



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET
INŽENJERSTVO MATERIJALA



Dobijanje nanofosfora na bazi fluorapatita dopirani Pr³⁺ jonima za bio-medicinske primene

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Doc. dr Marija Milanović

Kandidat: Mast. inž Dušan Milojkov

Novi Sad, 2020.

Zahvalnica autora

Beskrajno zahvaljujem mojim roditeljima, mami Zorici i tati Vasi, što su me podržavali tokom doktorskih studija i što su finansirali izradu ovog doktorata.

Zahvaljujem mentorki doc. dr Mariji Milanović sa Tehnološkog fakulteta Novi Sad što je zbog ove teze ušla u novu oblast istraživanja, kao i na stručnim savetima tokom izrade i pisanja teze. Zahvaljujem ko-mentor dr Vojislavu Staniću naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke Vinča u Beogradu, s kojim sam započeo istraživanja na izradi ove teze, na podeljenom znanju iz oblasti sinteze fluorapatitnih nanomaterijala i njihove karakterizacije i za svaku drugu pomoć tokom mog pripravničkog volontiranja u Laboratoriji za zaštitu od zračenja i zaštitu životne sredine.

This PhD thesis would not have been possible if Dr. Jana B. Nieder had not recognized the potential of these nanomaterials, and enabled me to be a visiting researcher at the International Iberian Nanotechnology Laboratory (INL) in Portugal in her Department of Nanophotonics in Ultrafast Bio- and Nanophotonics group. Thank you for the supervision in the field of bioimaging, and for your dedicated time to jointly write a scientific paper. Alos, I thank Dr. Oscar F. Silvestre for his patience in working with cancer cells, shared knowledge, and for supporting during the bioimaging which lasted until late into the night. It was a pleasure to be a part of scientific research at the highest level, and to meet scientists and artists from all over the world. This short research visit was made possible by COST Action MP1302 Nanospectroscopy.

Veliku zahvalnost dugujem svima koji su omogućili da se ovo multidisciplinarno istraživanje realizuje, s obzirom da ovo istraživanje nije finansirano od strane nekog projekta, niti sam ja bio zaposlen u nekoj istraživačkoj instituciji. Dr Goranu Janjiću sa Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu zahvaljujem na teorijskim proračunima, na mnogim stručnim savetima i podeljenom znanju u oblasti kvantne hemije. Dr Kseniji Radotić i dr Dragosavu Mutavdžiću sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja u Beogradu zahvaljujem što su mi otvorili vrata njihove laboratorije i omogućili da se detaljno ispituju luminescentne karakteristike ovih materijala.

Dr Branislavu Nastasijeviću sa Instituta za nuklearne nauke Vinča zahvaljujem na velikoj posvećenosti u ispitivanjima hemolitičkih osobina ovih materijala. Dr Vukosavi Živković-Radovanović sa Hemijskog fakulteta u Beogradu zahvaljujem što je omogućila FTIR merenja, a posebno na strpljenju za sve oglede koje smo pokušali da uradimo pomoću štapa i kanapa.

Dr Mariji Petković Benazzouz sa Fizičkog fakulteta u Beogradu zahvaljujem što je omogućila XRD merenja. Dr Ani Radosavljević-Mihajlović sa Instituta za tehnologiju nuklearnih i

drugih mineralnih sirovina i dr Ljiljani Veselinović sa Instituta tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti u Beogradu zahvaljujem na stručnoj pomoći oko XRD analize.

Prof. dr Katalin Mészáros Szécsény sa Prirodno-Matematičkog fakulteta u Novom Sadu hvala za TG-DSC merenja. Prof. dr Vladimiru Pavloviću sa Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu hvala što je omogućio SEM snimanja, i dr Ivoni Janković-Častvan sa Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu hvala za FESEM snimanja. Veliko hvala dr Ani Mraković, mr Jasmini Savić i dr Vesni Vasić sa Instituta za nuklearne nauke Vinča u Beogradu na stručnoj podršci.

Želim da se zahvalim mnogim ljudima koji su podržavali moju veru u ova naučna istraživanja na razne načine... njihovim prijateljstvom, kreativnim radovima, filmovima, slikama, pesmama, pričama, predstavama, mudrostima...Hvala Jasminu Cvišiću, Mariji Mihajlov, Emiliji Tođeraš, Jasmini Blagojević, Jasmini Jovanović, Dragoslavu Stefanoviću Zozi, Ivoni Pleskonji, Jeleni Trkulji, Miroslavi Vuković, Mariji Kovačević, Mariji Manojlović, sestri Dušici, baki Jeleni....

I na kraju moram da se zahvalim svima onima koju su na razne neakademske načine pokušali da sabotiraju ovo istraživanje. Hvala im, bez njih ova teza sigurno ne bi izgledala ovako!

Prema poslednjim podacima u Srbiji godišnje oboli samo od kancera pluća oko 6000 a umre 4600 ljudi. Ovo moje istraživanje želim da posvetim svim ljudima koji se bore sa kancerom, u nadi da će razvojem nauke i tehnologije jednog dana dobiti svoju neinvazivnu inovativnu terapiju. Nažalost, niko nije hteo da me zaposli i podrži da nastavim ova istraživanja. Možda u nekoj drugoj državi, na nekom drugom kontinentu ili nekom drugom životu...VIVA LA VIDA!

Dušan Milojkov

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Ime i prezime autora: AU Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Dušan Milojkov Doktorska disertacija
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Marija Milanović, docent
Naslov rada: NR	Dobijanje nanofosfora na bazi fluorapatita dopirani Pr ³⁺ jonima za bio-medicinske primene
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2020
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1

Fizički opis rada: FO	6 poglavlja; 102 stranice; 139 referenci; 17 tabela; 42 slike
Naučna oblast: NO	Tehničko-tehnološke nauke, Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Inženjerstvo materijala
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	nanofosfori; fluorapatitni nanokristali; prazeodimijum; sinteza precipitacija/kalcinacija; fluorescentna biosnimanja; ćelije kancera.
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>Luminescentni nanokristali (nanofosfori) na bazi fluorapatita (FAP-a) dopirani elementima retkih zemalja idealni su kontrastni agenti za bio-medicinske primene, kao što su detekcije, snimanja, praćenja i terapije ćelija kancera. Kancer je jedna od najčešćih bolesti modernog doba čiji uspeh lečenja zavisi od rane dijagnostike i neinvazivnog tretmana. Luminescentne nanočestice mogu uneti inovativnu paradigmu u lečenje kancera kombinovanjem biosnimanja, dijagnostike i tretmana. Za studije fluorescentnih biosnimanja nanokristali fluorapatita dopirani retkim zemljama kao kontrastni agenti pružaju značajne prednosti u vidu velikih kontrasta i dugotrajnosti luminescencije, i što je još važnije visoke biokompatibilnosti, netoksičnosti i bioaktivnosti. Glavni ciljevi ove doktorske disertacije su sinteza novih luminescentnih multifotonskih bionanomaterijala na bazi fluorapatita dopiranih jonima prazeodimijuma (Pr^{3+}), njihova karakterizacija i evaluacija primene za fluorescentna biosnimanja kancera. Sintezom nanoprahova u umerenim uslovima metodom ko-precipitacije, a potom sušenjem na $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ i kalcinacijom na temperaturama od 700 i $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ očekuje se pronalaženje najboljih uslova za dobijanje novih nanofosfora koji bi našli i različite bio-medicinske primene u oblasti fluorescentnih biosnimanja. Proučavane su tri vrste PrFAP nanokristala, sa $0,1\%$, $0,5\%$ i 1% atomskih procenta Pr^{3+}, zajedno sa nedopiranim FAP kontrolnim uzorkom. Nivoi energije aktivator jona Pr^{3+} sadrže metastabilna multipletna stanja koja nude mogućnosti efikasnih emisionih linija u više boja u FAP nanokristalima, kao i u infracrvenoj i ultravioletnoj oblasti spektra. Metodom ko-precipitacije na sobnoj temperaturi ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), a potom sušenjem na $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, sintetisani su monofazni heksagonalni nanokristali PrFAPs nepravilnog sfernog oblika. Termičkom analizom sintetisanih uzoraka, na osnovu detektovanih temperaturnih opsega procesa dekarbonacije i dehidroksilacije, utvrđene su temperature</p>

	<p>kalcinacije od 700 i 1000 °C. Termička analiza i karakterizacija uzoraka su pokazale da Pr³⁺ joni dovode do stabilizacije FAP strukture na višim temperaturama, što je pripisano unosu lantanoidnih jona sa specifičnim magnetnim osobinama u sistem i stvaranju jačih privlačnih sila sa O²⁻ anjonima. Nanokristali sušeni na 100 °C i kalcinirani na 1000 °C, zbog prisustva defekata kristalne rešetke koji zadržavaju emisiju Pr³⁺ jona, nisu pokazali luminescentne karakteristike od značaja za primene u medicinskim fluorescentnim biosnimanjima. Kalcinacijom uzoraka na 700 °C izrađen je novi tip aktiviranih fluorapatitnih nanokristala dopiranih prazeodimijumom (PrFAPa) sa ekscitaciono-emisionim profilima u vidljivom delu spektra. Fizičko-hemijska karakterizacija potvrdila je sferne kristale heksagonalne strukture do nanometrske veličine od oko 20 nm. Kvantno-hemijske kalkulacije predvidele su da se joni Pr³⁺ ugrađuju u kristalnu rešetku FAP nanokristala na položaju Ca₂ (6h), što je praćeno deformacijama pozicije F⁻ jona. Pretpostavljeni mehanizam supstitucije je jedan jon Pr³⁺ za jedan Ca²⁺, s delimičnom supstitucijom anjona F⁻ sa O²⁻ i OH⁻ i stvaranjem vakansi usled postizanja neutralnosti sistema. Rezultati <i>in vitro</i> biokompatibilnosti i hemokompatibilnosti pokazali su da nanokristali PrFAPa nisu toksični za žive ćelije. Pored toga, internalizacija PrFAPa nanokristala od strane ćelija kancera kože (A431) i pluća (A549) je proučavana korišćenjem konfokalne mikroskopije i mikroskopije širokog polja zasnovane na fluorescenciji. Nanokristali pokazuju karakterističnu zelenu emisiju na 545 nm (³P₀→³H₅ tranzicija Pr³⁺ jona) i narandžastu emisiju na 600 nm (¹D₂→³H₄), koje su korišćene za razlikovanje od pozadinske autofluorescencije ćelije. Studije dobijenih slika konfokalnom mikroskopijom u plavom, zelenom i crvenom kanalu su otkrile da nanokristali mogu da prepoznaju ćelijsku površinu i da se lepe za nju, ali nisu potvrdile ulazak nanokristala u ćelije. Mikroskopija širokog polja je detektovala emisione prelaze u zelenoj i narandžastoj boji i potvrdila da luminescentni signal dolazi iz unutrašnjosti ćelija. Korišćenjem rezonantne ekscitacije od 488 nm i emisije od 600 nm PrFAPa nanokristala, konfokalnom mikroskopijom ekstrahovan je signal fluorescencije iz unutrašnjosti ćelija kancera. Ortogonalne projekcije u 3D konfokalnim ravnima pokazuju da su nanokristali u stanju da uđu u ćelije kancera i da se raspoređuju po citoplazmi. Sveukupno, ovako dobijeni nanokristali PrFAPa su biokompatibilni i od testiranih uzoraka, aktivirani nanokristali dopirani sa 0,5% Pr³⁺ pokazuju najviše potencijala za primenu u medicinskim fluorescentnim biosnimanjima kao kontrastni agenti.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	29.03.2018.

Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: KO	
Predsednik:	dr Vladimir Srdić, redovni profesor Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu
Član/Mentor:	dr Marija Milanović, docent Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu
Član:	dr Vojislav Stanić, naučni saradnik Institut za nuklearne nauke “Vinča”, Univerzitet u Beogradu

University of Novi Sad
Faculty of Technology

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D. thesis
Author: AU	Dušan Milojkov
Mentor: MN	dr Marija Milanović, associate professor
Title: TI	Preparation of fluorapatite-based nanophosphorus doped with Pr ³⁺ ions for bio-medical applications
Language of text: LT	Serbian (Roman)
Language of abstract: LA	Serbian (Roman)/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2020
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Serbia Bulevar cara Lazara 1

