osredotočali na stabilizirane AuND (Vz5), prečiščene AuND, pripravljene za konjugacijo (Vz6), in konjugirane AuND (Vz7). Vzorci so bili pripravljene po postopku, prikazanem na sliki 32, nanešeni na Si substrat in posušeni. Izmerjena kemijska sestava površine v atomskih deležih je vidna na Preglednica 12. Pri vseh vzorcih, kjer smo uporabili PBS, je bila identificirana prisotnost Na, P, in Cl, tako da njihova koncentracija zaradi večkratnih korakov čiščenja narašča. Signal Si je povezan z uporabo Si substrata, ki izvira iz nosilca vzorca.

Preglednica 12: Seznam vzorcev, analiziranih z XPS skupaj s površinsko sestavo v at. %

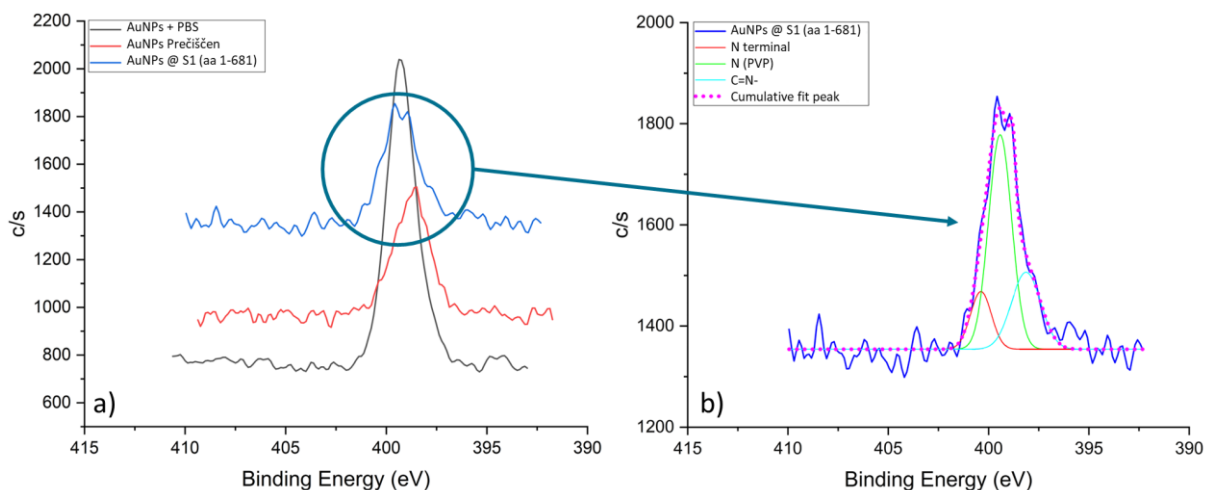
Št.	Vzorec	Delež v at. %							
		C1s	N1s	O1s	Na1s	Si2p	P2p	Cl2p	Au4f
Vz5	AuND + (PBS/PVP/citrat/saharoza)	67,0	3,1	24,5	2,6	1,0	0,4	1,3	0,2
Vz6	prečiščeni AuND + (PBS/PVP/citrat/saharoza)	61,3	1,2	18,3	4,9	3,8	0,1	10,2	0,2
Vz7	AuND + (PBS/PVP/citrat/saharoza) konjugirani s SARS-CoV-2 S1 (ak 1-681)	51,0	2,7	19,9	10,1	1,3	3,1	11,3	0,3

Ključno za razumevanje mehanizma konjugacije med AuND in izbranimi proteini je bilo spremljanje spektrov C1s, N1s, O1s in Au4f. V primeru spektrov C1s (slika 37) pri neprečiščenih AuND (Vz5) ti izkazujejo vrh pri 284,8 eV. Ta signal je primerljiv s signalom naključnega ogljika (284,8 eV) [182], ki se ga pogosto zazna na vzorcih med XPS analizo. O1s spekter neprečiščenih in prečiščenih AuND izkazuje izrazit vrh pri 531,4 eV, ki sovpada z O1s spektrom, ki je tipičen za kisik (C=O), vezan v PVP, in kisik (C=O, C-O<sub>1s</sub>-H), vezan v citratu [183], [184]. V primeru konjugiranih AuND je viden zamik vrha k nižji energiji 530,8 eV, kar nakazuje na povišan delež C-O<sub>1s</sub>-H vezi [185].



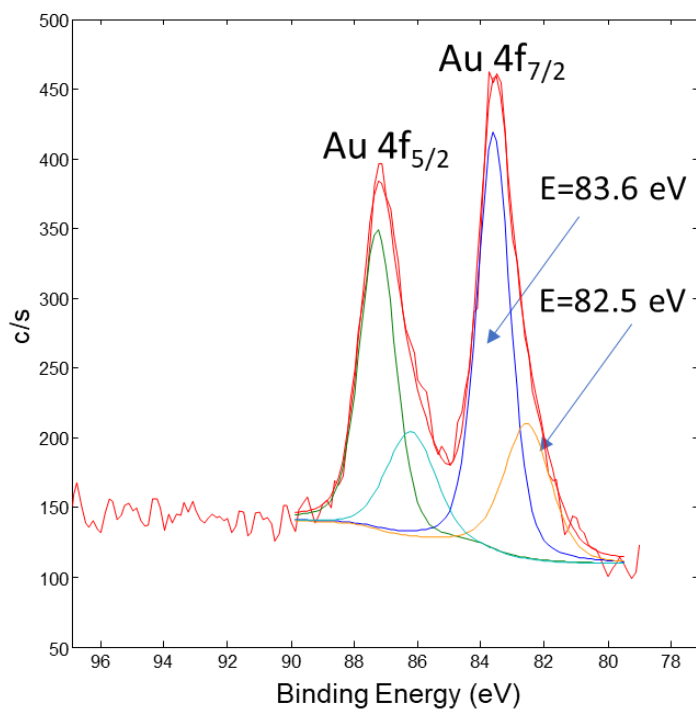
Slika 37: HR XPS spekter C1s (a) in O1s (b)

V primeru spremljanja N1s vrha na sliki 38 (a), je v primeru neprečiščenega vzorca moč opaziti izrazit oster vrh pri 399,4 eV, kateri je skladen s signalom dušika v PVP (399,9 eV [121], [183]). Intenzivnost in ostrina vrha nam nakazujeta, da v tem vzorcu prevladuje PVP. Po prvem koraku čiščenja opazimo opazen padec v intenzivnosti signala in zamik vrha k 398,5 eV, kar je mogoče pripisati C=N-H skupini [183], [186]–[188]. Predpostavljamo, da se poleg odstranitve odvečnega PVP med postopkom čiščenja dogajajo stranske reakcije odpiranja pirolidonskega obroča. V primeru konjugiranega vzorca, intenzivnost N1s signala ponovno naraste in zaznamo dvojni vrh. S statistično obdelavo tega vrha "ang. fitting", prikazan je na sliki 38 (b), lahko izluščimo 3 sestavne komponente vrha. Dominantni signal pri 399,4 eV je še vedno moč pripisati dušiku v pirolidonskem obroču PVP-ja. Dodatno lahko zaznamo stransko komponento ostankov C=N- pri 398,2 eV. To lahko pripišemo kot ostanek postopka čiščenja proizvajalca dobavljenih proteinov [188]. Ključno smo pa zaznali signal pri 400,4 eV, ki sovpada s signalom N-konca oz. peptidne vezi [183], [186], [188].



Slika 38: HR XPS spekter N1s (a) in pomerjen HR spekter N1s konjugiranega vzorca (b)

Pomerjanje Au4f spektra na sliki 39 ustreza dvema vrhovoma, kjer prvi vrh Au  $4f_{7/2}$  pri 82,5 eV, ustreza površinskim Au-vezem, z relativnim deležem 31 %. Drugi vrh Au  $4f_{7/2}$  je pri 83,6 eV ter ustreza kovinskemu jedru AuND.



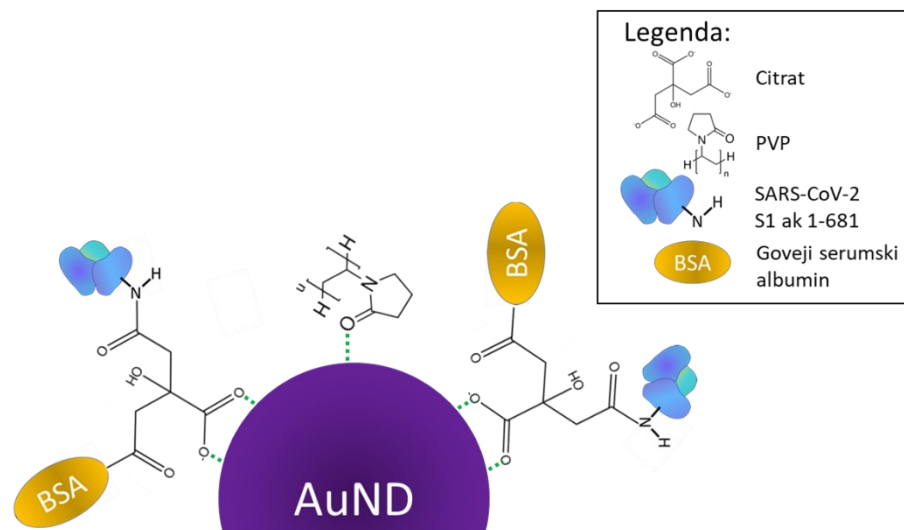
Slika 39: HR XPS spekter Au4f

## 7.5 Mehanizem konjugacije AuND

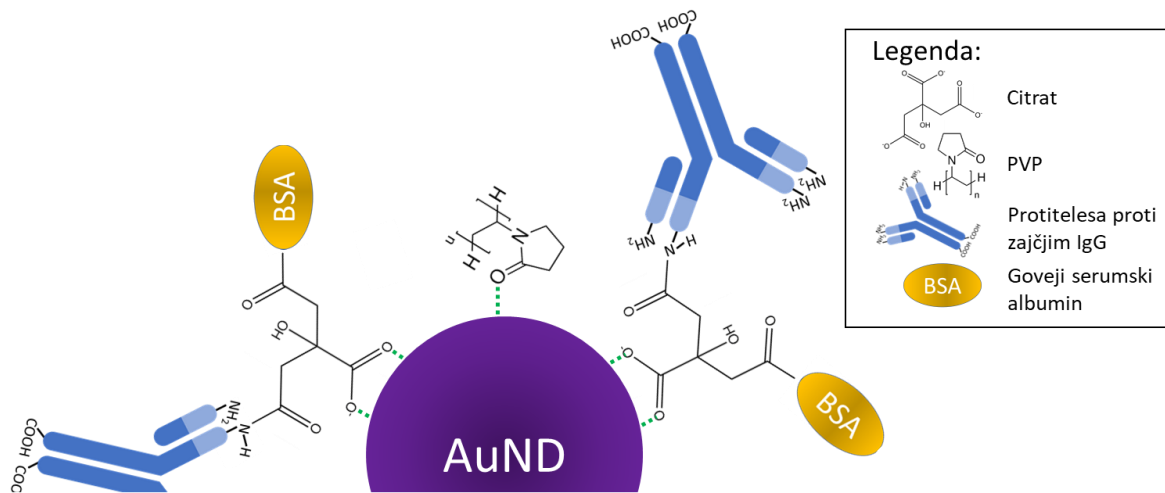
Skladno z rezultati analize SIMS, ki izkazujejo ostanek PVP in citrata na dokončno konjugiranih nanodelcih, ter s pridobljenimi XPS spektri vezavnih energij predpostavljamo, da konjugacija AuND poteka po naslednjem postopku:

1. Predhodno čiščenje suspenzije AuND odstrani odvečno saharozo in nevezan PVP ter citrat.
2. Dodatek boratnega pufru dvigne pH raztopine in s tem stabilizira obliko proteinov [148], [189], [190] in stabilnost AuND.
3. Z dodatkom proteinov suspenziji AuND te tvorijo peptidne vezi prek svojih N-koncev, kjer so nevezane aminske ( $-NH_2$ ) skupine, na proste karboksilne ( $-COOH$ ) skupine citrata, ki je vezan na površino AuND.
4. Naknaden dodatek presežka BSA takoj po reakciji in vsakič po čiščenju zapolni vsa prosta mesta, kjer bi se lahko vezali drugi proteini.