Physical description: PD	6 chapters; 102 pages; 139 references; 17 tables; 42 figures
Scientific field SF	Technical-Technological Sciences, Technology Engineering
Scientific discipline SD	Materials Engineering
Subject, Key words SKW	nanophosphorus; fluorapatite nanocrystals; praseodimium; synthesis precipitation/calcination; fluorescence bioimaging; cancer cells.
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p>Luminescent nanocrystals (nanophosphorus) based on fluorapatite (FAP) doped with rare earth elements are ideal contrast agents for biomedical applications such as cancer cell detection, imaging, tracking and therapy. Cancer is one of the most common diseases of the modern times whose success of the cure depends on early diagnosis and non-invasive treatment. Luminescent nanoparticles can bring an innovative paradigm into the treatment of cancer by combining bioimaging, diagnostics and treatment. Rare earth doped fluorapatite nanocrystals as contrast agents for studies of fluorescence bioimaging, offer significant advantages in terms of high contrasts and long-term luminescence, and more importantly high biocompatibility, non-toxicity and bioactivity. The main objectives of this doctoral dissertation are the synthesis of novel luminescent multiphoton bionanomaterials based on fluorapatites doped with praseodymium ions (Pr^{3+}), their characterization and evaluation of their application for cancer fluorescence bioimaging. Synthesis of nanopowders under moderate conditions by the co-precipitation method, followed by dried at 110 °C and calcination at 700 and 1000 °C, is expected to find the best conditions for obtaining new nanophosphors that would find different bio-medical applications in the field of fluorescence bioimaging. Three types of PrFAP nanocrystals were studied, with 0,1%, 0,5%, and 1% atomic percentages of Pr^{3+}, together with an undoped FAP control sample. Energy levels of the Pr^{3+} ion activator contain metastable multiplet states that offer the possibility of efficient multi-color emission lines in FAP nanocrystals as well as in the infrared and ultraviolet regions of the spectrum. Single-phase hexagonal nanocrystals PrFAPs of irregular spherical shape were synthesized by the method of co-precipitation at room temperature (25 °C) and then drying at 110 °C. Thermal analysis of the synthesized samples, based on the detected temperature ranges of the decarbonation and dehydroxylation processes, determined calcination temperatures of 700 and 1000 °C. Thermal</p>

analysis with characterization showed that Pr^{3+} ions lead to stabilization of the FAP structure at higher temperatures, which was attributed to the entry of lanthanoid ions with specific magnetic properties into the system and the creation of stronger attractive forces with O^{2-} anions. Nanocrystals dried at 100 °C and calcined at 1000 °C, due to the presence of crystal lattice defects that quench the emission of Pr^{3+} ions, did not show luminescent characteristics of significance for applications in medical fluorescence imaging. Calcination of the samples at 700 °C produced a new type of activated praseodymium doped fluorapatite nanocrystals (PrFAPa) with excitation-emission profiles in the visible part of the spectrum. Physicochemical characterization confirmed spherical crystals of hexagonal structure up to a nanometer size of about 20 nm. Quantum-chemical calculations predicted that Pr^{3+} ions would be embedded in the crystal lattice of FAP nanocrystals at the Ca2 position (*6h*), which was followed by deformations of the F^- ion position. The assumed substitution mechanism is one Pr^{3+} ion for one Ca^{2+} , with partial substitution of F^- anions with O^{2-} and OH^- and creation of vacancies due to achieving system neutrality. The results of *in vitro* biocompatibility and hemocompatibility showed that PrFAP nanocrystals were not toxic to living cells. In addition, the internalization of PrFAPa nanocrystals by skin (A431) and lung (A549) cancer cells was studied using fluorescence-based confocal microscopy and wide-field microscopy. The nanocrystals show characteristic green emission at 545 nm ($^3\text{P}_0 \rightarrow ^3\text{H}_5$ transition of Pr^{3+} ion) and orange emission at 600 nm ($^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{H}_4$), which we use to discriminate from cell autofluorescence. Studies of the images obtained by confocal microscopy in the blue, green, and red channels revealed that nanocrystals could recognize the cell surface and adhere to it, but they did not confirm the entry of nanocrystals into the cells. The wide-field microscopy detected emission transitions in green and orange color, and confirmed that the luminescent signal was coming from inside the cells. Using resonant excitation of PrFAP nanocrystals at 488 nm and emission of 600 nm, confocal microscopy extracted the fluorescence signal from inside the cancer cells. Orthogonal projections across 3D confocal stacks show that the nanocrystals are able to enter the cells positioning themselves within the cytoplasm. Overall, the obtained PrFAPa nanocrystals are biocompatible and of the tested types, the 0,5% Pr^{3+} doped nanocrystals show the highest promise as a tracking nanoparticle probe for bioimaging applications.

Accepted on Senate on:
AS

29.03.2018.

Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	
President:	Dr Vladimir Srđić, full professor Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad
Member/Mentor	Dr Marija Milanović, associate professor Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad
Member:	Dr Vojislav Stanić, research associate Institute of nuclear science “Vinča”, University of Belgrade

Sadržaj

Slike	I
Tabele	VI
Izvod	VII
Abstract	IX
1. Uvod	1
2. Teorijski deo	4
2.1. Kristalna struktura fluorapatita	7
2.2. Supstitucije u kristalnom matriksu fluorapatita	12
2.2.1. Tip A-supstitucija	12
2.2.2. Tip B-supstitucija	16
2.3. Fenomen luminescencije fluorapatita dopiranog retkim zemljama	17
2.3.1. Prazeodimijum jon (Pr^{3+}) kao dopant	22
2.4. Sinteza nanofosfora na bazi fluorapatita za bio-medicinske primene	24
2.4.1. Sinteza u čvrstoj fazi	24
2.4.2. Sinteza iz rastvora	25
3. Eksperimentalni deo	29
3.1. Sinteza luminescentnih nanokristala čistog FAP-a i FAP-a dopiranih Pr^{3+} jonima	29
3.2. Metode fizičko-hemijske karakterizacije nanokristala	31
3.2.1. Rendgenska difrakcija praha (XRD)	31
3.2.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)	32
3.2.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) sa elementalnom analizom (EDX)	32
3.2.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija sa emisijom polja (FE-SEM)	32
3.2.5. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) sa elementalnom analizom (EDX)	33
3.2.6. Difrakcija laserske svetlosti (DLS)	33
3.2.7. Termijske metode analize (TG-DSC)	34
3.3. Ispitivanja nanokristala fluorescentnom spektroskopijom i analiza spektara	35
3.4. Predviđanje strukturnih promena kvantno-hemijskim proračunima	37
3.5. Studija hemokompatibilnosti	38

3.6. Studija biokompatibilnosti	39
3.6.1. Ćelijska kultura	40
3.6.2. Studije vijabilnosti ćelija	40
3.7. Studije biosnimanja fluorescentnim mikroskopima	41
3.7.1. Priprema uzoraka za snimanje	42
3.7.2. Fluorescentna mikroskopija širokog polja	42
3.7.3. Konfokalna mikroskopija	43
3.7.4. Analiza slike	44
4. Rezultati i diskusija	45
4.1. Fizičko-hemijska karakterizacija dobijenih nanofosfora	45
4.1.1. Sintetisani uzorci sušeni na 110 °C	45
4.1.2. Termički tretirani uzorci na 700 °C i 1000 °C	56
4.2. Evaluacija strukturnih promena dopiranjem Pr³⁺ u FAP kristalnom sistemu pomoću kvantno-hemijskih proračuna	72
4.3. Evaluacija aktiviranih nanokristala kao kontrastnih agenata za biosnimanje ćelija kancera	75
4.3.1. Predviđanje interakcija ćelija i nanokristala na osnovu njihove hidrodinamičke veličine i površinskog naboja	75
4.3.2. Biokompatibilnos i hemokompatibilnost nanokristala	76
4.3.3. Studija usvajanja nanokristala od strane ćelija pomoću luminescentne konfokalne mikroskopije i mikroskopije širokog polja	78
5. Zaključci	86
6. Literatura	91

Slike

- Slika 2.1.** (a) Šematski prikaz penetracije svetlosti različitih talasnih dužina (od UV do IR oblasti) kroz kožu i tkivo. (b) Transfer energije kod različitih modela luminescencije *down*-konverzionu (DC) pod dejstvom UV svetlosti, multifotonska *down*-konverzionu (MDC) ekscitovana u vidljivoj oblasti spektra i *up*-konverzionu (UC) ekscitovana u IR oblasti (modifikovano u odnosu na [48])..... 6
- Slika 2.1.1.** (a) Heksagonalna jedinična ćelija FAP-a. (b) Pogled odozgo na centralni F atom u trouglovima formiranim od Ca₂ atoma [51]..... 8
- Slika 2.1.2.** (a) Tetraedar PO₄ sa okruženjem u apatitnoj kristalnoj rešetci. (b,c) Ca₁₀O₉ i Ca₂O₆F poliedri za fluorapatitnu strukturu. (d) Povezivanje F atoma u koloni okruženih Ca₂ atomima [54]..... 10
- Slika 2.1.3.** Raspored atoma u kristalu fluorapatita projekcija na (001) (2x2 ćelije - pogled [0001]). P atom je žuto obojen, O atomi su crveni, Ca₁ plave boje, Ca₂ bele boje i F atom zelene boje [54]..... 11
- Slika 2.2.1.** Prikaz mogućih položaja anjona u heksagonalnoj apatitnoj strukturi u sve tri apatitne faze. Ravni predstavljaju ogledalske ravni na $z=1/4$ i $3/4$, od kojih svaka sadrži trougao od Ca₂ atoma (povezanih "vezama"). F atom je u sredini trougla na (0,0,1/4). Cl atom je pomeren ispod ravni ogledala na $z = 3/4$, a O atom (iz OH) pomeren je iznad te ravni [55]..... 13
- Slika 2.3.1.** Prelazi iz osnovnog singletnog i moguća pobuđena singletna ili tripletna elektronska stanja 18
- Slika 2.3.2.** Jablonski dijagram procesa fluorescencije i fosforescencije. Kada se ekscituju molekuli prelaze iz osnovnog stanja S₀ u pobuđeno stanje S₁ ili S₂. Relaksacijom iz S₁ stanja dolazi do fluorescencije, a relaksacijom iz T₁ stanja dolazi do fosforescencije..... 19
- Slika 2.3.3.** Dieke-ov dijagram energetske nivoa trovalentnih jona retkih zemalja..... 21
- Slika 2.3.4.** Dijagram energetske nivoa u Pr³⁺ jonu [77]..... 23
- Slika 2.4.1.** (a) TEM mikrograf pokazuje Eu-FAP nanokristale štapićaste morfologije. (b) Crvena emisija Eu-FAP nanoprahova pod UV ekscitacijom. (c) Plava fluorescencija od DAPI i crvena fluorescencija od Eu-FAP nanočestica posmatrane u citoplazmi i nukleusu [10]..... 26

Slika 2.4.2.	(a) TEM mikrograf FAP:Yb/Ho nanokristala posle hidrotermalne sinteze na 160 °C. (b) <i>Up</i> -konverzionna emisija kristala sa (puna linija) i bez (isprekidana linija) aktivacije na 700 °C, sa gore ubačenim slikama emisije od konfokalnog lasera. (c) Slike multifotonske konfokalne luminescencije (ekscitovane sa 980 nm) [3].....	27
Slika 3.3.1.	Grafički prikaz ekscitaciono-emisionih matrica sa kontur mapom (a) nanokristala ZnS i (b) dopiranih ZnSMn nanokristala. Emisija pokazuje jasan crveni pomeraj dopiranjem Mn [37].....	35
Slika 3.3.2.	Grafički prikaz ekstrahovanih komponenata MRC-ALS metodom iz ekscitaciono-emisione mape (a) nanokristala ZnS i (b) dopiranih nanokristala ZnSMn. Dopiranjem Mn ostaju komponente sa maksimumom na oko 450 i 550 nm, a formiraju se nove komponente na 600 i 650 nm zbog nastanka novih hemijskih veza [37].....	36
Slika 3.4.1.	Model sistem za kvantno-hemijske proračune za reprodukciju fluorescentnih spektara dopiranih fluorapatita [29].....	38
Slika 3.6.1.	Studije vijabilnosti ćelija pomoću <i>AlmarBlue</i> reagensa.....	41
Slika 3.7.1.	Pločica sa μ -slajdovima (Ibidi GmbH) za pripremu ćelija za biosnimanja na luminescentnom konfokalnom i mikroskopu širokog polja.....	42
Slika 3.7.2.	Fluorescentni mikroskop širokog polja (NikonTi-E) [46].....	43
Slika 3.7.3.	Konfokalni mikroskop Zeiss LSM 780 [47].....	44
Slika 4.1.1.	Strukturalna analiza nanokristala FAPs i PrFAPs na osnovu rendgenske difrakcije praha.....	46
Slika 4.1.2.	Frekvencije vibracionih traka na FTIR spektrima FAPs i PrFAPs uzoraka....	48
Slika 4.1.3.	Frekvencije vibracionih traka na FAR IR spektrima FAPs i PrFAPs uzoraka..	49
Slika 4.1.4.	Morfološka analiza sintetisanih nanoprahova na bazi SEM mikrografa (a) FAPs, (b) Pr FAP0.1s, (c) PrFAP0.5s i (d) PrFAP1s uzorka. (e) EDS elementarna analiza PrFAP1s uzorka.....	50
Slika 4.1.5.	Ekscitaciono-emisione mape (levo) i dominantne komponente fluorescentnih spektara K1, K2 i K3 identifikovane MCR-ALS analizom (desno). (a) FAPs, (b) PrFAP0.1s (c) PrFAP0.5s i (d) PrFAP1s uzorak.....	52

Slika 4.1.6.	Termička analiza sintetisanih uzoraka. (a) TG krive FAPs i PrFAP1s uzorka. (b) DSC krive FAPs i PrFAP1s uzorka.....	54
Slika 4.1.7.	Strukturna analiza aktiviranih nanokristala FAPa i PrFAPa na 700 °C na osnovu rendgenske difrakcije praha [115].....	57
Slika 4.1.8.	Strukturna analiza nanokristala FAPk i PrFAPk kalciniranih na 1000 °C na osnovu rendgenske difrakcije praha.....	58
Slika 4.1.9.	Frekvencije vibracionih traka na FTIR spektrima FAPa i PrFAPa uzoraka aktiviranih na 700 °C [115].....	59
Slika 4.1.10.	Frekvencije vibracionih traka na FAR IR spektrima FAPa i PrFAPa uzoraka aktiviranih na 700 °C.....	61
Slika 4.1.11.	Frekvencije vibracionih traka na FTIR spektrima FAPk i PrFAPk uzoraka kalciniranih na 1000 °C	62
Slika 4.1.12.	Frekvencije vibracionih traka na FAR IR spektrima FAPk i PrFAPk uzoraka kalciniranih na 1000 °C.....	63
Slika 4.1.13.	Morfološka analiza aktiviranih nanokristala na bazi FESEM mikrografa (a) FAPa, (b) Pr FAP0.1a (c) PrFAP0.5a i (d) PrFAP1a uzorka. (e) TEM i EDS elementarna analiza PrFAP0.5a uzorka [115].....	64
Slika 4.1.14.	Morfološka analiza kalciniranih nanokristala na bazi SEM mikrografa (a) FAPk, (b) PrFAP0.1k (c) PrFAP0.5k i (d) PrFAP1k uzorka. (e) EDS elementarna analiza PrFAP1k uzorka.....	66
Slika 4.1.15.	Ekscitaciono-emisione mape (levo) i dominantne komponente fluorescentnih spektara identifikovane MCR-ALS analizom (desno). (a) FAPa, (b) Pr FAP0.1a (c) PrFAP0.5a i (d) PrFAP1a uzorka aktiviranih na 700 °C [115].....	67
Slika 4.1.16.	Ekscitaciono-emisione mape (levo) i dominantne komponente fluorescentnih spektara K1 i K2 identifikovane MCR-ALS analizom (desno). (a) FAPk, (b) PrFAP0.1k (c) PrFAP0.5k i (d) PrFAP1k uzorka kalciniranih na 1000 °C.	69
Slika 4.2.1.	Teorijska strukturna analiza. (a) Optimizovana struktura FAP fragmenta, ekstrahovana iz kristalne strukture korišćenjem B3LIP metode. Fluoridni jon se nalazi u ravni formiranoj sa Ca ²⁺ jonima, jednako udaljenim od svakog od njih (rastojanje od 2,25 Å). Ca ²⁺ ioni su razdvojeni na udaljenosti	

od 3.89 Å. Fosfatni joni istovremeno stupaju u interakciju sa dva Ca^{2+} jona, pri čemu prvi interaguje preko dva atoma kiseonika (bifurkirana interakcija), dok je sa drugim preko jednog atoma kiseonika (monofurkirana interakcija). (b) Ilustracija parametara koji se koriste za opisivanje strukture nPr-FAP sistema (optimizovanom metodom UB3LIP), gde M1 do M3 predstavljaju Ca^{2+} lokacije koje treba delimično zameniti Pr^{3+} jonima [115]..... 73

Slika 4.3.1. Karakterizacija veličine i površinskog napona aktiviranih nanokristala. (a) DLS distribucija veličine čestica i (b) zeta-potencijal FAPa i PrFAPa uzoraka [115]..... 75

Slika 4.3.3. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti FAPa i PrFAPa uzoraka sa 0.1, 0.5 and 1% Pr^{3+} . Čelije su inkubirane sa nanočesticama tokom 72h na 37 °C, ispitan je *Resazurin* test vijabilnosti i rezultati su normalizovani u odnosu na netretirane kontrolne čelije. (a) Vijabilnost čelija za linije A549 čelije i (b) A431 čelije inkubirane sa različitim koncentracijama FAPa i PrFAPa nanokristala. Transmisiona slika koje pokazuju morfologije (c) čelija A549 bez nanokristala (gore) i čelije inkubirane sa 125 µg/mL PrFAP0.5a (dole); (d) A431 čelije bez nanokristala (gore) i čelije inkubirane sa 250 µg/mL of PrFAP1a (dole) [115]..... 77

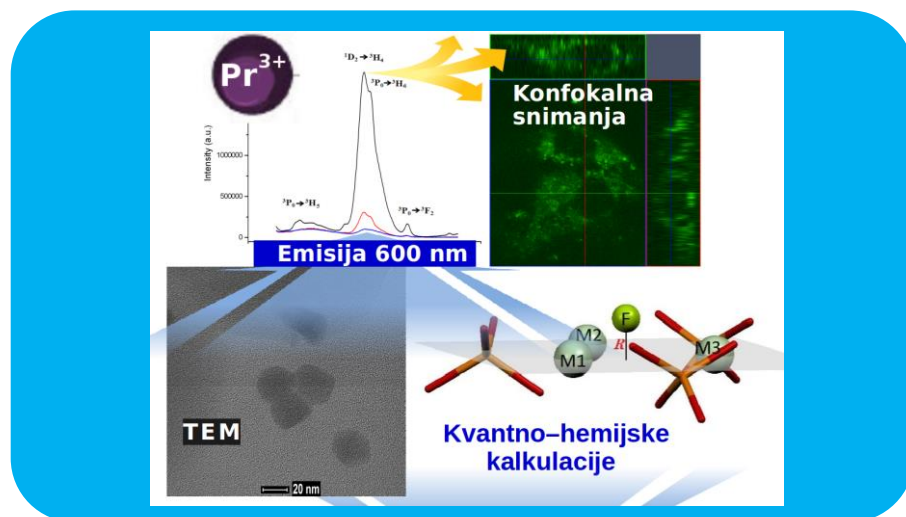
Slika 4.3.4. Optička karakterizacija aktiviranih nanokristala. (a) Spektar ekscitacije za FAP kontrolu (detektovan na maksimalnoj emisiji od 450 nm) i za FAP-Pr uzorke (detektovane kod emisije max. 600 nm). (b) Dijagram energetskih nivoa Pr^{3+} jona sa karakterističnim prelazima, (c) Emisioni spektri PrFAPa uzoraka pod rezonantnom ekscitacijom na 488 nm i (d) pod nerezonantnom ekscitacijom na 500 nm. Prelazi u Pr^{3+} jonu $^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{H}_4$ i narandžaste emisione trake na oko 600 nm su dominantne [115]..... 79

Slika 4.3.5. Konfokalne slike luminescencije čelija A431 sa i bez dodanih FAP nanokristala, merene u identičnim eksperimentalnim uslovima sa ekscitacijama na 405, 488 i 561 nm; (prvi red) samo čelije (autofluorescencija), (drugi red) čelije A431 inkubirane 48h sa 240 µg/mL FAPa i (treći red) čelije inkubirane 48h na 37 °C sa 240 µg/mL PrFAP0.5a kristala..... 81

- Slika 4.3.6.** a) Opsezi detekcije korišćeni za studiju konfokalnog biosnimanja. Nanokristali FAP-a sa različitim koncentracijama Pr^{3+} dopanta imaju karakteristični odnos pikova u zelenoj i crvenoj oblasti. b) Konfokalne slike luminescencije nanokristala sa uklonjenom autofluorescencijom ćelija. Pregled svih razlika slika dobijenih ekscitacijama (405 nm minus 488 nm) u talasnom opsegu 516-586 nm (zeleno) i 588-730 nm (crveno) (skala 20 μm). 82
- Slika 4.3.7.** Slike fluorescentne mikroskopije širokog polja A431 ćelija dobijene pod 405 i 488 nm laserskom ekscitacijom (prvi i drugi red) i odgovarajućim transmisionim slikama (treći red) nakon 48h inkubacije sa 240 $\mu\text{g/mL}$ PrFAP0.5a (gore) i kontrolnim ćelijama bez nanokristala (dole) [115]..... 83
- Slika 4.3.8.** Analiza internalizacije nanokristala od strane ćelija bazirana na konfokalnim optičkim preseccima na odabranim z-visinama (levo) i ortogonalne projekcije na visini od 6 μm (desno) za A431 ćelije inkubirane 48h sa PrFAP0.5a [115] 84

Tabele

Tabela 2.1.1.	Simetrijski položaji neekvivalentnih atoma u FAP-u u prostornoj grupi $P6_3/m$ [54].....	11
Tabela 3.1.1.	Lista hemikalija korišćenih za sintezu FAP i PrFAP nanokristala.....	30
Tabela 3.1.2.	Nomenklatura sintetisanih uzoraka na osnovu atomskog udela Pr^{3+} i temperature obrade.....	30
Tabela 4.1.1.	Parametri jediničnih ćelija i veličina kristalita FAPs i PrFAPs uzoraka.....	47
Tabela 4.1.2.	Dodeljivanje FTIR vibracionih traka za FAPs i PrFAPs uzorke.....	48
Tabela 4.1.3.	Dodeljivanje FAR IR vibracionih traka za FAPs i PrFAPs uzorke.....	49
Tabela 4.1.4.	Vrednosti maksimuma komponenata MCR-ALS analize.....	52
Tabela 4.1.5.	Parametri jediničnih ćelija i veličina kristalita FAPa i PrFAPa uzoraka nanokristala aktiviranih na $700\text{ }^\circ\text{C}$ [115].....	57
Tabela 4.1.6.	Parametri jediničnih ćelija i veličina kristalita FAPk i PrFAPk uzoraka kalciniranih na $1000\text{ }^\circ\text{C}$	58
Tabela 4.1.7.	Dodeljivanje FTIR vibracionih traka za FAPa i PrFAPa uzorke aktivirane na $700\text{ }^\circ\text{C}$ [115].....	60
Tabela 4.1.8.	Dodeljivanje FAR IR vibracionih traka za FAPk i PrFAPk uzorke aktivirane na $700\text{ }^\circ\text{C}$	61
Tabela 4.1.9.	Dodeljivanje FTIR vibracionih traka za FAPk i PrFAPk uzorke kalcinirane na $1000\text{ }^\circ\text{C}$	62
Tabela 4.1.10.	Dodeljivanje FAR IR vibracionih traka za FAPk i PrFAPk uzorke kalcinirane na $1000\text{ }^\circ\text{C}$	63
Tabela 4.1.11.	Vrednosti maksimuma komponenata MCR-ALS analize.....	68
Tabela 4.1.12.	Vrednosti maksimuma komponenata MCR-ALS analize.....	69
Tabela 4.2.1.	Vrednosti parametara koji se koriste za opisivanje geometrije Pr^{3+} -FAP sistema, izražene u Å (M-O, M-M, i R rastojanju) i Å ³ (izračunate zapremine) [115].....	74
Tabela 4.3.1.	Vrednosti srednje veličine i zeta potencijala aktiviranih nanokristala [115]..	76



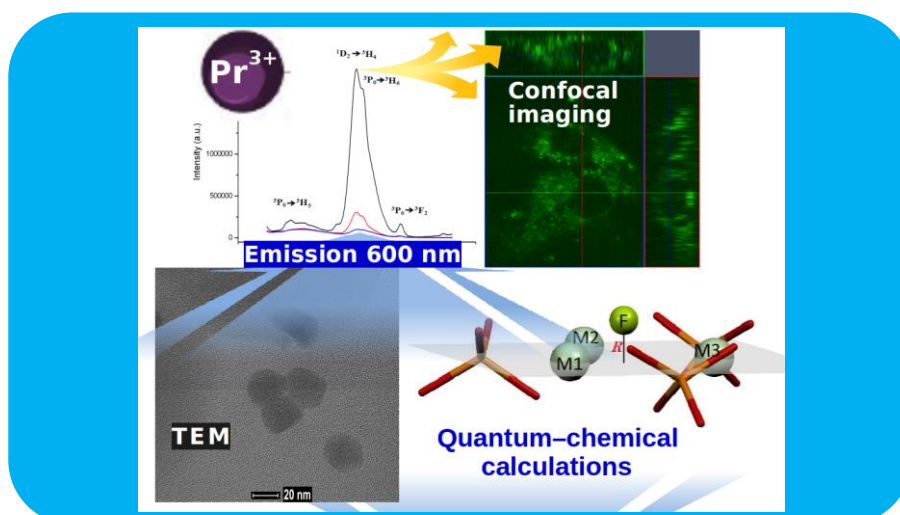
Izvod

Luminescentni nanokristali (nanofosfori) na bazi fluorapatita (FAP-a) dopirani elementima retkih zemalja idealni su kontrastni agenti za bio-medicinske primene, kao što su detekcije, snimanja, praćenja i terapije ćelija kancera. Kancer je jedna od najčešćih bolesti modernog doba čiji uspeh lečenja zavisi od rane dijagnostike i neinvazivnog tretmana. Luminescentne nanočestice mogu uneti inovativnu paradigmu u lečenje kancera kombinovanjem biosnimanja, dijagnostike i tretmana. Za studije fluorescentnih biosnimanja nanokristali fluorapatita dopirani retkim zemljama kao kontrastni agenti pružaju značajne prednosti u vidu velikih kontrasta i dugotrajnosti luminescencije, i što je još važnije visoke biokompatibilnosti, netoksičnosti i bioaktivnosti.

Glavni ciljevi ove doktorske disertacije su sinteza novih luminescentnih multifotonskih bionanomaterijala na bazi fluorapatita dopiranih jonima praeodimijuma (Pr^{3+}), njihova karakterizacija i evaluacija primene za fluorescentna biosnimanja kancera. Sintezom nanoprahova u umerenim uslovima metodom ko-precipitacije, a potom sušenjem na $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ i kalcinacijom na temperaturama od 700 i $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ očekuje se pronalaženje najboljih uslova za dobijanje novih nanofosfora koji bi našli i različite bio-medicinske primene u oblasti fluorescentnih biosnimanja. Proučavane su tri vrste PrFAP nanokristala, sa $0,1\%$, $0,5\%$ i 1% atomskih procenta Pr^{3+} , zajedno sa nedopiranim FAP kontrolnim uzorkom. Nivoi energije aktivator jona Pr^{3+} sadrže metastabilna multipletna stanja koja nude mogućnosti efikasnih emisionih linija u više boja u FAP nanokristalima, kao i u infracrvenoj i ultravioletnoj oblasti spektra.