V doktorski nalogi je specifična vezava lovilnih proteinov SARS-CoV-2 S1 ak 1-681 (slika 40) in protitelesi na zajčji IgG (slika 41) potekala preko peptidne vezi, ki se tvori med citratom, ki je koordiniran na površino AuND in N-koncem proteina. Prosta mesta, ki niso bila zasedena bodisi zaradi premajhne koncentracije lovilnih proteinov ali premajhne afinitete, smo zapolnili z dodatkom presežka BSA. S tem smo "zaščitili" AuND konjugat pred nespecifičnimi vezavami z drugimi biomolekulami.



Slika 40: Konjugacija AuND s SARS-CoV-2 S1 ak 1-681



Slika 41: Konjugacija AuND s protitelesi na zajčji IgG

## 8 KLINIČNA ŠTUDIJA

Z namenom dokončne potrditve in pridobitve podatkov o funkcionalnosti naših testov smo izvedli praktičen preizkus testov znotraj klinične študije. Raziskavo, vodeno pod številko **0120-148/2021/3**, je 23. 4. 2021 odobrila Komisija za medicinsko etiko RS. Za klinična testiranja smo izdelali serijo 200 hitrih testov.

### 8.1 Optimizacija in sestava

Za sestavo poskusnih hitrih testov smo koristili komercialno dostopne membrane in kasete. Seznam uporabljenih komponent je prikazan v Preglednica 13. Izbrali smo komponente, ki so zagotavljale najdaljši možni čas poteka reakcije, s čimer smo želeli zagotoviti zadosten čas za uspešen potek reakcij in sprostitve AuND.



Preglednica 13: Seznam komponent, uporabljenih v hitrem testu

Ime	Material	Šifra	Proizvajalec	Država porekla	Tržno ime
Vzorčna blazina	celuloza	CFSP173000	EMD Millipore	ZDA	Cellulose fiber sample pads
konjugatna blazina	poliester	6614	Ahlstrom-Munksjö	ZDA	Pretreated polyester conjugate pads
konjugatna blazina	steklena vlakna	GFDX103000	EMD Millipore	Finska	Glass fiber diagnostic pad
filtrirna membrana		1668 (HV+)	Ahlstrom-Munksjö	ZDA	Cytostep Plasma separation pads
kromatografska membrana	nitroceluloza na PVC kartici	HF180MC100	EMD Millipore	ZDA	Hi-Flow™ Plus 180
absorbcijska blazina	celuloza	CFSP173000	EMD Millipore	ZDA	Cellulose fiber sample pads
kaseta	polistiren	JY-C103 A3	Biotem	Francija	Empty LFIA cassettes

### 8.1.1 Optimizacija

V eksperimentalnem delu smo zaznali visoko afiniteto oznak AuND na steklena vlakna, saj je bilo doseženo le omejeno sproščanje AuND. Zamenjava za inertnejšo polimerno membrano je to omejitev popolnoma izničila. Za doseg krajšega časa sproščanja AuND smo testirali različne kombinacije obdelave konjugatne blazine. V ta namen smo konjugatne blazine za 2 min pomočili v različne raztopine, ki so predstavljene v Preglednica 14. Omočene konjugatne blazine smo na stekleni plošči sušili 4 h v ventilacijski pečici pri 36 °C. Na posušene blazine smo napršili suspenzijo konjugata AuND in protitelesi na zajčji IgG, da bi dosegli obarvanje kontrolne črte, s koncentracijo nanosa 30  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . Temu je ponovno sledil postopek sušenja pri 35 °C za 4 h. Cilj optimizacije je bil določiti vpliv posamičnih komponent in njihovih kombinacij na stopnjo sproščanja, hitrost sproščanja AuND in na hitrost poteka testa.

Za optimizacijo smo koristili naslednje spojine:

- BSA – za stabilizacijo konjugata, saj blokira nespecifično vezavo in lahko deluje kot dodaten pufer.
- Saharoza – za stabilizacijo posušjenih AuND konjugatov. Ko je saharoza prisotna v konjugirani blazinici, pomaga ohranjati vsebnost vlage in preprečuje izsušitev blazinice. To je pomembno za pravilno delovanje in potek hitrega testa LFIA, saj lahko sušenje ali zamašitev blazinice ovira gibanje vzorca.
- Triton X-100 – ali oktilfenol etoksilat je neionsko površinsko aktivno sredstvo, ki izboljša disperzijo in topnost konjugata ter lahko omejuje nespecifično vezavo.

- Tween 20 – ali polisorbat 20 je neionsko površinsko aktivno sredstvo, ki lahko izboljša disperzijo konjugata ter preprečuje nespecifične interakcije in lahko pripomore k lažjemu toku vzorca, saj zniža površinsko napetost kapljevine.
- Vsakemu testu smo za začetek poskusa dodali 75  $\mu$ L PBS.

Preglednica 14: Seznam raztopin za modifikacijo konjugatne blazine

Vzorec	BSA [w%]	Saharoza [w%]	Triton X-100 [w%]	Tween 20 [w%]
Blok 1		20		
Blok 2				
Blok 3	20		3	
Blok 4	20	20	3	
Blok 5	20	20	3	3
Blok 6		20	3	3
Blok 7	20	20		
Blok 8	20		3	3
Blok 9	20	20		3
Blok 10	20			3
Blok 11			3	
Blok 12				3
Blok 13		20	3	
Blok 14		20		3
Blok 15			3	3
Blok 16	20			
Blok 17	10	10	1,5	
Blok 18	10	10	1,5	1,5
Blok 19	10	10		
Blok 20	10	10		1,5

Za ovrednotenje vpliva modifikatorjev konjugatne blazine smo beležili čas od dodatka pufra do sprostitve AuND in obarvanja kontrolne črte. Rezultati poskusov so zabeleženi v Preglednica 15.

Preglednica 15: Vpliv modifikacije konjugatne blazine na čas sproščanja oznak in na čas do obarvanja kontrolne linije

Vzorec	t potovanje oznake je vidno na testnem področju [s]	t kontrolne linija se je začela obarvati [s]	t kontrolna linija je popolnoma obarvana [s]
Blok 1	46	Oznaka se je ustavila na kromatografski membrani	
Blok 2	Oznaka se ni sprostila		
Blok 3	37	Oznaka se je ustavila na kromatografski membrani	
Blok 4	42	Oznaka se je ustavila na kromatografski membrani	
Blok 5	14	130	290
Blok 6	30	446	753
Blok 7	Ni vidna	168	252
Blok 8	21	128	277
Blok 9	24	101	163
Blok 10	34	459	965
Blok 11	Ni vidna	157	348
Blok 12	31	352	471
Blok 13	Ni vidna	92	118
Blok 14	Ni vidna	128	413
Blok 15	9	77	139
Blok 16	25	110	178
Blok 17	Ni vidna	186	272
Blok 18	Ni vidna	101	171
Blok 19	Oznaka se ni sprostila		
Blok 20	28	320	714

Iz dobljenih rezultatov merjenja časa do začetka toka oznak iz konjugatne membrane in do obarvanja kontrolne črte lahko razberemo, da je za dobro omočitev in najhitrejšo sprostitvev konjugata ključna prisotnost saharoze, Triton x-100 in Tween 20.

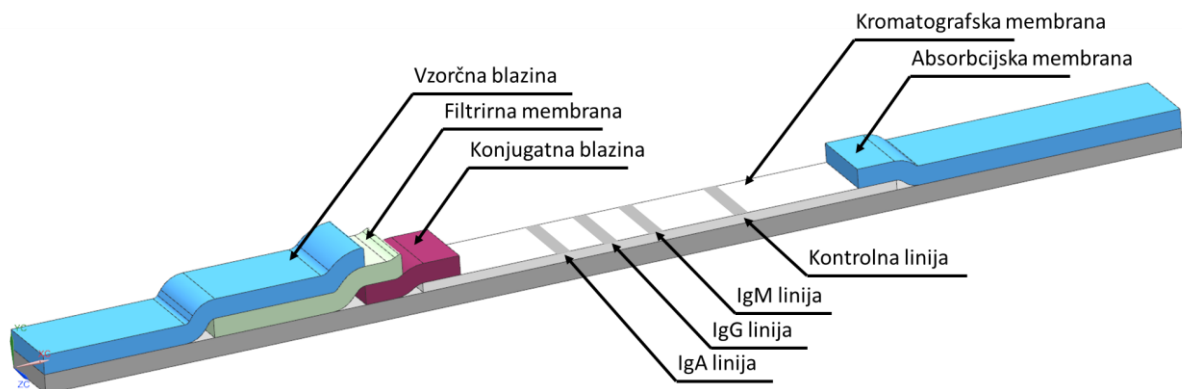
Uporaba samo BSA omogoča hitro in popolno sprostitvev, medtem ko uporaba izključno saharoze ne zagotavlja učinkovite sprostitve AuND.

Na osnovi optimizacije smo kot končno formulacijo raztopine za modifikacijo konjugatih blazin predpostavili naslednjo kombinacijo raztopin: 10 % BSA, 10 % saharoze in 1,5 % Tween 20. Optimizirana kombinacija zagotavlja dobro stabilnost, 100 % omočljivost in sprostitvev AuND konjugata, pri čemer znaša reakcijski čas 10 min, ki zagotovi potek vseh reakcij.