Metodom ko-precipitacije na sobnoj temperaturi (25 °C), a potom sušenjem na 110 °C, sintetisani su monofazni heksagonalni nanokristali PrFAPs nepravilnog sfernog oblika. Termičkom analizom sintetisanih uzoraka, na osnovu detektovanih temperaturnih opsega procesa dekarbonacije i dehidroksilacije, utvrđene su temperature kalcinacije od 700 i 1000 °C. Termička analiza i karakterizacija uzoraka su pokazale da Pr³⁺ joni dovode do stabilizacije FAP strukture na višim temperaturama, što je pripisano unosu lantanoidnih jona sa specifičnim magnetnim osobinama u sistem i stvaranju jačih privlačnih sila sa O²⁻ anjonima. Nanokristali sušeni na 100 °C i kalcinirani na 1000 °C, zbog prisustva defekata kristalne rešetke koji zadržavaju emisiju Pr³⁺ jona, nisu pokazali luminescentne karakteristike od značaja za primene u medicinskim fluorescentnim biosnimanjima. Kalcinacijom uzoraka na 700 °C izrađen je novi tip aktiviranih fluorapatitnih nanokristala dopiranih prazeodimijumom (PrFAPa) sa ekscitaciono-emisionim profilima u vidljivom delu spektra. Fizičko-hemijska karakterizacija potvrdila je sferne kristale heksagonalne strukture do nanometerske veličine od oko 20 nm. Kvantno-hemijske kalkulacije predvidele su da se joni Pr³⁺ ugrađuju u kristalnu rešetku FAP nanokristala na položaju Ca₂ (6h), što je praćeno deformacijama pozicije F⁻ jona. Pretpostavljeni mehanizam supstitucije je jedan jon Pr³⁺ za jedan Ca²⁺, s delimičnom supstitucijom anjona F⁻ sa O²⁻ i OH⁻ i stvaranjem vakansi usled postizanja neutralnosti sistema. Rezultati *in vitro* biokompatibilnosti i hemokompatibilnosti pokazali su da nanokristali PrFAPa nisu toksični za žive ćelije. Pored toga, internalizacija PrFAPa nanokristala od strane ćelija kancera kože (A431) i pluća (A549) je proučavana korišćenjem konfokalne mikroskopije i mikroskopije širokog polja zasnovane na fluorescenciji. Nanokristali pokazuju karakterističnu zelenu emisiju na 545 nm (³P₀→³H₅ tranzicija Pr³⁺ jona) i narandžastu emisiju na 600 nm (¹D₂→³H₄), koje su korišćene za razlikovanje od pozadinske autofluorescencije ćelije. Studije dobijenih slika konfokalnom mikroskopijom u plavom, zelenom i crvenom kanalu su otkrile da nanokristali mogu da prepoznaju ćelijsku površinu i da se lepe za nju, ali nisu potvrdile ulazak nanokristala u ćelije. Mikroskopija širokog polja je detektovala emisione prelaze u zelenoj i narandžastoj boji i potvrdila da luminescentni signal dolazi iz unutrašnjosti ćelija. Korišćenjem rezonantne ekscitacije od 488 nm i emisije od 600 nm PrFAPa nanokristala, konfokalnom mikroskopijom ekstrahovan je signal fluorescencije iz unutrašnjosti ćelija kancera. Ortogonalne projekcije u 3D konfokalnim ravnima pokazuju da su nanokristali u stanju da uđu u ćelije kancera i da se raspoređuju po citoplazmi. Sveukupno, ovako dobijeni nanokristali PrFAPa su biokompatibilni i od testiranih uzoraka, aktivirani nanokristali dopirani sa 0,5% Pr³⁺ pokazuju najviše potencijala za primenu u medicinskim fluorescentnim biosnimanjima kao kontrastni agenti.

Ključne reči: nanofosfori; fluorapatitni nanokristali; prazeodimijum; sinteza precipitacija/kalcinacija; fluorescentna biosnimanja; ćelije kancera.



Abstract

Luminescent nanocrystals (nanophosphorus) based on fluorapatite (FAP) doped with rare earth elements are ideal contrast agents for biomedical applications such as cancer cell detection, imaging, tracking and therapy. Cancer is one of the most common diseases of the modern times whose success of the cure depends on early diagnosis and non-invasive treatment. Luminescent nanoparticles can bring an innovative paradigm into the treatment of cancer by combining bioimaging, diagnostics and treatment. Rare earth doped fluorapatite nanocrystals as contrast agents for studies of fluorescence bioimaging, offer significant advantages in terms of high contrasts and long-term luminescence, and more importantly high biocompatibility, non-toxicity and bioactivity.

The main objectives of this doctoral dissertation are the synthesis of novel luminescent multiphoton bionanomaterials based on fluorapatites doped with praseodymium ions (Pr^{3+}), their characterization and evaluation of their application for cancer fluorescence bioimaging. Synthesis of nanopowders under moderate conditions by the co-precipitation method, followed by dried at 110 °C and calcination at 700 and 1000 °C, is expected to find the best conditions for obtaining new nanophosphors that would find different bio-medical applications in the field of fluorescence bioimaging. Three types of PrFAP nanocrystals were studied, with 0,1%, 0,5%, and 1% atomic percentages of Pr^{3+} , together with an undoped FAP control sample. Energy levels of the Pr^{3+} ion activator contain metastable multiplet states that offer the possibility of efficient multi-color emission lines in FAP nanocrystals as well as in the infrared and ultraviolet regions of the spectrum.

Single-phase hexagonal nanocrystals PrFAPs of irregular spherical shape were synthesized by the method of co-precipitation at room temperature (25 °C) and then drying at 110 °C. Thermal analysis of the synthesized samples, based on the detected temperature ranges of the decarbonation and dehydroxylation processes, determined calcination temperatures of 700 and 1000 °C. Thermal analysis with characterization showed that Pr³⁺ ions lead to stabilization of the FAP structure at higher temperatures, which was attributed to the entry of lanthanoid ions with specific magnetic properties into the system and the creation of stronger attractive forces with O²⁻ anions. Nanocrystals dried at 100 °C and calcined at 1000 °C, due to the presence of crystal lattice defects that quench the emission of Pr³⁺ ions, did not show luminescent characteristics of significance for applications in medical fluorescence imaging. Calcination of the samples at 700 °C produced a new type of activated praseodymium doped fluorapatite nanocrystals (PrFAPa) with excitation-emission profiles in the visible part of the spectrum. Physicochemical characterization confirmed spherical crystals of hexagonal structure up to a nanometer size of about 20 nm. Quantum-chemical calculations predicted that Pr³⁺ ions would be embedded in the crystal lattice of FAP nanocrystals at the Ca2 position (*6h*), which was followed by deformations of the F⁻ ion position. The assumed substitution mechanism is one Pr³⁺ ion for one Ca²⁺, with partial substitution of F⁻ anions with O²⁻ and OH⁻ and creation of vacancies due to achieving system neutrality. The results of *in vitro* biocompatibility and hemocompatibility showed that PrFAP nanocrystals were not toxic to living cells. In addition, the internalization of PrFAPa nanocrystals by skin (A431) and lung (A549) cancer cells was studied using fluorescence-based confocal microscopy and wide-field microscopy. The nanocrystals show characteristic green emission at 545 nm (³P₀→³H₅ transition of Pr³⁺ ion) and orange emission at 600 nm (¹D₂→³H₄), which we use to discriminate from cell autofluorescence. Studies of the images obtained by confocal microscopy in the blue, green, and red channels revealed that nanocrystals could recognize the cell surface and adhere to it, but they did not confirm the entry of nanocrystals into the cells. The wide-field microscopy detected emission transitions in green and orange color, and confirmed that the luminescent signal was coming from inside the cells. Using resonant excitation of PrFAP nanocrystals at 488 nm and emission of 600 nm, confocal microscopy extracted the fluorescence signal from inside the cancer cells. Orthogonal projections across 3D confocal stacks show that the nanocrystals are able to enter the cells positioning themselves within the cytoplasm. Overall, the obtained PrFAPa nanocrystals are biocompatible and of the tested types, the 0,5% Pr³⁺ doped nanocrystals show the highest promise as a tracking nanoparticle probe for bioimaging applications.

Keywords: nanophosphorus; fluorapatite nanocrystals; praseodimium; synthesis precipitation/calcination; fluorescence bioimaging; cancer cells.

1. Uvod

Luminescentni nanomaterijali na bazi fluorapatita [$(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_5\text{F}_2)$, (FAP)] dopirani jonima retkih zemalja se poslednjih deset godina intenzivno ispituju kao nanofosfori za širok spektar biomedicinskih primena kao što su nanokristali za bioobeležavanja, dostavu lekova i multimodalna snimanja ćelija i tkiva, biomaterijali za reparaciju koštanog tkiva, i nanoprahovi za fluorescentne lampe i diode za fototerapije i senzore [1-5]. Fluorapatitna heksagonalna kristalna struktura se pokazala kao izrazito hemijski stabilna, netoksična i kao odlična matrica za dopiranje jona retkih zemalja i dizajniranje inovativnih kontrastnih agenata za fluorescentna biosnimanja [1-5]. Fluoridni joni u kristalnoj rešetki apatita doprinose formiranju stabilnih i biokompatibilnih luminescentnih materijala sa niskim energijama vibracija, kao i fononskih energija [2, 3]. Ovakav energetski profil kristalne rešetke fluorapatita podržava fluorescentne oštre prelaze u atomima retkih zemalja, uključujući i *up*-konverzionu i *down*-konverzionu luminescenciju. Ukoliko se porede sa luminescentnim organskim jedinjenjima i kvantnim tačkama, nanokristali na bazi fluorapatita dopirani jonima retkih zemalja pokazuju niz prednosti kao što su fotostabilnost luminescencije, oštre emisije prelaze u vidljivom delu spektra i netoksičnost [1-5]. U kristalnoj rešetki FAP-a najveća elektronegativnost F^- jona takođe doprinosi njegovoj biokompatibilnosti i složenim interakcijama tkiva i nanomaterijala, što su sve važne osobine za dugoročne studije biosnimanja [6, 7]. Pored toga, površina nanočestica FAP-a može da se funkcionalizuje sa različitim grupama i tako postane korisna za lečenje mnogih bolesti, kao što su kliničko lečenje bolesti muskuloskeletnog sistema, kancera i neurodegenerativnih bolesti [8-10]. Fluorescentno snimanje je tehnika od velikog značaja za biološke studije i kliničke aplikacije zbog visokih temporalnih i prostornih rezolucija, koje u mnogome zavisi od razvoja inovativnih kontrastnih agenata [11]. Pogotovo se očekuje da će luminescentne nanočestice uvesti revoluciju u ranom dijagnostikovanju i lečenju kancera [12-16].

Za sada se FAP već prilično često koristi kao kontrastni agent za biosnimanja, ali u većini objavljenih studija opisan je samo ograničen broj jona dopanta, poput $\text{Ib}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ sistema za *up*-konverzionu luminescenciju sa ekscitacijom u infra-crvenoj (IR) oblasti spektra [2-5], i Eu^{3+} kao važan *down*-konverzioni emiter crvene luminescencije u vidljivoj oblasti [9, 10]. Nedavno je razvijena nanočestica fluorapatita ko-dopirana $\text{Ib}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ kao snažni emiter blizu-infracrvene (NIR) oblasti, koji može biti potencijalno efikasniji od $\text{Ib}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ za detekciju dubokih tkivnih struktura, koristeći prednosti blizu-infracrvenog biološkog prozora [2-4, 17]. FAP dopiran jonima prazeodimijuma (Pr^{3+}) za *down*-konverzionu luminescenciju, koja se može pobuditi u ultravioletnoj (UV) i vidljivoj oblasti spektra, nije još uvek korišćen kao kontrast u studijama biosnimanja. Jon Pr^{3+} je izabran za trenutnu studiju uzimajući u obzir njegova jedinstvena optička svojstva, koja se ogledaju u podešavajućim talasnim dužinama emisija u rasponu od UV do infracrvenog područja spektra [18]. Pored toga, Pr^{3+} poseduje dobre antibakterijske i antifungalne karakteristike, i smatra se lakom retkom zemaljom i netoksičnom u odgovarajućim koncentracijama [19, 20]. Takođe, Pr^{3+} je zajedno sa drugim elementima iz grupe retkih zemlji privukao interesovanje poslednjih godina kao antikancerogeno sredstvo, jer pokazuje efekat supresije proliferacije različitih ćelijskih linija kancera [20-22]. Nanočestice FAP-a takođe su pokazale antikancerogena svojstva u studijama lečenja leukemije [23]. Kombinacija različitih ekscitaciono-emisionih profila sa odličnom biokompatibilnošću i potencijalnim antikancerogenim svojstvima omogućava dizajniranje multifunkcionalnih kontrastnih agenta FAP-a dopiranih Pr^{3+} jonima namenjenih bio-medicinskim primenama.

Luminescentni materijali na bazi FAP-a obično se sintetišu na visokim temperaturama metodom reakcije u čvrstom stanju za primene u laserima i luminescentnim cevima [24-26]. Visoke performanse nanomaterijala za bio-medicinsku primenu zahtevaju jedinstvene strukturne karakteristike, kao što su nanometarska veličina kristalita, uniformna morfologija, dobra disperzija i specifična površina [27]. Poslednjih godina različite klase stabilnih, netoksičnih i samoaktiviranih luminescentnih materijala na bazi FAP-a, sa emisijama indukovanim jonima dopanta ili defektima kristalne rešetke, dobijene su različitim putevima sinteze [28]. Fluorescentne fluorapatitne nanočestice za primenu u biosnimanjima, generalno, se sintetišu u vodenom rastvoru i obično imaju lošu kristaličnost, neuniformne distribucije veličine i sklonost ka lakom formiranju aglomerata [29-32]. Jedan od načina prevazilaženja ovih problema je termička aktivacija nanočestica nakon sinteze iz vodenog rastvora [33-36]. Cilj ove doktorske disertacije je dobijanje novih luminescentnih nanokristala FAP-a dopiranih Pr^{3+} jonima, sintetisanih u vodenom rastvoru na sobnoj temperaturi i zatim aktiviranih termičkim tretmanom, čime se uspostavlja hemijska metoda sinteze na niskoj temperaturi. Obično se za izradu FAP-a dopiranih Pr^{3+} jonima koriste metode visoke temperature

(iznad 980 °C) [25,26], ali u ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je da je moguće koristiti precipitaciju na sobnoj temperaturi praćenu kratkom aktivacijom na 700 °C sa produženim vremenom reakcije i dobiti takav materijal. Pomoću ovog postupka sintetisani su biokompatibilni i luminescentni nanokristali za fluorescentna biosnimanja. Pored toga, proučavana su strukturna i optička svojstva nanokristala i urađene su *in vitro* studije biokompatibilnosti i hemokompatibilnosti kako bi se procenila njihova pogodnost za primenu u biosnimanjima. Nakon ovakve karakterizacije, urađene su studije *in vitro* i *ex vivo* biosnimanja sa ćelijama kancera fluorescentnom konfokalnom mikroskopijom i mikroskopijom širokog polja.

2. Teorijski deo

Luminescentni neorganski nanomaterijali, nanofosfori, su kristalne nanostrukture koje emituju zračenje u vidljivom, infracrvenom ili/i ultraljubičastom delu spektra nakon ekscitacije spoljašnjim izvorom energije u vidu elektrona ili fotona [37]. Nanofosfori se sastoje od matrice, jednog hemijskog jedinjenja domaćina, u kojoj su dopirani luminescentni centri u vidu jona retkih zemalja ili prelaznih metala. Prvi fosfori bili su sintetisani na bazi binarnih jedinjenja sulfida i oksida, kao što su cink-sulfid (ZnS), kadmijum-sulfid (CdS), olovo-sulfid (PbS), cink-oksidi (ZnO), kadmijum-oksidi (CdO) ili kalcijum-volframat (CaWO_4) [38, 39]. Međutim, glavni nedostatak ovih fosfora bila je sinteza na visokim temperaturama iz toksičnih jedinjenja, ali i hemijska nestabilnost i emisija otrovnih gasova tokom rada. U potrazi za hemijski i termički stabilnijim materijalima, prešlo se na razvoj novih tipova fosfora na bazi ternarnih jedinjenja, aluminata, silikata i fosfata, kao što su cink-aluminat (ZnAl_2O_4), magnezijum-silikat (MgSiO_3) i kalcijum-fosfat ($\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_2$) [38, 39]. Posebno, kalcijum-fosfati su se pokazali kao izrazito hemijski stabilni, netoksični i kao odlične matrice za dopiranje jona retkih zemalja i prelaznih metala [1]. Pored ovih pogodnih hemijskih i strukturnih osobina, u oblasti bio-medicine posebno interesantne osobine kalcijum-fosfata su izražena biokompatibilnost, bioaktivnost i osteokonduktivnost [1].

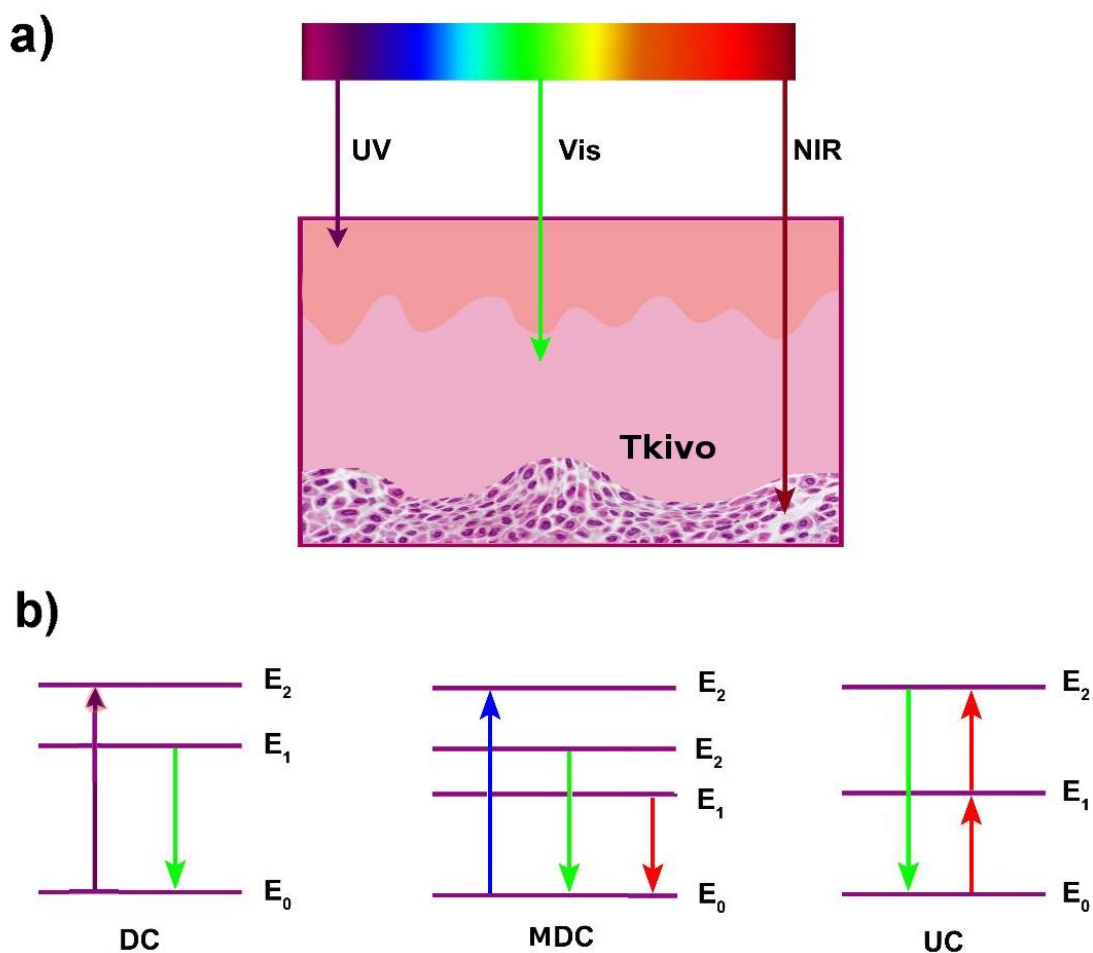
Luminescentni materijali na bazi fluorapatita poslednjih decenija su privukli veliku pažnju istraživača zbog mogućnosti širokog spektra aplikacija [40-43]. Sintetički haloapatiti, komercijalno nazvani fluorapatit i hlorapatit, ko-aktivirani Sn^{3+} i Mn^{2+} bili su jedan od prvih fosfora primenjenih u fluorescentnim lampama [40, 41]. Jedna od glavnih karakteristika kristala apatita jeste kapacitet strukture da podnese mnoge jonske supstitucije. Kristalna struktura fluorapatita je potencijalno bitan matriks za optički aktivne trovalentne jone retkih zemalja, zbog jako izraženog kristalnog polja koje omogućava luminescentne prelaze elektronima iz f orbitala [40]. Zbog svih ovih osobina fluorapatit

dopiran jonima retkih zemalja je našao primenu u UV lampama, LED diodama u displej i plazma televizorima i laserima [40-43].

Fluorapatit, zajedno sa hidroksiapatitom, se primenjuje kao biomaterijal za reparaciju koštanog tkiva jer ima sličnu strukturu kao neorganska komponenta kostiju i zuba kod živih organizama [44, 45]. U odnosu na hidroksiapatit ima bolje fizičko-hemijske osobine, kao što su visoka temperatura topljenja, slaba rastvorljivost u kiselinama, otpornost na koroziju [9]. Zahvaljujući prisustvu F^- jona fluorapatit pokazuje veću stabilnost u odnosu na hidroksiapatit, ali i antibakterijska svojstva [44, 45]. Fluorapatit dopiran jonima retkih zemalja i prelaznih metala se poslednjih godina intenzivno ispituje kao nanomaterijal za primenu u bio-medicini za bioobeležavanja, biosnimanja i terapije mnogih bolesti [1-5]. Dosta je istraživanja koja kao matrice za izgradnju nanofosfora za biosnimanja i dopiranje retkih zemalja, ispituju jedinjenja $NaYF_4$, $NaGdF_4$ i $LaPO_4$, ali kako nisu slična biološkom tkivu kao fluorapatit, njihova biološka primena je upitna [46, 47]. Fluorapatit je zato izuzetno značajan kao domaćin za dopiranje retkih zemalja i izgradnju multifunkcionalnih kontrastnih agenata koji se mogu primeniti u bio-medicini za ranu dijagnostiku, praćenje progresije bolesti i tretman. Pogotovo rana dijagnostika je od krucijalnog značaja u lečenju kancera, kako bi tretman bio više efektivan, manje invazivan i sa značajno redukovanim štetnim efektima. Tradicionalnim tehnikama medicinskih biosnimanja za postavljanje tačne dijagnoze potrebno je više od milion malignih ćelija, dok se od idealnog molekuskog biosnimanja očekuje pravilna dijagnoza ranog stadijuma tumora u proseku sa 100 do 1000 ćelija [12].

Tehnike za biosnimanja su esencijalni alat u bio-medicinskim istraživanjima bioloških fenomena *in vitro* i *in vivo*. Medicinska biosnimanja se standardno vrše metodama kao što su rendgenski kompjuterizovana tomografija (eng. X-ray computed tomography, CT), pozitronska emisiona tomografija (eng. positron emission tomography, PET), jedno-fotonska emisiona kompjuterizovana tomografija (eng. single photon emission computed tomography, SPECT), kao i magnetna rezonanca (eng. magnetic resonance imaging, MRI). Dok CT, PET i SPECT spadaju u radio-dijagnostičke tehnike koje za stvaranje slike koriste radiofarmaceutike, za MRI je potrebna velika koncentracija kontrastnih agenata kako bi se dostigao željeni nivo rezolucije snimka [48]. Fluorescentna mikroskopija je metoda koja se do sada najčešće koristila za *in vitro* studije i *ex vivo* verifikacije, a poslednjih godina i za *in vivo* biosnimanja [48]. Glavnu ulogu u obeležavanju ćelija i amplifikaciji fluorescentnog signala kod fluorescentne mikroskopije imaju luminescentne nanočestice. Razvoj nanotehnologije doveo je do mogućnosti sinteze novih luminescentnih multifunkcionalnih materijala, koji mogu zameniti tradicionalne fosfore i unaprediti tehnike koje se

primenjuju u oblasti bioloških i medicinskih biosnimanja. Kako su se fluorescentni mikroskopi i laseri koji se koriste za biološka ispitivanja vremenom razvijali, došlo je do potrebe i za razvojem novih kontrastnih agenata od standardno primenjenih organskih boja i kvantnih tačaka. Pre svega, razlog za njihovu zamenu su nedostaci. Tradicionalne organske fluorofore imaju malu stabilnost, loše kontraste i kratko vreme trajanja luminescencije, dok kvantne tačke koje su ih nasledile su vrlo toksične, podložne fotooksidaciji i tzv. treperavoj luminescenciji, što sve ograničava njihovu biološku primenu. Poslednjih deset godina fluorapatiti dopirani lantanoidnim jonima sa *down*-konverzionom (Eu^{3+}) i *up*-konverzionom ($\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$) luminescencijom su privukli veliku pažnju u oblasti bio-medicine s obzirom na njihovu fotostabilnost, velike kontraste i nisku toksičnost. Takođe, dopiranja drugih jona retkih zemalja, pogotovo onih koji će imati i ekscitaciju i emisiju u vidljivom delu spektra, kao što je Pr^{3+} , još uvek je neistraženo.



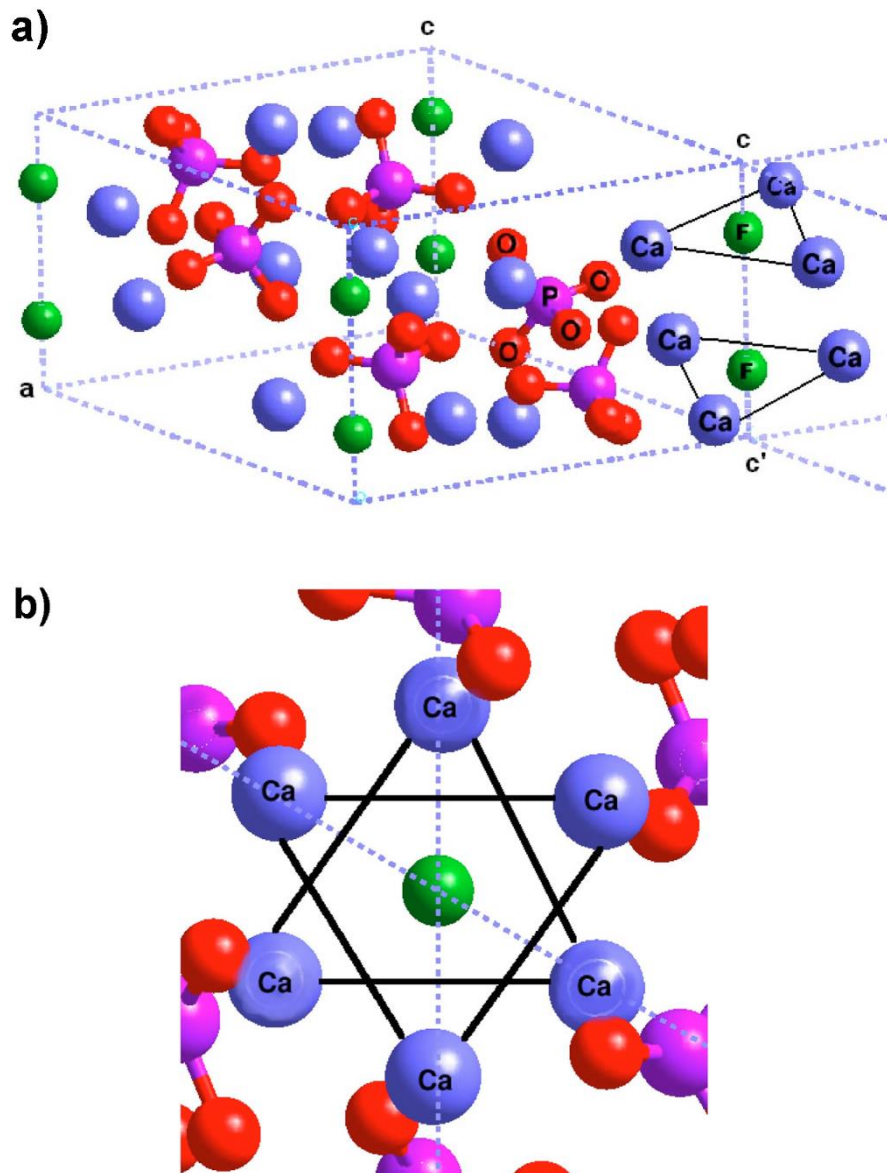
Slika 2.1. (a) Šematski prikaz penetracije svetlosti različitih talasnih dužina (od UV do IR oblasti) kroz kožu i tkivo. (b) Transfer energije kod različitih modela luminescencije *down*-konverzionom (DC) pod dejstvom UV svetlosti, multifotonska *down*-konverzionom (MDC) ekscitovana u vidljivoj oblasti spektra i *up*-konverzionom (UC) ekscitovana u IR oblasti (modifikovano u odnosu na [48]).