### 8.1.2 Sestava

Končne hitre LFIA teste (slika 42) smo sestavili iz:

- celulozne vzorčne membrane ( $17 \times 4$  mm),
- filtrirne membrane ( $10 \times 4$  mm) – za filtracijo rdečih krvničk od seruma,
- modificirane konjugatne blazine ( $5 \times 4$  mm), na katero se nprši s koncentracijo  $30 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  suspenzija konjugata SARS-CoV-2 S1 in protitelesni na zajčji IgG,
- nitrocelulozne kromatografske membrane, na katero se nanese protičloveški IgA (testna linija za IgA), protičloveški IgG (testna linija za IgG), protičloveški IgM (testna linija za IgM) in protičloveški IgG – pridobljen v zajcu (Kontrolna linija).
- Celulozne absorpcijske membrane ( $17 \times 4$  mm).



Slika 42: Shematski prikaz sestave LFIA lističa

## 8.2 Izvedba testiranja

V raziskavo smo vključili 60 pacientov, ki so se zdravili v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor. Večino bolnikov smo povabili v raziskavo v Urgentnem centru. Preostali bolniki so bili hospitalizirani na oddelkih. Vključitveni kriteriji so bili: starost 18 let ali več, klinični znaki okužbe s SARS-CoV-2 in soglasje za sodelovanje v študiji.

Potem ko smo bolnikom razložili postopke in so podpisali soglasje, jim je izkušena zdravstvena delavka opravila dva brisa nosne sluznice in odvzela kapljo krvi.

En vzorec sluznice smo poslali na PCR testiranje na Nacionalni inštitut za javno zdravje. Preostala vzorca smo testirali z LFIA hitrim testom.

Po 10 minutah sta dve zdravstveni delavki ocenili rezultate testa. Na testu so se lahko obarvale štiri črte: kontrolna črta, IgG, IgA in IgM. Če se kontrolna črta ni obarvala, smo rezultat označili za nepoveden. Zaradi morebitnega dodatnega nadzora smo vsak test slikali.

Zaradi velike prekuženosti in precepljenosti prebivalstva smo smatrali, da je rezultat testa pozitiven, če sta se obarvali dve ali tri črte ali ena izmed črt IgA ali IgM.

### 8.3 Rezultati klinične študije

Rezultate testov sluznice in seruma smo primerjali z rezultati PCR, ki omogoča zaznavo virusne RNA. Na podlagi rezultatov smo izračunali občutljivost, specifičnost, negativno in pozitivno napovedno vrednost.

V raziskavo smo vključili 60 bolnikov. Pri enem bolniku je bil rezultat seruma in pri enem rezultat sluznice na LFIA nepoveden. V končni analizi smo upoštevali 59 bolnikov. Razporeditev rezultatov na testih prikazuje Preglednica 16.

Preglednica 16: Rezultati na LFIA testih.

	Sluznica	Serum
<b>Nepoveden rezultat</b>	1	1
<b>negativen rezultat</b>	3	7
<b>IgG</b>	30	30
<b>IgM</b>	/	2
<b>(IgG in IGA/IgM)</b>	17	17
<b>(IgG/IgA/IgM)</b>	9	3
<b>Skupaj</b>	60	60

Občutljivost, specifičnost, negativna in pozitivna napovedna vrednost so prikazane v Preglednica 17.

Preglednica 17: Občutljivost testa

	Sluz	Serum
Občutljivost	83 %	83 %
Specifičnost	66 %	74 %
Negativna napovedna vrednost	94 %	95 %
Pozitivna napovedna vrednost	38 %	45 %

S klinično raziskavo smo standardizirali in validirali nov hitri test na protitelesa za SARS-CoV-2. Naši rezultati kažejo, da ima test dobro občutljivost in zadovoljivo specifičnost ter odlično negativno napovedno vrednost.

Pred kratkim je Dinnes s sod. [191] opravil meta analizo 152 študij, ki so preverjale občutljivost in specifičnost 42 hitrih antigenskih testov. Študije so bile opravljene v različnih okoljih npr. testirnih centrih, zdravstvenih domovih in bolnišnicah. Rezultati metaanalize so pokazali, da je povprečna občutljivost 72,8 % (95 % interval zaupanja: 69,1 to 76,2). Opisali so tudi, da na občutljivost testov vpliva več dejavnikov. Občutljivost testov je višja pri simptomatskih bolnikih, pri necepljenih in z dobrim imunskim odzivom. Po drugi strani so bili testi slabo občutljivi za bolnike, ki so jih testirali na dan okužbe [192]. V primerjavi z omenjeno študijo je občutljivost našega testa bistveno višja.

Glavna omejitev našega testa je nizka specifičnost v primerjavi s povprečno specifičnostjo v prej omenjeni metaanalizi (99,6 % (95 % interval zaupanja: 99,1 to 99,9)) [191]. Veliko število pozitivnih testov na IgG je lahko posledica prekuženosti in precepljenosti prebivalstva. IgG protitelesa so lahko prisotna še 15 mesecev po okužbi s SARS-CoV-2 [171]. Po drugi strani je namen testa dosežen z visoko negativno napovedno vrednostjo, ki pomeni, da bolnik, ki je na testu negativen, ni okužen z virusom.

V primerjavi z drugimi testi ima naš test določene prednosti. Omogoča natančnejšo diagnostiko in spremljanje okužbe, ker zaznava posamezna protitelesa, ki se spreminjajo s časom od okužbe. Večina komercialnih testov ne loči med posameznimi protitelesi. Večina testov za detekcijo protiteles uporablja kombinacijo IgG in IgM, kar smo upoštevali pri naših izračunih. Uporabnik lahko vidi le, ali je test pozitiven ali negativen. Zaradi svoje visoke negativne napovedne vrednosti zagotavlja, da bolniki z negativnim rezultatom niso okuženi s SARS-CoV-2.

Test je torej pripravljen za uporabo, vendar ga bo v prihodnosti treba prilagoditi tudi na nove seve virusa [193]. Uporaba alternativnih lovilnih molekul, kot je npr. fragment N virusa SARS-CoV-2, bi potencialno lahko izločil signal precepljenosti, saj so cepiva tarčno zasnovana za S domeno virusa.

## 9 SKLEPI

Cilj doktorske disertacije je bil potrditi hipotezo, da je možno pripraviti AuND z uporabo USP, tako da bodo uspešno delovali v LFIA testu kot oznake za potrditev potencialne prisotnosti protiteles bolezni covid-19. Na osnovi opravljenih raziskav in dobljenih rezultatov lahko povzamemo naslednje sklepe:

1. USP sinteza zlatovega (III) klorida s koncentracijo 0,5 g (Au)/L rezultira v nastanku okroglih AuND z velikostjo okoli 50 nm in z ozko porazdelitvijo velikosti v razponu  $\pm 10$  nm.
2. AuND imajo skozi celotno pH območje nizek površinski naboj od 2,4 mV pri pH 2 do 5 mV pri pH 11, kar zahteva uporabo stabilizatorjev za njihovo dolgoročno stabilnost.
3. Stabilizacija AuND z uporabo vodotopnih polimerov PEG in PVP kaže odvisnost od njihove molekulske mase, višja kot je ta, boljša stabilizacija je dosežena. Posledično se je kot najuspešnejši stabilizator izkazal PVP K40.
4. Liofilizacija AuND poteka v treh fazah: zamrzovanje pri  $-40$  °C 4 h; primarno sušenje  $+20$  °C 12 h, 1–4 Pa; in sekundarno sušenje:  $+30$  °C 33 h, 1–4 Pa.
5. Liofilizacija z uporabo kriostabilizatorjev v sestavi in s koncentracijo: PVP K40 s 2,5 g/L, trinatrijev citrat s 0, 1 g/L in saharoza, z 1 g/L omogoča doseganje najvišje stabilnosti posušenih AuND.
6. Poskusi konjugacije so pokazali, da ima površina AuND afiniteto na nespecifično vezavo proteinov.
7. Za izboljšanje konjugacije AuND je potrebna uporaba trinatrijevega citrata.
8. UV-Vis spektroskopija je odkrila, da imajo uspešno konjugirani AuND vrh spektra pri 538 nm, kar predstavlja zamik spektra v primerjavi z nekunjugiranimi AuND.
9. Dodatek SDS na površini AuND ustvari negativni naboj, s čimer je mogoče potovanje AuND skozi gel v poskuse elektroforeze.
10. Poskus gelske elektroforeze je posredno potrdil uspešno konjugacijo AuND s protitelesi na zajčji IgG, saj je ustvaril daljšo sled v gelu. To je po vsej verjetnosti posledica vezave dodatnih molekul SDS na proteine protiteles na zajčji IgG v konjugatu AuND.
11. Optimalen postopek čiščenja AuND konjugata poteka pri naslednjih pogojih:  $4$  °C, 10.000 obr/min, čas centrifugiranja 40 min.

12. Analiza SIMS je odkrila, da čiščenje AuND konjugata odstrani večinski delež saharoze, medtem ko se vsebnosti PVP in citrata ohranita. Na osnovi tega sklepamo, da sta PVP in citrat dobro vezana na površino AuND.
13. XPS analiza AuND konjugata je potrdila prisotnost značilnih O1s in N1s vrhov, dušika iz PVP in karboksilnega kisika iz citrata na neprečiščenih in prečiščenih vzorcih.
14. Primerjava N1s XPS spektrov neprečiščenih in prečiščenih AuND v primerjavi z konjugiranim AuND je razkrila tvorbo dveh zakritih vrhov spektrov in prisotnost štirih podvrhov:
  1. 399,41 eV dušik v pirolidonskem obroču PVP, 2. C=N- pri 398,16 eV 3. C≡N pri 398,83 eV in 4. 400,36 eV, ki ustreza signalu N-konca oz. peptidne vezi.
15. Mehanizem konjugacije AuND z antigenom SARS-CoV in s protitelesi na zajčji IgG je naslednji: (i) med stabilizacijo se na površino AuND vežejo citratni ioni, ki se ohranijo skozi vse postopke sušenja in čiščenja. (ii) Dvig pH na 7,5 in dodatek proteinov v AuND suspenzijo omogoči, da se te prek svojega prostega N-konca vežejo na prosto karboksilno vez citrata, ki je na površini AuND. (iii) Nastane peptidna vez.
16. Med delovanjem hitrega LFIA testa imajo nastali konjugati AuND visoko afiniteto za vezavo s steklenimi vlakni v konjugatni blazini, zato je treba uporabiti polimerne konjugatne blazinice.
17. Modifikacijo konjugatne blazine je možno izvesti z omočenjem z različnimi raztopinami BSA, saharozo in površinsko aktivnimi snovmi (TWEEN 20 in Triton X-100). Na ta način je mogoče optimirati čas poteka hitrega LFIA testa v razponu od 2 min do 15 min.
18. Konjugatne blazine je možno modificirati z uporabo PBS raztopine 10 % BSA, 10 % saharoze in 1,5 % Twee, tako da je dosežen reakcijski čas hitrega testa 10 min.
19. Test za zaznavo protiteles za SARS-CoV-2, pripravljen na osnovi AuND, dosega dobro mero občutljivosti 83 %, vendar nizko specifičnost med 66 % in 74 %.