Down-konverzionna (DC) luminescencija je nelinearna optička pojava tokom koje se apsorbuje visokoenergetski foton (iz UV oblasti), a emituju se dva fotona niske energije uključujući *Stokesova* pomeranja (Slika 2.1.b). Kada je ekscitacija u UV oblasti, ćelije i tkiva mogu imati mnogo svojih fluorescentnih komponenti, što rezultira neželjenom fluorescencijom u pozadini poznatom kao auto-fluorescencija. Takođe moguće je i fatalno oštećenje ćelija pod dejstvom UV svetlosti. Pobuđivanje nanočestica *up*-konverzije sa infracrvenim laserom omogućava duboku penetraciju u tkiva (Slika 2.1.a), sposobnost multiplikovanja i izbegavanje auto-fluorescencije tkiva i moguće oštećenje ćelija [48]. *Up*-konverzija uključuje anti-*Stokesovo* pomeranje pretvaranjem fotona niske energije u fotone visoke energije (Slika 2.1.b). Zbog toga su i nanočestice *up*-konverzije korišćene u biosnimanjima reparacije koštanog tkiva i praćenja regeneracije kostiju. Jedan od ciljeva ove disertacije je da pokaže da je moguće i u vidljivoj oblasti spektra postići neinvazivne multifotonske emisije za biosnimanja, ukoliko se koriste ultra brzi laseri za ekscitovanja u vidljivoj oblasti spektra i detektori za oštru kvantifikaciju dobijene emisije. Kao modeli za testiranje dobijenih multifotonskih nanokristala PrFAP-a odabrane su ćelije kancera kože i pluća.

2.1. Kristalna struktura fluorapatita

Apatiti imaju opštu formulu jedinične ćelije $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$, gde obično komponentu X predstavljaju anjoni fluora (F^-), hlora (Cl^-) i hidroksilne grupe (OH^-). Vrsta prisutnog anjona i pozicija koju zauzima u kristalnoj rešetki određuje tip apatita. Tako da su fluorapatit [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$], hlorapatit [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$] i hidroksiapatit [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$] (svaki sa $z = 2$ (dve molekulske formule)) tri faze ovih minerala koje se javljaju u prirodi. Najzastupljenija faza u prirodi je fluorapatit i čini oko 95% apatitnih stena [49]. Apatiti su podložni različitim izomorfnim supstitucijama, pa se kompozicija apatita u prirodi razlikuje od ovih idealnih kompozicija. Rešetka apatita je tolerantna na supstitucije u kojima mogu biti zamenjeni i anjoni X^- i katjon Ca^{2+} i PO_4^{2-} grupa [49].

Kao što su mnogi autori pokazali, zaključno sa *Hughes*-om i saradnicima, struktura apatita može da se opiše kao heksagonalna mreža sastavljena od PO_4 tetraedara sa kalcijumom u intersticijalnim položajima i kolonama X anjona orjentisanim duž kristalografske ose c (Slika 2.1.1.) [49-55]. Mesto u kolonama kod fluorapatita zauzimaju anjoni fluora (F^-). Podaci dobijeni rendgenskom difrakcionom analizom su pokazali da pored toga što apatiti kristališu heksagonalno (prostorne grupe $\text{P6}_3/\text{m}$, P6_3 , P6) mogu da kristališu i triklično (prostorna grupa P1), monoklično (prostorne grupe P2_1 , $\text{P2}_1/\text{m}$) kao i romboedarski (prostorna grupa P3) [50].



Slika 2.1.1. (a) Heksagonalna jedinična ćelija FAP-a. (b) Pogled odozgo na centralni F atom u trouglovima formiranim od Ca₂ atoma [51].

Fluorapatit (FAP), $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, je najstabilnija apatitna faza, najmanje rastvorana i najtvrdja od svih apatitskih struktura. Na skali po Mosu tvrdoća je 5. FAP kristališe heksagonalno u prostornoj grupi $P6_3/m$ (broj 176) sa parametrima jedinične ćelije $a = 9,367(1) \text{ \AA}$, $c = 6,884(1) \text{ \AA}$, $z = 2$ [50]. Ovi parametri jedinične ćelije u mnogome zavise od postupka sinteze. Strukturu FAP-a izgrađuje deset atoma kalcijuma raspoređena u dva simetrijski različita kristalografska položaja Ca1(4*f*) i Ca2(6*h*) [50]. U položaju Ca1(4*f*) svaki atom kalcijuma je okružen sa devet atoma kiseonika koji potiču od PO₄ grupa, a pritom se sami Ca joni međusobno povezuju u kolone paralelne kristalografskoj *c*-osi (Slika 2.1.1.a). Preostalih šest atoma kalcijuma se nalaze u položaju

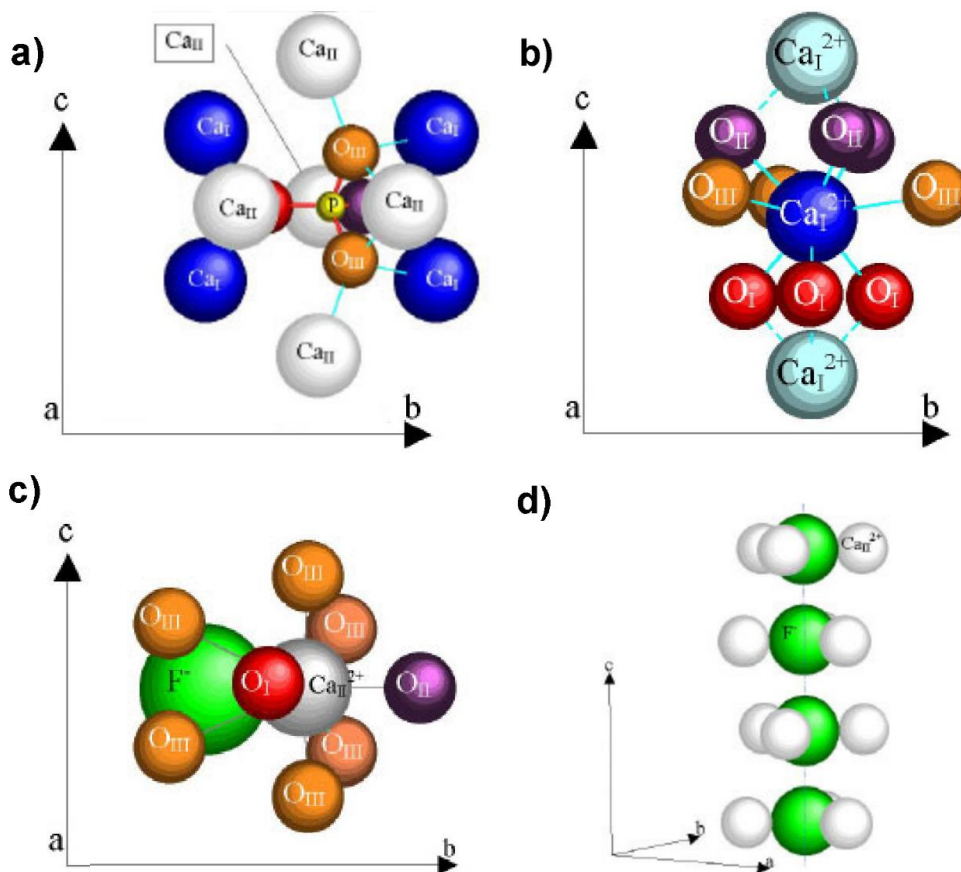
Ca₂(6*h*) i grade jednakostranične trouglove oko ose na $z = 1/4$ i $z = 3/4$ u okviru ogledalskih ravni. Za razliku od položaja Ca₁, atomi kalcijuma u položaju Ca₂ su okruženi sa šest atoma kiseonika koji potiču od PO₄ grupa iz okruženja i sa jedanim F atomom smeštenim u kanalu. Ovi F⁻ joni su smešteni u centru Ca₂ trougla (6*h* položaj) u ogledalskim ravnima na $z = 1/4$ i $z = 3/4$ (Slika 2.1.1.b).

Kristalna rešetka apatita je formirana od tri vrste poliedra, u kojima dolazi do promena onda kada se promene anjonski članovi u kolonama. Ova tri poliedra su prikazana na Slici 2.1.2. a, b, c. Fosfor se u apatitu javlja u tetraedarskoj koordinaciji sa centralnim P atomom u 6*h* specijalnom položaju (Slika 2.1.2.a) [49]. Atom fosfora (naelektrisanje: +5) kao centar gravitacije je povezan sa 4 atoma kiseonika (naelektrisanje: -2). Različiti anjoni koji mogu biti u kolonama, imaju bitan uticaj na ovaj rigidni poliedar. To se pre svega odnosi na supstituciju anjona F⁻ sa anjonima tipa OH⁻, Cl⁻, CO₃²⁻.

Deset kalcijumovih jona se u jediničnoj ćeliji javlja u obliku dva različita poliedra Ca₁O₉ i Ca₂O₆F. Ca₁O₉ poliedar sa centralnim katjonom u 4*f* (1/3, 2/3, *z*) položaju je koordinisan sa devet atoma kiseonika u rasporedu u trokajnoj trigonalnoj prizmi [49]. Ca₁ sa vrednošću *z* blizu 0 i 1/2 vezan je za šest ovih kiseonikovih atoma (3xO₁, 3xO₂) u ravnima 1/2 jedinične ćelije iznad i ispod centralnog katjona formirajući trigonalnu prizmu. Preostala tri kiseonikova atoma (3xO₃), koplanarna sa Ca₁, su povezana kroz prizmu formirajući trokajnu trigonalnu prizmu. Slika 2.1.2.b prikazuje superpoziciju poliedra Ca₁ i njegovih liganada za sve tri faze apatita. Ca₁ poliedar pokazuje mali odgovor na prisustvo različitih anjona u koloni ove tri faze apatita.

U Ca₂O₆X poliedaru, Ca₂ u specijalnom položaju 6*h* u prostornoj grupi P6₃/m vezuje šest kiseonikovih atoma (O₁, O₂ i 4xO₃) i jedan anjon u koloni X [49]. Glavni odgovor strukture na supstitucije tri anjona u koloni javlja se u ovom poliedru. Slika 2.1.2.c prikazuje superpoziciju Ca₂ poliedra za fluorapatitnu fazu. U poliedru Ca₂ katjoni formiraju jednakostranične trouglove u okviru ravni na $z = 1/4$ i $z = 3/4$. Svaki od ova tri kalcijumova atoma u uglovima trougla je povezan sa centralnim anjonom u (00*z*) koloni. Fluor, najmanji od sva tri anjona, leži u ravni na $z = 1/4, 3/4$ (u 0,0,1/4 i 0,0,3/4) sa Ca₂-F vezama u (001).

Joni F⁻ se povezuju jedni sa drugima u koloni ($d(\text{F-F}) = 3.44 \text{ \AA}$), i okruženi su međusobno sa 3 Ca₂ katjona ($d(\text{F-Ca}_2) = 2.463 \text{ \AA}$) koji formiraju trougao u istoj ogledalskoj ravni [52, 53]. Ova pozicija F⁻ jona daje stabilnost apatitnoj strukturi i čini je pogodnom matricom za dopiranje luminescentnih jona.

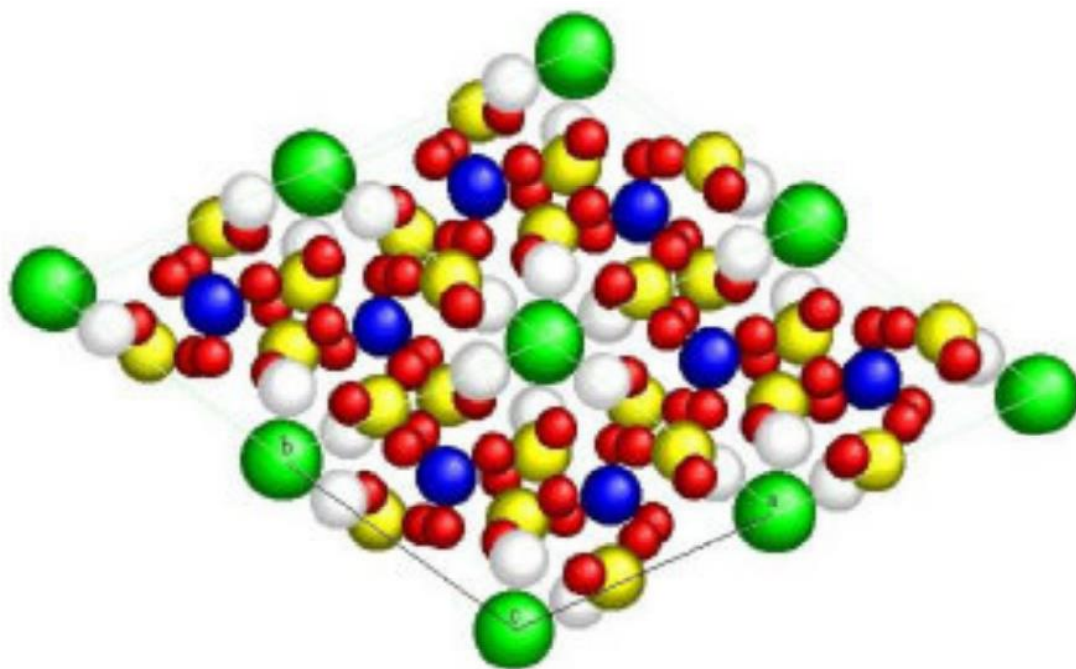


Slika 2.1.2. (a) Tetraedar PO_4 sa okruženjem u apatitnoj kristalnoj rešetki. (b, c) Ca_1O_9 i Ca_2O_6F poliedri za fluorapatitnu strukturu. (d) Povezivanje F atoma u koloni okruženih Ca_2 atomima [54].