### **Nadaljnje raziskovalno delo**

Razvit postopek konjugacije AuND s ciljnim proteini v okviru te doktorske disertacije bi lahko bil prenosljiv na druge proteine, kar bi omogočilo uporabo naših AuND za zaznavo različnih analitov.

AuND, sintetizirani z metodo USP, izkazujejo nizek površinski naboj in visoko površinsko afiniteto do nespecifične vezave s proteini, polimeri in manjšimi molekulami. Ta lastnost AuND, omogoča z uporabo izbranih povezovalnih molekul ciljno vezavo izbranih spojin. S tem smo postavili nove možnosti za razvoj in raziskave na področju farmacije in kozmetike.



## 10 LITERATURA

- [1] D. Wild, R. John, C. Sheehan, S. Binder, and J. He, *David Wild Eds. The Immunoassay Handbook. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques 2013 (3) - Copy*.
- [2] P. Moitra *et al.*, “Selective Naked-Eye Detection of SARS-CoV-2 Mediated by N Gene Targeted Antisense Oligonucleotide Capped Plasmonic Nanoparticles,” *ACS Nano*, vol. 14, no. 6, pp. 7617–7627, 2020, doi: 10.1021/acsnano.0c03822.
- [3] F. Yu, L. Du, D. M. Ojcius, C. Pan, and S. Jiang, “Measures for diagnosing and treating infections by a novel coronavirus responsible for a pneumonia outbreak originating in Wuhan, China,” *Microbes Infect.*, vol. 22, no. 2, pp. 74–79, 2020, doi: 10.1016/j.micinf.2020.01.003.
- [4] T. Wen *et al.*, “Development of a lateral flow immunoassay strip for rapid detection of IgG antibody against SARS-CoV-2 virus,” *Analyst*, vol. 145, no. 15, pp. 5345–5352, 2020, doi: 10.1039/d0an00629g.
- [5] Z. Li *et al.*, “Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis,” *J. Med. Virol.*, vol. 92, no. 9, pp. 1518–1524, 2020, doi: 10.1002/jmv.25727.
- [6] M. Nuccetelli, M. Pieri, F. Gisone, and S. Bernardini, “Combined anti-SARS-CoV-2 IgA, IgG, and IgM Detection as a Better Strategy to Prevent Second Infection Spreading Waves,” *Immunol. Invest.*, vol. 00, no. 00, pp. 1–13, 2020, doi: 10.1080/08820139.2020.1823407.
- [7] C. Huang, T. Wen, F. J. Shi, X. Y. Zeng, and Y. J. Jiao, “Rapid Detection of IgM Antibodies against the SARS-CoV-2 Virus via Colloidal Gold Nanoparticle-Based Lateral-Flow Assay,” *ACS Omega*, vol. 5, no. 21, pp. 12550–12556, 2020, doi: 10.1021/acsomega.0c01554.
- [8] L. A. S. Cavallera, B. Colitti, S. Rosati, G. Ferrara, L. Bertolotti, C. Nogarol, C. Guiotto, C. Cagnazzo, M. Denina, F. Fagiolic, F. Di Nardo, M. Chiarello, C. Baggiani, “A multi-target lateral flow immunoassay enabling the specific and sensitive detection of total antibodies to SARS COV-2,” *Talanta*, vol. 14(4), no. January, pp. 337–339, 2020, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121737>
- [9] K. M. Koczula and A. Gallotta, “Lateral flow assays,” *Essays Biochem.*, vol. 60, no. 1, pp. 111–120, 2016, doi: 10.1042/EBC20150012.
- [10] Merck Millipore, “Rapid Lateral Flow Test Strips Considerations for Product Development,” *Merck Millipore*. EMD Millipore Corporation, Billerica, 2013.
- [11] Q. Bayin, L. Huang, C. Ren, Y. Fu, X. Ma, and J. Guo, “Anti-SARS-CoV-2 IgG and IgM detection with a GMR based LFIA system,” *Talanta*, vol. 227, no. November 2020, p. 122207, 2021, doi: 10.1016/j.talanta.2021.122207.
- [12] Innova Biosciences Guide, “A guide to lateral flow immunoassays,” vol. 44, no. 0, pp. 1–15, 2020, [Online]. Available: [https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/download/pdf/IBS\\_A\\_guide\\_to\\_lateral\\_flow\\_immunoassays.pdf](https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/download/pdf/IBS_A_guide_to_lateral_flow_immunoassays.pdf)
- [13] The NativeAntigen Company, “Choosing the Right Reagents for your Coronavirus Immunoassay Contents.” The NativeAntigen Company, Kidlington, Oxford, p. 22, 2020. [Online]. Available: [https://www.lubio.ch/assets/PDFs/Native\\_Antigen\\_Company\\_Choosing\\_The\\_Right\\_Reagents\\_for\\_Your\\_Coronavirus\\_Immunoassay.pdf](https://www.lubio.ch/assets/PDFs/Native_Antigen_Company_Choosing_The_Right_Reagents_for_Your_Coronavirus_Immunoassay.pdf)
- [14] J. Yu *et al.*, “SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients,” *N. Engl. J. Med.*, pp. 1–3, 2020.

- [15] Q. Wang *et al.*, “Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2,” *Cell*, vol. 181, no. 4, pp. 894–904.e9, 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.03.045.
- [16] S. M. Lee *et al.*, “Comparison of Serologic Response of Hospitalized COVID-19 Patients Using 8 Immunoassays,” *J. Korean Med. Sci.*, vol. 36, no. 9, p. e64, 2021, doi: 10.3346/jkms.2021.36.e64.
- [17] S. Suryoprabowo, L. Liu, H. Kuang, G. Cui, and C. Xu, “Fluorescence based immunochromatographic sensor for rapid and sensitive detection of tadalafil and comparison with a gold lateral flow immunoassay,” *Food Chem.*, vol. 342, no. May 2020, p. 128255, 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128255.
- [18] R. Herizchi, E. Abbasi, M. Milani, and A. Akbarzadeh, “Current methods for synthesis of gold nanoparticles,” *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 2, pp. 596–602, 2016, doi: 10.3109/21691401.2014.971807.
- [19] C. Daruich De Souza, B. Ribeiro Nogueira, and M. E. C. M. Rostelato, “Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction,” *J. Alloys Compd.*, vol. 798, pp. 714–740, 2019, doi: 10.1016/j.jallcom.2019.05.153.
- [20] M. Sengani, A. M. Grumezescu, and V. D. Rajeswari, “Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis – A prospective review on drug delivery aspect,” *OpenNano*, vol. 2, no. January, pp. 37–46, 2017, doi: 10.1016/j.onano.2017.07.001.
- [21] J. Tomko *et al.*, “Cavitation bubble dynamics and nanoparticle size distributions in laser ablation in liquids,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 522, pp. 368–372, 2017, doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.03.030.
- [22] A. O. Kucherik *et al.*, “Cavitation-Free Continuous-Wave Laser Ablation from a Solid Target to Synthesize Low-Size-Dispersed Gold Nanoparticles,” *ChemPhysChem*, vol. 18, no. 9, pp. 1185–1191, 2017, doi: 10.1002/cphc.201601419.
- [23] M. G. John and K. M. Tibbetts, “One-step femtosecond laser ablation synthesis of sub-3 nm gold nanoparticles stabilized by silica,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 475, no. January, pp. 1048–1057, 2019, doi: 10.1016/j.apsusc.2019.01.042.
- [24] Ž. Jelen, P. Majerič, M. Zadavec, I. Anžel, M. Rakuša, and R. Rudolf, “Study of gold nanoparticles’ preparation through ultrasonic spray pyrolysis and lyophilisation for possible use as markers in LFIA tests,” *Nanotechnol. Rev.*, vol. 10, no. 1, pp. 1978–1992, 2021, doi: 10.1515/ntrev-2021-0120.
- [25] P. Manta *et al.*, “Optical Density Optimization of Malaria Pan Rapid Diagnostic Test Strips for Improved Test Zone Band Intensity,” *Diagnostics*, vol. 10, no. 11, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3390/diagnostics10110880.
- [26] N. A. Byzova, A. V. Zherdev, B. N. Khlebtsov, A. M. Burov, N. G. Khlebtsov, and B. B. Dzantiev, “Advantages of highly spherical gold nanoparticles as labels for lateral flow immunoassay,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 12, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/s20123608.
- [27] D. S. Kim *et al.*, “Development of lateral flow assay based on size-controlled gold nanoparticles for detection of hepatitis B surface antigen,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 16, no. 12, 2016, doi: 10.3390/s16122154.
- [28] N. Ashizawa *et al.*, “Evaluation of four commercial severe acute respiratory coronavirus 2 antibody tests,” *J. Infect. Chemother.*, no. xxxx, pp. 1–6, 2021, doi: 10.1016/j.jiac.2021.03.008.
- [29] C. Serre-Miranda *et al.*, “Performance assessment of 11 commercial serological tests for SARS-CoV-2 on hospitalised COVID-19 patients,” *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 104, pp. 661–669, 2021, doi: 10.1016/j.ijid.2021.01.038.
- [30] E. Mohit, Z. Rostami, and H. Vahidi, “A comparative review of immunoassays for COVID-19 detection,” *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 0, no. 0, 2021, doi: 10.1080/1744666x.2021.1908886.

- [31] R. Rudolf *et al.*, “Morphology, Aggregation Properties, Cytocompatibility, and Anti-Inflammatory Potential of Citrate-Stabilized AuNPs Prepared by Modular Ultrasonic Spray Pyrolysis,” *J. Nanomater.*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/9365012.
- [32] D. Golub, A. Ivanič, P. Majerič, H. R. Tiyyagura, I. Anžel, and R. Rudolf, “Synthesis of colloidal Au nanoparticles through Ultrasonic Spray Pyrolysis and their use in the preparation of polyacrylate-AuNPs’ composites,” *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 22, pp. 1–17, 2019, doi: 10.3390/ma12223775.
- [33] P. Rudolf, R., Shariq, M., Veselinović, V., Adamović, T., Bobovnik, R., Kargl, R., Majerič, “Synthesis of gold nanoparticles through USP,” *Contemp. Mater.*, vol. 9, no. 1, pp. 106–112, 2018, doi: 10.7251/COMEN1801106R.
- [34] “No Title.” <https://nanocomposix.com/collections/product-line-bioready/products/bioready-gold-nanospheres-bare-citrate?variant=15906943926361>
- [35] B. P. Mugaka, Y. Hu, Y. Ma, and Y. Ding, “Surface Modification of Nanoparticles for Targeted Drug Delivery,” *Surf. Modif. Nanoparticles Target. Drug Deliv.*, pp. 391–403, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-06115-9.
- [36] Y. Chen, Y. Xianyu, and X. Jiang, “Surface Modification of Gold Nanoparticles with Small Molecules for Biochemical Analysis,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 50, no. 2, pp. 310–319, 2017, doi: 10.1021/acs.accounts.6b00506.
- [37] K. Otto, I. Oja Acik, M. Krunks, K. Tõnsuaadu, and A. Mere, “Thermal decomposition study of H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O and AgNO<sub>3</sub> as precursors for plasmonic metal nanoparticles,” *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 118, no. 2, pp. 1065–1072, 2014, doi: 10.1007/s10973-014-3814-3.
- [38] V. Pareek, A. Bhargava, R. Gupta, N. Jain, and J. Panwar, “Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review,” *Adv. Sci. Eng. Med.*, vol. 9, no. 7, pp. 527–544, 2017, doi: 10.1166/ asem.2017.2027.
- [39] P. Majerič, D. Jenko, B. Friedrich, and R. Rudolf, “Formation mechanisms for gold nanoparticles in a redesigned Ultrasonic Spray Pyrolysis,” *Adv. Powder Technol.*, vol. 28, no. 3, pp. 876–883, 2017, doi: 10.1016/j. apt.2016.12.013.
- [40] M. Shariq, N. Maric, G. K. Gorse, R. Kargl, and R. Rudolf, “Synthesis of Gold Nanoparticles with the Ultrasonic Spray Pyrolysis and Estimation of their Usage in 3D Printing,” *Micro Nanosyst.*, vol. 10, pp. 102–109, 2018, doi: 10.2174/1876402910666180802113859.
- [41] H. R. Tiyyagura, P. Majerič, M. Bračič, I. Anžel, and R. Rudolf, “Gold inks for inkjet printing on photo paper: Complementary characterisation,” *Nanomaterials*, vol. 11, no. 3, pp. 1–13, 2021, doi: 10.3390/nano11030599.
- [42] P. Majerič and R. Rudolf, “Advances in ultrasonic spray pyrolysis processing of noble metal nanoparticles-Review,” *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 16, 2020, doi: 10.3390/MA13163485.
- [43] W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, and H. Fessi, “Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 58, no. 15, pp. 1688–1713, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>.
- [44] T. M. Amis, J. Renukuntla, P. K. Bolla, and B. A. Clark, “Selection of cryoprotectant in lyophilization of progesterone-loaded stearic acid solid lipid nanoparticles,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 9, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12090892.
- [45] T. A. Saleh, “Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities,” *Environ. Technol. Innov.*, vol. 20, p. 101067, 2020, doi: 10.1016/j. eti.2020.101067.
- [46] Y. Dahman, *Nanotechnology and Functional Materials for Engineers*. 2017.
- [47] S. S. Sidhu, Z. Redouane, B. S. Preetkanwal, and Y. Morteza, *Materials Horizons : From Nature to Nanomaterials Futuristic Composites*. 2018.
- [48] B. Mehravani, A. I. Ribeiro, and A. Zille, “Gold nanoparticles synthesis and

- antimicrobial effect on fibrous materials,” *Nanomaterials*, vol. 11, no. 5, 2021, doi: 10.3390/nano11051067.
- [49] R. Gupta *et al.*, “Nanotechnology-Based Approaches for the Detection of SARS-CoV-2,” *Front. Nanotechnol.*, vol. 2, no. December, pp. 1–14, Dec. 2020, doi: 10.3389/fnano.2020.589832.
- [50] M. Byakodi *et al.*, “Emerging 0D, 1D, 2D, and 3D nanostructures for efficient point-of-care biosensing,” *Biosens. Bioelectron. X*, vol. 12, no. November, p. 100284, 2022, doi: 10.1016/j.biosx.2022.100284.
- [51] Z. Wang, T. Hu, R. Liang, and M. Wei, “Application of Zero-Dimensional Nanomaterials in Biosensing,” *Front. Chem.*, vol. 8, no. April, pp. 1–19, 2020, doi: 10.3389/fchem.2020.00320.
- [52] A. M. Glezer, “Structural Classification of Nanomaterials,” *Russ. Metall.*, vol. 2011, no. 4, pp. 263–269, 2011, doi: 10.1134/S0036029511040057.
- [53] J. N. Jakob and R. Winderlich, “BERZELIUS,” no. 5, 1852.
- [54] D. Meroni and S. Ardizzone, “Preparation and application of hybrid nanomaterials,” *Nanomaterials*, vol. 8, no. 11, pp. 2–5, 2018, doi: 10.3390/nano8110891.
- [55] V. P. Ananikov, “Organic – Inorganic Hybrid Nanomaterials,” 2019.
- [56] L. E. Murr, *Handbook of Materials Structures, Properties, Processing and Performance*, 1st ed. Springer International Publishing Switzerland 2015: Springer Cham, 2015. doi: 10.1007/978-3-319-01815-7.
- [57] C. Parolo *et al.*, “Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays,” *Nat. Protoc.*, vol. 15, no. 12, pp. 3788–3816, 2020, doi: 10.1038/s41596-020-0357-x.
- [58] E. B. Bahadır and M. K. Sezgintürk, “Lateral flow assays: Principles, designs and labels,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 82, pp. 286–306, 2016, doi: 10.1016/j.trac.2016.06.006.
- [59] Innova Biosciences Guide, “A guide to lateral flow immunoassays,” vol. 44, no. 0, pp. 1–15, 2020.
- [60] S. K. Vashist and J. H. T. Luong, *Immunoassays: An overview*. Elsevier Inc., 2018. doi: 10.1016/B978-0-12-811762-0.00001-3.
- [61] J. Bjerner, K. H. Olsen, O. P. Børner, and K. Nustad, “Testing and validating a homogeneous immunometric assay for interference,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 42, no. 2, pp. 208–214, 2004, doi: 10.1515/CCLM.2004.038.
- [62] H. Chen *et al.*, “Competitive and noncompetitive immunoassays for the detection of benzothioistrobin using magnetic nanoparticles and fluorescein isothiocyanate-labeled peptides,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 411, no. 2, pp. 527–535, 2019, doi: 10.1007/s00216-018-1478-8.
- [63] D. Wild, *How to Use This Book*, Fourth Edi. Elsevier Ltd, 2013. doi: 10.1016/B978-0-08-097037-0.00001-4.
- [64] et al Vashist SK, “In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19 : Recent Advances and Emerging Trends,” *Diagnostics*, vol. 10, p. 202, 2020.
- [65] C. Corti and R. Holliday, *Gold: Science and Applications*. 2009. doi: 10.1201/9781420065268-c9.
- [66] DentaGama, “History of Dental Implants,” 2016. <https://dentagama.com/news/history-of-dental-implants>
- [67] X. Huang *et al.*, “Synthesis of hexagonal close-packed gold nanostructures,” *Nat. Commun.*, vol. 2, no. 1, 2011, doi: 10.1038/ncomms1291.
- [68] R. G. Jones, C. K. Ober, T. Hayakawa, C. K. Luscombe, and N. Stingelin, “Terminology of polymers in advanced lithography (IUPAC Recommendations 2020),” *Pure Appl. Chem.*, vol. 92, no. 11, pp. 1861–1891, 2020, doi: 10.1515/pac-2018-1215.

- [69] A. Kumar, B. Mazinder Boruah, and X. J. Liang, "Gold nanoparticles: Promising nanomaterials for the diagnosis of cancer and HIV/AIDS," *J. Nanomater.*, vol. 2011, 2011, doi: 10.1155/2011/202187.
- [70] A. J. Mieszawska, W. J. M. Mulder, Z. A. Fayad, and D. P. Cormode, "Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease," *Mol. Pharm.*, vol. 10, no. 3, pp. 831–847, 2013, doi: 10.1021/mp3005885.
- [71] P. E. Chow, *Gold Nanoparticles: Properties, Characterization and Fabrication*. Nova Science Publishers, Inc., 2010.
- [72] D. Vollath, F. D. Fischer, and D. Holec, "Surface energy of nanoparticles - influence of particle size and structure," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 9, no. 1, pp. 2265–2276, 2018, doi: 10.3762/bjnano.9.211.
- [73] M. I. Ahmad and S. S. Bhattacharya, "Size effect on the lattice parameters of nanocrystalline anatase," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 95, no. 19, pp. 877–878, 2009, doi: 10.1063/1.3261754.
- [74] A. Balerna, "Extended x-ray-absorption fine-structure," vol. 31, no. 8, 1985.
- [75] Z. Huang, P. Thomson, and S. Di, "Lattice contractions of a nanoparticle due to the surface tension: A model of elasticity," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 68, no. 4, pp. 530–535, 2007, doi: 10.1016/j.jpcs.2007.01.016.
- [76] S. Zeng, D. Baillargeat, H. P. Ho, and K. T. Yong, "Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, no. 10, pp. 3426–3452, 2014, doi: 10.1039/c3cs60479a.
- [77] 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*, vol. 110, no. 14, pp. 7238–7248, 2006, doi: 10.1021/jp057170o.
- [78] X. Zhu and T. Gao, *Spectrometry*. Elsevier Inc., 2018. doi: 10.1016/B978-0-12-815053-5.00010-6.
- [79] V. Amendola, R. Pilot, M. Frasconi, O. M. Maragò, and M. A. Iati, "Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review," *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 29, no. 20, 2017, doi: 10.1088/1361-648X/aa60f3.
- [80] 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," *Child. Educ.*, vol. 85, no. 5, pp. 293–299, 2009, doi: 10.1080/00094056.2009.10521700.
- [81] G. Mie, "Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen," vol. No. 3., no. 4, p. 69, 1908.
- [82] S. Tomić *et al.*, "Size-dependent effects of gold nanoparticles uptake on maturation and antitumor functions of human dendritic cells in vitro," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, pp. 1–13, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0096584.
- [83] A. K. Khan, R. Rashid, G. Murtaza, and A. Zahra, "Gold nanoparticles: Synthesis and applications in drug delivery," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014. doi: 10.4314/tjpr.v13i7.23.
- [84] M. Bekić *et al.*, "The effect of stabilisation agents on the immunomodulatory properties of gold nanoparticles obtained by ultrasonic spray pyrolysis," *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 24, pp. 1–15, 2019, doi: 10.3390/MA12244121.
- [85] A. Rostek *et al.*, "Comparative biological effects of spherical noble metal nanoparticles (Rh, Pd, Ag, Pt, Au) with 4–8 nm diameter," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 9, no. 1, pp. 2763–2774, 2018, doi: 10.3762/bjnano.9.258.
- [86] K. D. Rudolf R., Jelen Ž., Zadravec M., Majerič P., Jović Z., Vuksanović M., Stanković I., Matija L., Dragičević A., Miso-Thompson N., Horvat A., "A gold nanoparticles and hydroxylated fullerene water complex as a new product for cosmetics," vol. 17, no. 1,