Kombinovanjem tri poliedra formira se apatitna mreža (Slika 2.1.3.) kada se prethodno atomi Ca_1 povezuju duž c -ose u koloni i to tako što se povezuju iznad i ispod preko tri kiseonikova atoma koja leže u ogledalskim ravnima. Sa jedne strane nalaze se tri atoma kiseonika O_1 na $2.397(1)$ Å, a sa druge strane tri O_2 atoma na $2.453(1)$ Å. Ove kolone formirane od Ca jona i njihovi koordinacioni atomi kiseonika se povezuju međusobno sa PO_4 tetraedrima, tako da tri atoma kiseonika (dva O_3 i jedan O_1 ili O_2) dolaze od jedne kolone, a četvrti (O_2 ili O_1 , redom) iz susedne kolone.

Rezultat ovakvog povezivanja sa atomom fluora na položaju $(00z)$ jeste formiranje mreže fluorapatita koja je predstavljena na Slici 2.1.3.

Jedinična ćelija FAP-a se sastoji od 7 neekvivalentnih atoma: F, Ca_1 , Ca_2 , P, O_1 , O_2 i O_3 . Prema Internacionalnim kristalografskim tablicama simetrijski položaji neekvivalentnih atoma prikazani su u Tabeli 2.1.1.



Slika 2.1.3. Raspored atoma u kristalu fluorapatita projekcija na (001) (2x2 ćelije - pogled [0001]). P atom je žuto obojen, O atomi su crveni, Ca1 plave boje, Ca2 bele boje i F atom zelene boje [54].

Tabela 2.1.1. Simetrijski položaji neekvivalentnih atoma u FAP-u u prostornoj grupi $P6_3/m$ [54].

Atom	Multiplicitet i Wyckoff simbol	Kristalografski podaci
F	$2a$	$(0;0;1/4)$ $(0;0;3/4)$
Ca1	$4f$	$(1/3;2/3;z)$ $(2/3;1/3;z)$ $(2/3;1/3;z+1/2)$ $(1/3;2/3;1/2-z)$
Ca2	$6h$	$(x;y;1/4)$ $(1-y;x-y;1/4)$ $(y-x;1-x;1/4)$
P		$(1-x;1-y;3/4)$ $(y;y-x;3/4)$ $(x-y;x;3/4)$
O1		$(x;y;z)$ $(1-x;1-y;1-z)$ $(1-x;1-y;1/2+z)$ $(x;y;1/2-z)$
O2		$(1-y;x-y;z)$ $(y;y-x;1-z)$ $(y;Y-x;1/2+z)$ $(1-y;x-y;1/2-z)$
O3	$12i$	$(y-x;1-x;z)$ $(x-y;x;1-z)$ $(x-y;x;1/2+z)$ $(y-x;1-x;1/2-z)$

Prostorna grupa fluorapatita $P6_3/m$ (ili C_{6h}^2 prema *Schönflies*-ovom obeležavanju koje se koristi u spektroskopiji) opisuje opšte pozicije atoma unutar jedinične ćelije i stoga omogućava izgradnju položaja atoma jedinične ćelije polazeći samo od četiri jona: F^- , $Ca1^{2+}$, $Ca2^{2+}$ i PO_4^{3-} . Poznavanje ovakve simetrije nije samo korisno za razumevanje same strukture fluorapatita, već i za detekciju apatitnih faza, strukturnih modifikacija indukovanih supstitucijama, te tako i razumevanje ponašanja biološkog i sintetičkog kalcijum fosfata.

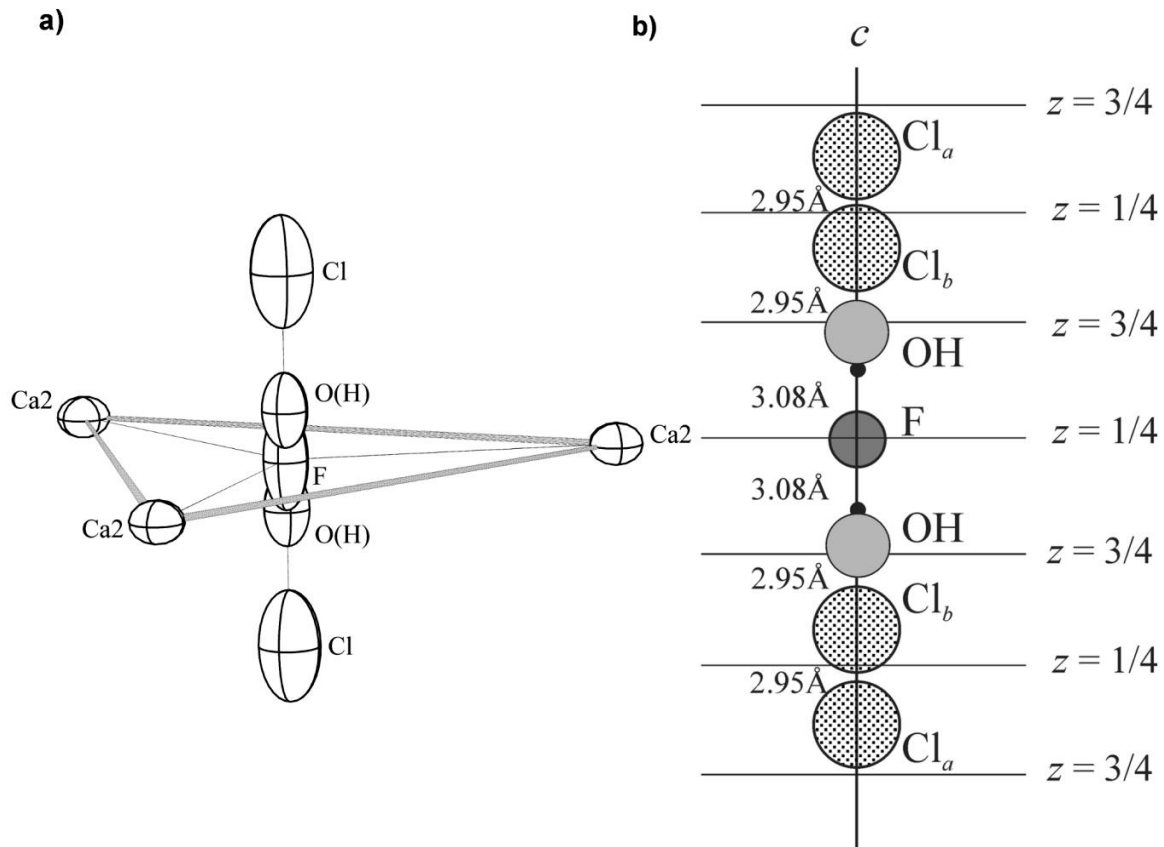
2.2. Supstitucije u kristalnom matriksu fluorapatita

Kristalna rešetka fluorapatita je tolerantna na različite izomorfne supstitucije, pa se kompozicije minerala fluorapatita u prirodi razlikuju od ovih idealnih kompozicija razmatranih u prethodnom poglavlju. Najčešći oblik supstitucije koji se sreće naziva se Tip-A supstitucija. Ovakav tip supstitucije se odnosi na supstituisanje pozicije F^- anjona sa drugim jednovalentnim ili dvovalentnim anjonima (tipa Cl^- , OH^- , CO_3^{2-} ...), ali i neutralnim molekulima (H_2O , O_2). Takođe, Tip-A supstitucija se odnosi i na supstitucije pozicije Ca^{2+} jona u FAP strukturi sa jednovalentnim, dvovalentnim i trovalentnim katjonima (Na^+ , Cu^{2+} , Eu^{3+} ...). Druga vrsta supstitucije FAP rešetke je Tip-B supstitucije i odnosi se na supstituisanje pozicije PO_4^{3-} grupe najčešće CO_3^{2-} grupama, ali i kompleksnim anjonima tipa MO_4^{3-} . Konačno, neki dopanti, kao što su Sb^{3+} i Mn^{2+} , ne vrše supstituciju FAP strukture u određenom položaju već se javljaju u specijalnim pozicijama koje modifikuju kristalnu strukturu.

Vrlo često se kod apatita javlja i tzv. spregnuta supstitucija koja podrazumeva zamenu jona istog naelektrisanja (pozitivnog ili negativnog), ali različitog oksidacionog stanja, pri čemu se elektroneutralnost postiže formiranjem vakansi ili zamenom jona suprotnog naelektrisanja [50]. Sve ove supstitucije apatita postoje u prirodi i većina njih se može reprodukovati i u laboratorijskim uslovima.

2.2.1 Tip A-supstitucija

Tip-A supstitucija je u prirodi najčešći vid supstitucije i podrazumeva pre svega zamenu F^- anjona drugim jednovalentnim anjonima kao što su OH^- ili Cl^- . Ovi anjoni pošto su veći od F^- ne mogu da leže u rigidnoj ogledalskoj ravni definisanoj od strane Ca_2 atoma, već su povezani sa Ca_2 atomima ispod ili iznad ogledalske ravni. Supstituent X^- neće biti baš u centru jednakostraničnog trougla od Ca_2 atoma, na $z = 1/4$ ili $z = 3/4$, već se podvrgava pomeranju sa ovog položaja duž kolone anjona. Ovakvo pomeranje narušava lokalnu $P6_3/m$ simetriju i smatra se da su ova ogledalski-simetrična položaja ispod ili iznad ustvari polu-zauzeta, što fluorapatitu i hidroksiapatitu daje u proseku heksagonalnu $P6_3/m$ simetriju. Ovo pomeranje varira prema vrsti supstituenta. Pa će tako u OHAP atom kiseonika iz hidroksilne grupe biti ispod ili iznad mesta položaja F^- u trouglu Ca_2 na $0,3 \text{ \AA}$ (0;0;0.196), što dovodi do lokalnog poremećaja u rešetki. Kada je kompozicija OHAP približna stehiometrijskoj, hidroksilni joni su uvek u ovim pozicijama, a prostorna grupa postaje $P2_1/b$ sa pseudo-heksagonalnom strukturom ($b = 2a$, $\gamma = 120^\circ$) kao što je ilustrovano na Slici 2.2.1. [53, 54].



Slika 2.2.1. Prikaz mogućih položaja anjona u heksagonalnoj apatitnoj strukturi u sve tri apatitne faze. (a) Ravni predstavljaju ogledalske ravni na $z = 1/4$ i $3/4$, od kojih svaka sadrži trougao od Ca2 atoma (povezanih "vezama"). (b) F atom je u sredini trougla na $(0,0,1/4)$. Cl atom je pomeren ispod ravni ogledala na $z = 3/4$, a O atom (iz OH) pomeren je iznad te ravni [55].

U stehiometrijskom hlorapatitu (ClAP) na isti način će Cl⁻ joni izvršiti supstituciju F⁻ u položaju $(0,0,0.444)$, a pritom dolazi do stvaranja vakansi na c -osi i prostorna grupa postaje P21/b. U zavisnosti od stepena supstitucije F⁻ dolazi do lokalnih poremećaja sa mogućim transformacijama heksagonalne strukture (prostorne grupe P63/m) u monokliničnu (prostorne grupe P21/b) [53, 54]. Okruženje položaja anjona će pretrpeti izvesne poremećaje u zavisnosti od stepena supstitucije, pa će doći do porasta parametra a i smanjenje parametra c . Tada ne dolazi do gubitka PO₄³⁻ grupa ili Ca²⁺ jona, ali dolazi do promene njihovih kristalografskih pozicija ne bi li se sačuvala Ca-X veze i kompenzovao disbalans zbog supstitucije.

Kada se F⁻ supstituiše anjonima tipa Y²⁻ (Y = O, CO₃), u jediničnoj ćeliji će biti supstituisana dva F⁻ jona sa jednim ili više Y²⁻ jona [53]. Ova supstitucija može da dovede do narušavanja balansa naelektrisanja, što će biti kompenzovano sa nastankom vakansi na položaju F⁻ jona ili u nekom slučaju sa gubitkom ose rotacije δ_3 (eng. *screw-axis* δ_3). Ove vakanse na položaju

F⁻ jona mogu se pojaviti i kako bi kompenzovale gubitak jednog ili više Ca²⁺ jona.

Zamena F⁻ anjona neutralnim molekulima (H₂O, O₂, Ar, CO₂) takođe je moguća [56]. Ukoliko dođe do supstitucije F⁻ anjona neutralnim molekulima, to onda podrazumeva i malo povećanje vrednosti parametra na *a*-osi. Međutim, supstitucija neutralnim molekulima (npr. H₂O ili O₂) postoji samo u nekoliko posebnih uslova, kao što je na primer kod hidratacije gledi [56, 57].