- pp. 89–107, 2022.
- [87] J. Pulit-Prociak, A. Grabowska, J. Chwastowski, T. M. Majka, and M. Banach, “Safety of the application of nanosilver and nanogold in topical cosmetic preparations,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 183, no. July, 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110416.
- [88] P. Prajapati, “Overview on Applications of Nanoparticles in Cosmetics,” *Asian J. Pharm. Sci. Clin. Res.*, vol. 1, p. 40, 2011.
- [89] R. R. Kumal, T. E. Karam, and L. H. Haber, “Determination of the surface charge density of colloidal gold nanoparticles using second harmonic generation,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 119, no. 28, pp. 16200–16207, 2015, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b00568.
- [90] M. H. Jazayeri, H. Amani, A. A. Pourfatollah, H. Pazoki-Toroudi, and B. Sedighimoghaddam, “Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies,” *Sens. Bio-Sensing Res.*, vol. 9, pp. 17–22, 2016, doi: 10.1016/j.sbsr.2016.04.002.
- [91] R. Cao-Milán and L. M. Liz-Marzán, “Gold nanoparticle conjugates: Recent advances toward clinical applications,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 11, no. 5, pp. 741–752, 2014, doi: 10.1517/17425247.2014.891582.
- [92] S. S. Pingale, “Molecular electrostatic potential for exploring  $\pi$ -conjugation: A density-functional investigation,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 13, no. 33, pp. 15158–15165, 2011, doi: 10.1039/c1cp20071b.
- [93] N. Boehnke, K. J. Dolph, V. M. Juarez, J. M. Lanoha, and P. T. Hammond, “Electrostatic Conjugation of Nanoparticle Surfaces with Functional Peptide Motifs,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 31, no. 9, pp. 2211–2219, 2020, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00384.
- [94] M. Ebrahimian, S. Taghavi, A. Mokhtarzadeh, M. Ramezani, and M. Hashemi, “Co-delivery of Doxorubicin Encapsulated PLGA Nanoparticles and Bcl-xL shRNA Using Alkyl-Modified PEI into Breast Cancer Cells,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 183, no. 1, pp. 126–136, 2017, doi: 10.1007/s12010-017-2434-3.
- [95] B. Schuetze, C. Mayer, K. Loza, M. Gocyla, M. Heggen, and M. Eppele, “Conjugation of thiol-terminated molecules to ultrasmall 2 nm-gold nanoparticles leads to remarkably complex 1H-NMR spectra,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 12, pp. 2179–2189, 2016, doi: 10.1039/c5tb02443a.
- [96] S. Brocchini *et al.*, “Article A new reagent for stable thiol specific conjugation,” 2013.
- [97] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, and R. Whyman, “Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system,” *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, no. 7, pp. 801–802, 1994, doi: 10.1039/C39940000801.
- [98] J. Si *et al.*, “A signal amplification system on a lateral flow immunoassay detecting for hepatitis e-antigen in human blood samples,” *J. Med. Virol.*, vol. 91, no. 7, pp. 1301–1306, 2019, doi: 10.1002/jmv.25452.
- [99] Y. Shen and G. Shen, “Signal-Enhanced Lateral Flow Immunoassay with Dual Gold Nanoparticle Conjugates for the Detection of Hepatitis B Surface Antigen,” *ACS Omega*, vol. 4, no. 3, pp. 5083–5087, 2019, doi: 10.1021/acsomega.8b03593.
- [100] Y. C. Chang and D. H. Chen, “Preparation and adsorption properties of monodisperse chitosan-bound Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for removal of Cu(II) ions,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 283, no. 2, pp. 446–451, 2005, doi: 10.1016/j.jcis.2004.09.010.
- [101] B. O. L. Chapman, D. J. Pasto, G. W. Borden, and A. A. Griswold, “Photochemical Transformations of Conjugated Cycloheptadienes,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 84, no. 7, pp. 1220–1224, 1962, doi: 10.1021/ja00866a030.
- [102] M. Patra, L. S. Eichenberger, G. Fischer, and J. P. Holland, “Photochemical Conjugation and One-Pot Radiolabelling of Antibodies for Immuno-PET,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 58, no. 7, pp. 1928–1933, 2019, doi: 10.1002/anie.201813287.
- [103] “Histidine Bioconjugation Protocols and Theory,” *Papyrus Bio*, 2021.

- <https://blog.papyrusbio.com/histidine-bioconjugation-protocols-and-theory/>
- [104] K. Peciak, E. Laurine, R. Tommasi, J. W. Choi, and S. Brocchini, "Site-selective protein conjugation at histidine," *Chem. Sci.*, vol. 10, no. 2, pp. 427–439, 2019, doi: 10.1039/c8sc03355b.
- [105] J. M. Abad, S. F. L. Mertens, M. Pita, V. M. Fernández, and D. J. Schiffrin, "Functionalization of thioctic acid-capped gold nanoparticles for specific immobilization of histidine-tagged proteins," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 15, pp. 5689–5694, 2005, doi: 10.1021/ja042717i.
- [106] C. Joseph, A. Daniels, S. Singh, and M. Singh, "Histidine-tagged folate-targeted gold nanoparticles for enhanced transgene expression in breast cancer cells in vitro," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 1, 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14010053.
- [107] A. M. M.Sc., "A Lesson From Nature: What Click Chemistry Is, and Why It Won a Nobel Prize," 2022. <https://www.mcgill.ca/oss/article/medical-did-you-know/lesson-nature-what-click-chemistry-and-why-it-won-nobel-prize>
- [108] N. K. Devaraj and M. G. Finn, "Introduction: Click Chemistry," *Chem. Rev.*, vol. 121, no. 12, pp. 6697–6698, 2021, doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00469.
- [109] T. I. Chio and S. L. Bane, "Click Chemistry Conjugations," *Methods Mol. Biol.*, vol. 2078, pp. 83–97, 2020, doi: 10.1007/978-1-4939-9929-3\_6.
- [110] N. Baig, I. Kammakakam, and W. Falath, "Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges," *Mater. Adv.*, vol. 2, no. 6, pp. 1821–1871, 2021, doi: 10.1039/D0MA00807A.
- [111] P. Zhao, N. Li, and D. Astruc, "State of the art in gold nanoparticle synthesis," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 257, no. 3, pp. 638–665, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.002>.
- [112] L. A. Dykman and N. G. Khlebtsov, "Methods for chemical synthesis of colloidal gold," *Russ. Chem. Rev.*, vol. 88, no. 3, pp. 229–247, 2019, doi: 10.1070/rcr4843.
- [113] P. J. G. Goulet and R. B. Lennox, "New insights into Brust-Schiffrin metal nanoparticle synthesis," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 28, pp. 9582–9584, 2010, doi: 10.1021/ja104011b.
- [114] S. G. Booth *et al.*, "The significance of bromide in the Brust-Schiffrin synthesis of thiol protected gold nanoparticles," *Chem. Sci.*, vol. 8, no. 12, pp. 7954–7962, 2017, doi: 10.1039/c7sc03266h.
- [115] J. Sylvestre *et al.*, "Surface Chemistry of Gold Nanoparticles Produced by Laser Ablation in Aqueous Media," pp. 16864–16869, 2004.
- [116] S. Y. Holguin, N. N. Thadhani, and M. R. Prausnitz, "Effect of laser fluence, nanoparticle concentration and total energy input per cell on photoporation of cells," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 14, no. 5, pp. 1667–1677, 2018, doi: 10.1016/j.nano.2018.04.015.
- [117] C. M. Lieber and C. C. Chen, "Preparation of Fullerenes and Fullerene-Based Materials," *Solid State Phys. - Adv. Res. Appl.*, vol. 48, no. C, pp. 109–148, 1994, doi: 10.1016/S0081-1947(08)60578-0.
- [118] E. Solati and D. Dorranean, "Comparison Between Silver and Gold Nanoparticles Prepared by Pulsed Laser Ablation in Distilled Water," *J. Clust. Sci.*, vol. 26, no. 3, pp. 727–742, 2015, doi: 10.1007/s10876-014-0732-2.
- [119] S. Z. M. Isa, R. Zainon, and M. Tamal, "State of the Art in Gold Nanoparticle Synthesis via Pulsed Laser Ablation in Liquid and Its Characterisation for Molecular Imaging: A Review," *Materials (Basel)*, vol. 15, no. 3, 2022, doi: 10.3390/ma15030875.
- [120] F. Mafuné, J. Y. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, and H. Sawabe, "Formation of gold nanoparticles by laser ablation in aqueous solution of surfactant," *J. Phys. Chem. B*, vol.

- 105, no. 22, pp. 5114–5120, 2001, doi: 10.1021/jp0037091.
- [121] I. A. Safo, M. Werheid, C. Dosche, and M. Oezaslan, “The role of polyvinylpyrrolidone (PVP) as a capping and structure-directing agent in the formation of Pt nanocubes,” *Nanoscale Adv.*, vol. 1, no. 8, pp. 3095–3106, 2019, doi: 10.1039/c9na00186g.
- [122] W. Leng, P. Pati, and P. J. Vikesland, “Room temperature seed mediated growth of gold nanoparticles: mechanistic investigations and life cycle assesment,” *Environ. Sci. Nano*, vol. 2, no. 5, pp. 440–453, 2015, doi: 10.1039/c5en00026b.
- [123] Q. Yao *et al.*, “Understanding seed-mediated growth of gold nanoclusters at molecular level,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00970-1.
- [124] G. A. Vinnacombe-Willson, N. Chiang, P. S. Weiss, S. H. Tolbert, and L. Scarabelli, “Seeded-Growth Experiment Demonstrating Size- And Shape-Dependence on Gold Nanoparticle-Light Interactions,” *J. Chem. Educ.*, vol. 98, no. 2, pp. 546–552, 2021, doi: 10.1021/acs.jchemed.0c01150.
- [125] P. Majerič, “SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES WITH A MODIFIED ULTRASONIC SPRAY PYROLYSIS,” University of Maribor, 2016.
- [126] S. Stopić and B. Fridrih, “Advance in ultrasonic spray pyrolysis (USP) for the synthesis of gold nanoparticles,” *Vojnoteh. Glas.*, vol. 68, no. 4, pp. 877–894, 2020, doi: 10.5937/vojtehg68-27948.
- [127] K. Okuyama and W. W. Lenggoro, “Preparation of nanoparticles via spray route,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 58, no. 3–6, pp. 537–547, 2003, doi: 10.1016/S0009-2509(02)00578-X.
- [128] S. Tsantilis and S. E. Pratsinis, “Soft- and hard-agglomerate aerosols made at high temperatures,” *Langmuir*, vol. 20, no. 14, pp. 5933–5939, 2004, doi: 10.1021/la036389w.
- [129] M. Shariq *et al.*, “Successful Synthesis of Gold Nanoparticles through Ultrasonic Spray Pyrolysis from a Gold(III) Nitrate Precursor and Their Interaction with a High Electron Beam,” *ChemistryOpen*, vol. 7, no. 7, pp. 533–542, 2018, doi: 10.1002/open.201800101.
- [130] K. Marinkovic, L. Gomez, M. Rabanal, L. Mancic, and O. Milosevic, “Aerosol route in processing of nanostructured phosphor materials,” *Process. Appl. Ceram.*, vol. 4, no. 3, pp. 135–145, 2010, doi: 10.2298/pac1003135m.
- [131] J. H. Bang and K. S. Suslick, “Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials,” *Adv. Mater.*, vol. 22, no. 10, pp. 1039–1059, 2010, doi: 10.1002/adma.200904093.
- [132] R. Rudolf, P. Majerič, V. Štager, and B. Albrecht, “The process of production gold nanoparticles with modified ultrasonic spray pyrolysis,” patent SI 26000 A
- [133] M. Shariq *et al.*, “Application of Gold(III) Acetate as a New Precursor for the Synthesis of Gold Nanoparticles in PEG Through Ultrasonic Spray Pyrolysis,” *J. Clust. Sci.*, vol. 28, no. 3, pp. 1647–1665, 2017, doi: 10.1007/s10876-017-1178-0.
- [134] M. Shariq *et al.*, “Successful Synthesis of Gold Nanoparticles through Ultrasonic Spray Pyrolysis from a Gold(III) Nitrate Precursor and Their Interaction with a High Electron Beam,” *ChemistryOpen*, vol. 7, no. 7, pp. 533–542, 2018, doi: 10.1002/open.201800101.
- [135] H. R. Tiyyagura, P. Majerič, I. Anžel, and R. Rudolf, “Low-cost synthesis of AuNPs through ultrasonic spray pyrolysis,” *Mater. Res. Express*, vol. 7, no. 5, 2020, doi: 10.1088/2053-1591/ab80ea.
- [136] P. Majerič, D. Jenko, B. Friedrich, and R. Rudolf, “Formation of bimetallic Fe/Au submicron particles with ultrasonic spray pyrolysis,” *Metals (Basel)*, vol. 8, no. 4, pp. 1–13, 2018, doi: 10.3390/met8040278.
- [137] T. Švarc, S. Stopić, Ž. Jelen, M. Zadravec, B. Friedrich, and R. Rudolf, “Synthesis of Ni/Y2O3 Nanocomposite through USP and Lyophilisation for Possible Use as Coating,” *Materials (Basel)*, vol. 15, no. 8, pp. 1–17, 2022, doi: 10.3390/ma15082856.
- [138] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces: Third Edition*. 2011. doi:



- 10.1016/C2011-0-05119-0.
- [139] R. Rakhshae and Y. Noorani, “Extending LaMer’s mechanism using open system for increasing forced and controlled growth of Au nano particles: Desired decreasing Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nano particles size during simultaneous synthesis in optimized conditions,” *Adv. Powder Technol.*, vol. 28, no. 7, pp. 1797–1814, 2017, doi: 10.1016/j.appt.2017.04.021.
- [140] S. Bhattacharjee, “DLS and zeta potential - What they are and what they are not?,” *J. Control. Release*, vol. 235, pp. 337–351, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [141] H. T. Phan and A. J. Haes, “What Does Nanoparticle Stability Mean? HHS Public Access,” *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*, vol. 123, no. 27, pp. 16495–16507, 2019, doi: 10.1021/acs.jpcc.9b00913.What.
- [142] K. S. Birdi, “Surface and Colloid Chemistry,” *Handb. Surf. Colloid Chem. Third Ed.*, no. 1, pp. 1–43, 2008, doi: 10.1201/9781420007206-5.
- [143] M. Choi, W. K. Choi, C. H. Jung, and S. B. Kim, “The surface modification and characterization of SiO<sub>2</sub> nanoparticles for higher foam stability,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–6, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-76464-w.
- [144] L. Guerrini, R. A. Alvarez-Puebla, and N. Pazos-Perez, “Surface modifications of nanoparticles for stability in biological fluids,” *Materials (Basel)*, vol. 11, no. 7, pp. 1–28, 2018, doi: 10.3390/ma11071154.
- [145] M. C. Morant-Miñana, “Nanoparticles: Surface Modification,” *Encycl. Biomed. Polym. Polym. Biomater.*, vol. 27, no. 27, pp. 5569–5584, 2016, doi: 10.1081/e-ebpp-120049944.
- [146] “Principles and mechanisms of nanoparticle stabilization by polymers,” *Springer Ser. Mater. Sci.*, vol. 81, pp. 65–116, 2005, doi: 10.1007/3-540-26523-6\_3.
- [147] S. S. Hopkins E, Sanvictores T, “Physiology, Acid Base Balance.” *Updated 2022 Sep 12, 2022.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507807/>
- [148] K. Talley and E. Alexov, “On the pH-optimum of activity and stability of proteins,” *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 78, no. 12, pp. 2699–2706, 2010, doi: 10.1002/prot.22786.
- [149] P. de Sousa-Pereira and J. M. Woof, “Iga: Structure, function, and developability,” *Antibodies*, vol. 8, no. 4, 2019, doi: 10.3390/antib8040057.
- [150] K. M. McAndrews *et al.*, “Heterogeneous antibodies against SARS-CoV-2 spike receptor binding domain and nucleocapsid with implications for COVID-19 immunity,” *JCI Insight*, vol. 5, no. 18, 2020, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.142386.
- [151] R. Rudolf, P. Majerič, D. Golub, and H. R. Tiyyagura, “Testing of novel nano gold ink for inkjet printing,” *Adv. Prod. Eng. Manag.*, vol. 15, no. 3, pp. 358–368, 2020, doi: 10.14743/apem2020.3.371.
- [152] M. Behera and S. Ram, “Spectroscopy-based study on the interaction between gold nanoparticle and poly(vinylpyrrolidone) molecules in a non-hydrocolloid,” *Int. Nano Lett.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–7, 2013, doi: 10.1186/2228-5326-3-17.
- [153] G. Collins, F. Davitt, C. O’Dwyer, and J. D. Holmes, “Comparing Thermal and Chemical Removal of Nanoparticle Stabilizing Ligands: Effect on Catalytic Activity and Stability,” *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 1, no. 12, pp. 7129–7138, 2018, doi: 10.1021/acsanm.8b02019.
- [154] C. H. Wang *et al.*, “Optimizing the size and surface properties of polyethylene glycol (PEG)-gold nanoparticles by intense x-ray irradiation,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 41, no. 19, 2008, doi: 10.1088/0022-3727/41/19/195301.
- [155] “Conventional and Long Circulating Liposomes,” no. 2, pp. 1–20, doi: 10.14302/issn.2835.
- [156] S. Lazzari, D. Moscatelli, F. Codari, M. Salmona, M. Morbidelli, and L. Diomedede, “Colloidal stability of polymeric nanoparticles in biological fluids,” *J. Nanoparticle*

- Res.*, vol. 14, no. 6, 2012, doi: 10.1007/s11051-012-0920-7.
- [157] L. Deng, L. Albertazzi, and A. R. A. Palmans, “Elucidating the Stability of Single-Chain Polymeric Nanoparticles in Biological Media and Living Cells,” *Biomacromolecules*, vol. 23, no. 1, pp. 326–338, 2022, doi: 10.1021/acs.biomac.1c01291.
- [158] M. Bachelet, “Design of pH-responsive gold nanoparticles in oncology,” *Mater. Sci. Technol. (United Kingdom)*, vol. 32, no. 8, pp. 794–804, 2016, doi: 10.1179/1743284715Y.0000000090.
- [159] R. B. Waghmare, A. B. Perumal, J. A. Moses, and C. Anandharamakrishnan, “Recent Developments in Freeze Drying of Foods,” *Innov. Food Process. Technol. A Compr. Rev.*, no. August, pp. 82–99, 2020, doi: 10.1016/b978-0-12-815781-7.00017-2.
- [160] J. Ravnik, M. Ramšak, M. Zadavec, B. Kamenik, and M. Hriberšek, “Experimental and stochastic analysis of lyophilisation,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 159, no. November 2020, pp. 108–122, 2021, doi: 10.1016/j.ejpb.2020.12.011.
- [161] G. Chen and W. Wang, “Role of Freeze Drying in Nanotechnology,” *Dry. Technol.*, vol. 25, no. 1, pp. 29–35, 2007, doi: 10.1080/07373930601161179.
- [162] J. Beirowski, S. Inghelbrecht, A. Arien, and H. Gieseler, “Freeze-Drying of Nanosuspensions, 1: Freezing Rate Versus Formulation Design as Critical Factors to Preserve the Original Particle Size Distribution,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, no. 5, pp. 1958–1968, 2011, doi: <https://doi.org/10.1002/jps.22425>.
- [163] Y. He and B. Vardhanabhuti, “Improved Heat Stability of Whey Protein Isolate by Glycation with Inulin,” *Dairy*, vol. 2, no. 1, pp. 135–147, 2021, doi: 10.3390/dairy2010013.
- [164] E. Trenkenschuh and W. Friess, “Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 165, pp. 345–360, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.024>.
- [165] J. Beirowski, S. Inghelbrecht, A. Arien, and H. Gieseler, “Freeze drying of nanosuspensions, 2: the role of the critical formulation temperature on stability of drug nanosuspensions and its practical implication on process design,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, no. 10, pp. 4471–4481, 2011, doi: <https://doi.org/10.1002/jps.22634>.
- [166] J. Beirowski, S. Inghelbrecht, A. Arien, and H. Gieseler, “Freeze-Drying of Nanosuspensions, Part 3: Investigation of Factors Compromising Storage Stability of Highly Concentrated Drug Nanosuspensions,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 1, pp. 354–362, 2012, doi: <https://doi.org/10.1002/jps.22745>.
- [167] S. M. D’Addio, J. G. Y. Chan, P. C. L. Kwok, B. R. Benson, R. K. Prud’Homme, and H. K. Chan, “Aerosol delivery of nanoparticles in uniform mannitol carriers formulated by ultrasonic spray freeze drying,” *Pharm. Res.*, vol. 30, no. 11, pp. 2891–2901, 2013, doi: 10.1007/s11095-013-1120-6.
- [168] H. Ma *et al.*, “COVID-19 diagnosis and study of serum SARS-CoV-2 specific IgA, IgM and IgG by chemiluminescence immunoanalysis,” *medRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.04.17.20064907.
- [169] J. M. R. Stefan Dübel, Ed., *Handbook of Therapeutic Antibodies*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014.
- [170] M. Yeasmin *et al.*, “Routes of Transmission of Newly Emerging SARS-CoV-2: A Systematic Review,” *Bangladesh J. Infect. Dis.*, vol. 7, no. April, pp. S18–S31, 2020, doi: 10.3329/bjid.v7i0.46797.
- [171] Z. Yousefi *et al.*, “Long-Term Persistence of Anti-SARS-COV-2 IgG Antibodies,” *Curr. Microbiol.*, vol. 79, no. 4, pp. 1–9, 2022, doi: 10.1007/s00284-022-02800-0.
- [172] G. Iacobucci, “Covid-19 : Most UK adults had antibodies after one dose of AstraZeneca or Pfizer vaccine , data suggest,” no. May, p. 2021, 2021, doi: 10.1136/bmj.n1274.
- [173] W. Tan *et al.*, “Viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19,”

- medRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.03.24.20042382.
- [174] I. Diapharma Group, “The importance of IgA detection in COVID-19 diagnostic testing.” <https://diapharma.com/iga-covid-19/>
- [175] B. Lou *et al.*, “Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since the exposure and post symptoms onset,” *medRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.03.23.20041707.
- [176] T. U. of Arizona, “Antibody Structure,” *The biology project - immunology*, 2000. <http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/antibody/structure.html>
- [177] A. Pramanik *et al.*, “The rapid diagnosis and effective inhibition of coronavirus using spike antibody attached gold nanoparticles,” *Nanoscale Adv.*, vol. 3, no. 6, pp. 1588–1596, 2021, doi: 10.1039/d0na01007c.
- [178] V. Jokanovic, M. Zivkovic, and N. Zdravkovic, “A new approach to extraordinary efficient protection against COVID 19 based on nanotechnology,” *Stomatol. Glas. Srb.*, vol. 67, no. 2, pp. 100–109, 2020, doi: 10.2298/sgs2002100j.
- [179] P. D. Pallabi Roy Chakravarty, “Protein Electrophoresis Using SDS-PAGE: A Detailed Overview,” *Goldbio*. <https://goldbio.com/articles/article/Protein-Electrophoresis-SDS-PAGE-Overview>
- [180] G. E. T. and D. W. K. John C. Lindon, Ed., *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Elsevier Ltd., 2017.
- [181] C. D. Wagner, W. M. Riggs, L. E. Davis, J. F. Moulder, and G. E. Muilenberg, “Handbook of X-ray electron spectroscopy,” *Perkin-Elmer Corporation*. p. 192, 1979.
- [182] J. W. Park and J. S. Shumaker-Parry, “Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: Role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 5, pp. 1907–1921, 2014, doi: 10.1021/ja4097384.
- [183] and C. J. P. Alexander V. Naumkin, Anna Kraut-Vass, Stephen W. Gaarenstroom, “NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database,” *June 06*, 2000. <https://srdata.nist.gov/xps/Default.aspx>
- [184] J.-W. Park and J. S. Shumaker-Parry, “Supporting Information for: Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles Experimental Methods,” pp. 1–33.
- [185] L. F. Gorup *et al.*, “Stability of di-butyl-dichalcogenide-capped gold nanoparticles: Experimental data and theoretical insights,” *RSC Adv.*, vol. 10, no. 11, pp. 6259–6270, 2020, doi: 10.1039/c9ra07147d.
- [186] A. Artemenko *et al.*, “Reference XPS spectra of amino acids,” *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 1050, no. 1, 2021, doi: 10.1088/1757-899X/1050/1/012001.
- [187] K. Artyushkova and P. Atanassov, “X-ray photoelectron spectroscopy for characterization of bionanocomposite functional materials for energy-harvesting technologies,” *ChemPhysChem*, vol. 14, no. 10, pp. 2071–2080, 2013, doi: 10.1002/cphc.201300037.
- [188] D. M. Eby, K. Artyushkova, A. K. Paravastu, and G. R. Johnson, “Probing the molecular structure of antimicrobial peptide-mediated silica condensation using X-ray photoelectron spectroscopy,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 19, pp. 9875–9883, 2012, doi: 10.1039/c2jm30837a.
- [189] E. P. O’Brien, B. R. Brooks, and D. Thirumalai, “Effects of pH on proteins: Predictions for ensemble and single-molecule pulling experiments,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 2, pp. 979–987, 2012, doi: 10.1021/ja206557y.
- [190] M. Tollinger, K. A. Crowhurst, L. E. Kay, and J. D. Forman-Kay, “Site-specific contributions to the pH dependence of protein stability,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 8, pp. 4545–4550, 2003, doi: 10.1073/pnas.0736600100.
- [191] J. Dinnes *et al.*, “Rapid, point-of-care antigen tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection,” *Cochrane database Syst. Rev.*, vol. 7, no. 7, p. CD013705, Jul. 2022, doi:

- 10.1002/14651858.CD013705.pub3.
- [192] V. T. Chu *et al.*, “Comparison of Home Antigen Testing With RT-PCR and Viral Culture During the Course of SARS-CoV-2 Infection,” *JAMA Intern. Med.*, vol. 182, no. 7, pp. 701–709, Jul. 2022, doi: 10.1001/jamainternmed.2022.1827.
- [193] M. Liu, R. K. Arora, and M. Krajden, “Rapid antigen tests for SARS-CoV-2,” *Cmaj*, vol. 193, no. 13, p. E447, 2021, doi: 10.1503/cmaj.202827.

**PRILOGE**

## Sklep Komisije republike Slovenije za medicinsko etiko o etičnosti raziskave

	<b>REPUBLIKA SLOVENIJA</b> <b>MINISTRSTVO ZA ZDRAVJE</b> Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko Štefanova ulica 5, 1000 Ljubljana T: 01 478 69 06, 01 478 69 20 F: 01 251 77 55 E: gp.mz@gov.si, kme.mz@gov.si www.mz.gov.si	Podpisnik: Božidar Stefan Voljč Izdajatelj: Republika Slovenija Serijska številka: cc:52 Tc:58 00 00 00 56 7d 87 44 Datum podpisa: 09:28, 04.05.2021 Referenčna številka: 0120-146/2021/3
<p>MR Žiga Jelen, mag. inž. tehn. Polimerov Univerza v Mariboru Fakulteta za strojništvo Smetanova ulica 17 2000 Maribor z.jelen@um.si</p>		
<p>Številka: 0120-146/2021/3 Datum: 23. 4. 2021 Zadeva: Ocena etičnosti predložene raziskave Zveza: vaša vloga z dne 31. 3. 2021</p>		
<p>Spoštovani,</p> <p>Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (v nadaljevanju KME RS) je dne 31. 3. 2021 prejela vašo vlogo za oceno etičnosti raziskave z naslovom »Razvoj LFIA testa na osnovi Au nanodelcev za detekcijo protiteles SARS-CoV-2 virusa«.</p> <p>Presečna, temeljna, perspektivna monocentrična raziskava bo potekala kot doktorsko delo MR Žiga Jelen, mag. inž. tehn. polimerov pod mentorstvom izr. prof. dr. Rebeke Rudolf, univ. dipl. inž. str. in somentorstvom doc. dr. Martina Rakuša, dr. med.. V doktorski disertaciji bo razvit in validiran nov hitri test za odkrivanje protiteles virusa SARS-CoV-2 (LFIA), ki temelji na inovativnem principu, tj., na uporabi Au nanodelcev, sintetiziranih z metodo ultrazvočne razpršilne pirolize (USP).</p> <p>KME RS je na videokonferenčni seji 20. aprila 2021 obravnavala prejeto vlogo in ugotovila, da je vloga popolna ter raziskava etično sprejemljiva. S tem vam za njeno izvedbo izdaja svoje soglasje.</p> <p>Pri nadaljnjih dopisih v zvezi z raziskavo se obvezno sklicujte na številko tega dopisa.</p> <p>S spoštovanjem,</p> <p>dr. Božidar Voljč, dr. med., predsednik KME RS</p> <p>Vročiti: – naslovniku – po e-pošti</p>		

## ŽIVLJENJEPIS

### Osebni podatki

Ime in priimek Žiga Jelen  
Državljanstvo Slovensko  
Datum rojstva 27.05.1993  
Spol Moški

### Šolanje in izobrazba

Obdobje 2015-2017  
Naziv Magister inženir tehnologije polimerov  
Ustanova Fakulteta za tehnologijo polimerov

### Delovne izkušnje

Obdobje 2017-2019  
Zaposlitev ali delovno mesto Raziskovalec  
Naziv in naslov delodajalca Plastika Skaza d.o.o., Selo 22, 3320 Velenje

Obdobje 2019-2023  
Zaposlitev ali delovno mesto Mladi raziskovalec  
Naziv in naslov delodajalca Fakulteta za strojništvo, Smetanova ulica 17, 2000 Maribor

Obdobje 2023-danes  
Zaposlitev ali delovno mesto Tehnični sodelavec  
Naziv in naslov delodajalca Fakulteta za strojništvo, Smetanova ulica 17, 2000 Maribor

Obdobje 2023-danes  
Zaposlitev ali delovno mesto Raziskovalec  
Naziv in naslov delodajalca Javni raziskovalni zavod ZIS Pomurje, Dvorec Rakičan, Lendavska ulica 28, Rakičan, 9000 Murska Sobota

**UNIVERZA V MARIBORU  
FAKULTETA ZA STROJNIŠTVO**

**IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE DOKTORSKE  
DISERTACIJE**

Ime in priimek študenta/-ke: Žiga Jelen

Študijski program: Doktorska šola fakultete za strojništvo

Naslov doktorske disertacije: Razvoj Au nanodelcev z metodo ultrazvočne razpršilne pirolize  
za detekcijo protiteles proti SARS-CoV-2

Mentor/-ica: red. prof. dr. Rebeka Rudolf

Somentor/-ica: doc. dr. Marin Rakuša

Podpisani/-a študent/-ka Žiga Jelen mag. 

- izjavljam, da je zaključno delo rezultat mojega znanstvenoraziskovalnega dela;
- izjavljam, da sem pridobil/-a vsa potrebna soglasja za uporabo podatkov in avtorskih del v zaključnem delu in jih v zaključnem delu jasno in ustrezno označil/-a;
- na Univerzo v Mariboru neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi zaključno delo javnosti na svetovnem spletu preko DKUM in drugih informacijskih zbirk in ponudnikov; sem seznanjen/-a, da bodo dela deponirana/objavljena v DKUM dostopna široki javnosti pod pogoji licence Creative Commons BY-NC-D, kar vključuje tudi avtomatizirano indeksiranje preko spleta in obdelavo besedil za potrebe tekstovnega in podatkovnega rudarjenja in ekstrakcije znanja iz vsebin; uporabnikom se dovoli reproduciranje brez predelave avtorskega dela, distribuiranje, dajanje v najem in priobčitev javnosti samega izvirnega avtorskega dela, in sicer pod pogojem, da navedejo avtorja in da ne gre za komercialno uporabo;
- dovoljujem objavo svojih osebnih podatkov, ki so navedeni v zaključnem delu in tej izjavi, skupaj z objavo zaključnega dela;
- izjavljam, da je tiskana oblika zaključnega dela istovetna elektronski obliki zaključnega dela, ki sem jo oddal/-a za objavo v DKUM;
- Izjavljam, da sem seznanjen s pogoji Proquest-a za oddajo in javno objavo doktorske disertacije v podatkovno zbirko ProQuest Dissertations & Theses Global (<http://contentz.mkt5049.com/lp/43888/382619/PQDTauthoragreement.pdf>).

Uveljavljam permisivnejšo obliko licence Creative Commons: CC BY-NC-ND 4.0 (navedite obliko)