Supstitucije Ca²⁺ jona su najčešće prisutne u industrijskim aplikacijama, kada se fluorapatiti dopirani jonima prelaznih metala ili retkih zemalja koriste kod izrade fluorescentnih lampi. U zavisnosti od položaja u kom je izvršena supstitucija Ca²⁺, pronađena su tri tipa supstitucije kalcijumovog jona. Tako Ca²⁺ može biti supstituisan u položaju Ca1 ili Ca2, ili u oba položaja. Generalno, ukoliko supstituent nema naelektrisanje ekvivalentno 2+, doći će do pomeranja u položaju Ca2 čime će ova pozicija biti narušena. Ako je supstituent u obliku M²⁺, tada supstitucija zavisi od relativne veličine supstituenta i Ca²⁺ jona. Prema *Kreidler*-u, radijus jona koji vrši supstituciju Ca²⁺ jona može biti između 0.95 i 1.35 Å [58].

Supstitucija Ca²⁺ jednovalentnim katjonima (K⁺, Na⁺) dešava se često na položaju Ca1, stvarajući vakansu na položaju F⁻ i ponekad na položaju Ca1. Generalno veći katjoni imaju veći afinitet prema položaju Ca1 [59].

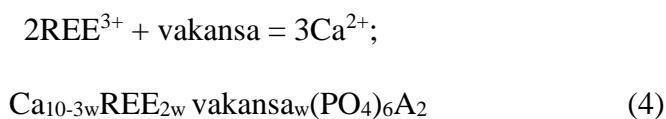
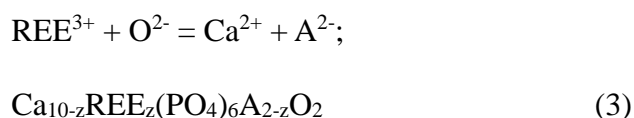
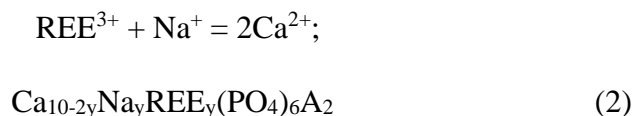
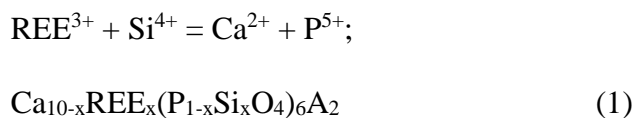
Ako je supstituent dvovalentni katjon (npr. Sr²⁺, Pb²⁺, Mg²⁺), prvenstvo supstitucije će imati položaj Ca2 [60]. Pritom, primećeno je da ne dolazi do gubitka PO₄³⁻ jona i stepen izmene je generalno mali. Prisustvo dopanta izaziva kontrakcije *c*-ose i povećanje parametara *a*-ose, kao i mala pomeranja različitih atoma. Ako je stepen supstitucije 1/1, kristalna struktura neće biti narušena sa mogućim poremećajima u naelektrisanju, već je primećeno povećanje rastojanja Ca2-O veza.

Na isti način, ukoliko su supstituisana oba položaja Ca²⁺ (Ca1 i Ca2) sa Pb²⁺ ili sa Cd²⁺ kristalna rešetka neće pretrpeti nikakvu veliku strukturnu promenu [61, 62]. Jedino je primećeno povećanje parametara jedinične ćelije i rastojanja M-O. Sa druge strane, supstitucija dvovalentnih katjona samo u položaju Ca1 ima mnogo konsekvenci po kristalnu strukturu. Substitucija Ca1 položaja sa Mn²⁺ isključuje bilo koje druge Mn²⁺ jone iz ćelije u Ca2 položaju, izazivajući nastanak vakanse u položaju F⁻ jona. Određeni broj atoma kiseonika O3 će biti pomeren sa njihovih položaja, uz gubitak ogledalske ravani. Kristalna simetrija će biti narušena, a prostorna grupa postaje P6₃.

Zato se smatra da Mn^{2+} katjoni vrše supstitucije FAP rešetke u specijalnim pozicijama.

Supstitucija Ca^{2+} sa trovalentnim katjonima (Sb^{3+} , Nd^{3+}) se relativno retko sreće u prirodi, ali se zato ova vrsta supstitucije često koristi u industriji za izradu fluorescentnih lampi [63, 64]. Ukoliko je stepen supstitucije veoma mali ($<2\%$), prvenstveno će biti supstituisani položaji Ca2 a kristalna rešetka će gubitkom PO_4^{3-} jona kompenzovati disbalans naelektrisanja. Dopiranje trovalentnih katjona uzrokuje smanjenje vrednosti parametara c -ose, i povećanja na a -osi. Međutim, kada je stepen izmene veći, zamena Ca^{2+} sa trovalentnim katjonima je praćena i supstitucijom F^- sa dvovalentnim anjonima i/ili supstitucija Ca^{2+} sa jednovalentnim katjonom. Konkretno, mehanizam izmene je $2Sb^{3+}$ za 3 susedna Ca^{2+} na položaju Ca1. Kako bi se kompenzovao disbalans dolazi do raseljavanja položaja Ca1 jona i rotacija, ili gubitka PO_4^{3-} grupa. Pa se kaže da Sb^{3+} katjoni vrše supstituciju u specijalnim pozicijama.

Joni retkih zemalja (REE^{3+}) mogu izvršiti supstitucije u oba katjonska položaja Ca1 i Ca2. Kompenzacija naelektrisanja koja je neophodna kod ove supstitucije nije još uvek dobro shvaćena i još uvek je predmet istraživanja. Dosadašnja istraživanja su pokazala da kompenzacija naelektrisanja pri supstituciji Ca^{2+} sa trovalentnim katjonima retkih zemalja se može predstaviti sumirano u sledećim jednačinama [65]:



Generalno, najčešće ispitivani Eu^{3+} katjon će supstituisati FAP rešetku u $\text{Ca}2$ položaju sa supstitucijama F^- sa O^{2-} anjonima zbog balansa naelektrisanja, ali i mogućim stvaranjem vakanse (F^{2n}) [66]. Spektroskopska studija Eu^{3+} u prirodnom apatitu je pokazala da će Eu^{3+} katjon okupirati $\text{Ca}1$ poziciju, a da će kompenzacija naelektrisanja biti postignuta supstitucijom $\text{Ca}2$ pozicije sa Na^+ jonom kao nečistoćom. Mehanizam supstitucije će biti $2\text{Ca}^{2+} = \text{Eu}^{3+} + \text{Na}^+$. Postoje i studije koje su pokazale da afinitet supstitucije Eu^{3+} za određenu poziciju zavisi i od metode dobijanja materijala [67].

U slučaju ko-dopiranog FAP-a, sistemom katjona $\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$, pretpostavljeno je da se u 10 jediničnih ćelija nalazi po 13 Yb^{3+} i 2 Ho^{3+} [3]. Pritom, svaka sadrži bar jedan Yb^{3+} , a samo dve sadrže i Yb^{3+} i Ho^{3+} . Balans naelektrisanja se postiže formiranjem vakanse na Ca^{2+} poziciji, kao i supstitucijom F^- sa O^{2-} . Može biti i prisutan mali broj Na^+ katjona da kompenzuje disbalans naelektrisanja nastao unosom trovalentnih katjona.

2.2.2. Tip-B supstitucija

Supstitucija PO_4^{3-} grupe supstituentima kao što su anjonski kompleksi tipa AsO_4^{3-} , SiO_4^{2-} , SO_4^{2-} ili CO_3^{2-} se naziva Tip-B supstitucija.

Kada je supstituent tipa MO_4^{3-} ($\text{M} = \text{V}, \text{As}, \text{Mn}, \text{Cr} \dots$), supstitucija može biti parcijalna ili kompletna, kada dolazi do malog povećanja parametra a -ose i c -ose, kao i opadanja vrednosti odnosa c/a [58, 59]. Da bi se očuvala heksagonalna $\text{P}6_3/\text{m}$ struktura, prema *Kreidler-u*, radijus atoma M mora biti između 0.29 i 0.6 Å [58]. Međutim, supstitucija PO_4^{3-} često podrazumeva i neke nepravilnosti u kristalnoj strukturi, što dovodi do gubitka heksagonalne simetrije i nastanka tzv. pseudo-heksagonalne strukture.

Iako je mineralna komponenta kostiju primarno apatit supstituisan karbonatnim jonima, mehanizam supstitucije karbonatnih jona u apatitu je i dalje nerazjašnjen. Karbonatni joni mogu supstituisati u apatitnoj rešetki PO_4^{3-} pozicije (B-tip karbonatnog apatita) i F^- jone koji se nalaze u kolonama duž c -ose (A-tip karbonatnog apatita). Karbonat u mineralima kostiju je primarno B-tipa, sa veoma malim količinama A-tipa. Za sintezu A-tipa karbonatnog apatita su potrebne metode na visokim temperaturama, dok B-tip karbonatne supstitucije apatita nastaje na niskim temperaturama [68].

Zamena PO_4^{3-} sa CO_3^{2-} je uglavnom praćena sa gubitkom jednog F^- jona i jednim ili

nekoliko Ca^{2+} u položaju Ca_2 , kako bi se kompenzovao disbalans naelektrisanja [59]. Ovo je praćeno povećanjem parametara c , i kontrakcijama parametara a rešetke. Čak je i način supstitucije nejasan, jer se prvo mislilo da CO_3^{2-} zauzima položaj PO_4^{3-} . Ova teorija je odbačena, jer se smatralo da anjoni CO_3^{2-} ne mogu da zauzimaju poziciju na osi rotacije 6, zbog njenog sternog prostora. Kasnije, zbog veza P-O, druga studija je tvrdila da CO_3^{2-} joni naginju c -osi i da zauzimaju jedno od tetraedarskog položaja PO_4^{3-} . Drugi autori su predložili supstituciju, na primer 3PO_4^{3-} jona sa 4CO_3^{2-} , ali ni ova zamena još uvek nije u potpunosti dokazana [59].

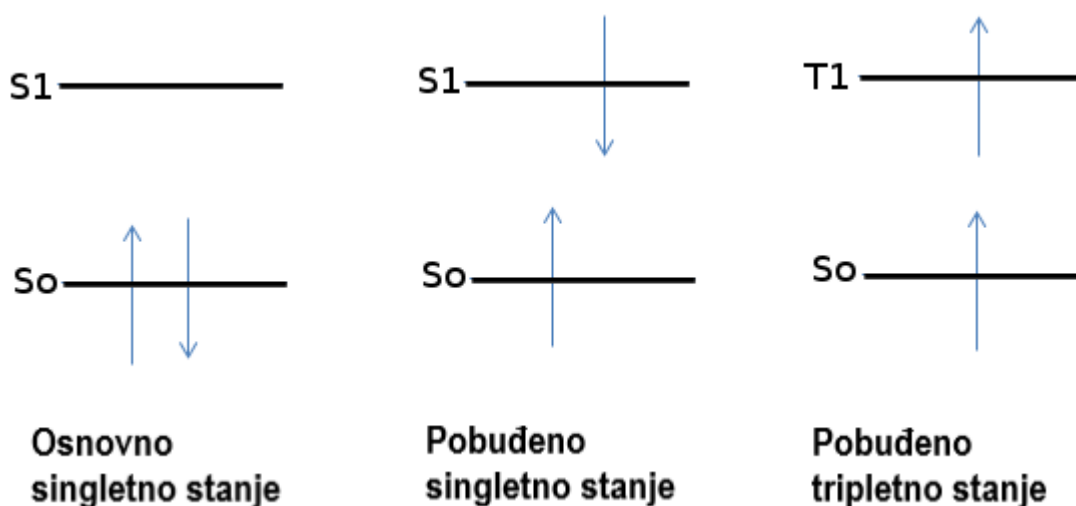
2.3. Fenomen luminescencije fluorapatita dopiranog retkim zemljama

Luminescencija minerala fluorapatita privukla je veliku pažnju mineraloga od kada je detektovano da pod dejstvom UV zračenja emituju "hladnu" svetlost. Luminescencija je objašnjena kao posledica prisustva defekata i pre svega elemenata aktivatora u kristalnoj rešetki minerala fluorapatita. Osnovno razumevanje fenomena luminescencije može dati objašnjenja o nastanku minerala, kao i detalje o strukturnim i hemijskim osobinama.

Luminescencija je emisija elektromagnetnog zračenja od strane materijala, mahom vidljive svetlosti, koja sledi posle prethodne apsorpcije energije fotona ili elektrona [37]. Glavni mehanizam za većinu tipova luminescencije je u osnovi isti, to je interakcija spoljašnje energije sa elektronima u materijalu. Jedano od najvećih naučnih otkrića prošlog veka je da energetske nivoi u atomu mogu imati samo diskretne, specifične vrednosti, jer su u stvari kvantovani. Pošto ovi energetske nivoi imaju diskretne vrednosti, energetska razlika između nivoa, je takođe kvantovana, što daje osnovu na kojoj se bazira objašnjenje mehanizama luminescencije u mineralima. U zavisnosti od načina pobuđivanja materijala, razlikujemo nekoliko vrsta luminescencije: fotoluminescencija (izvor ekscitacije UV i vidljiva svetlost), katodoluminescencija (elektroni), jonoluminescencija (joni), rendgenoluminescencija (X-zraci), hemiluminescencija (hemijske reakcije), termoluminescencija (toplota posle dejstva radioaktivnosti), bioluminescencija (hemijske reakcije u živim organizmima) i elektroluminescencija (struja). U samom nazivu fenomena luminescencije, prefiks (foto, jono, rendgeno itd.) označava metod kojim je izazvano pobuđivanje.

Luminescencija minerala uključuje elektronske procese fotofizičkih prelaza koji se dešavaju u strukturi minerala kada joni, atomi i molekuli apsorpcijom kvanta svetlosne energije prelaze u pobuđeno stanje. Ekscitovani molekuli mogu da se vrate u osnovno stanje putem neradijacionih prelaza, kada se u vidu fonona svetlost predaje drugim molekulima u rešetki. Drugi način predaje energije i povratak u osnovno stanje je putem radijacionih prelaza, kada se absorbovana energija

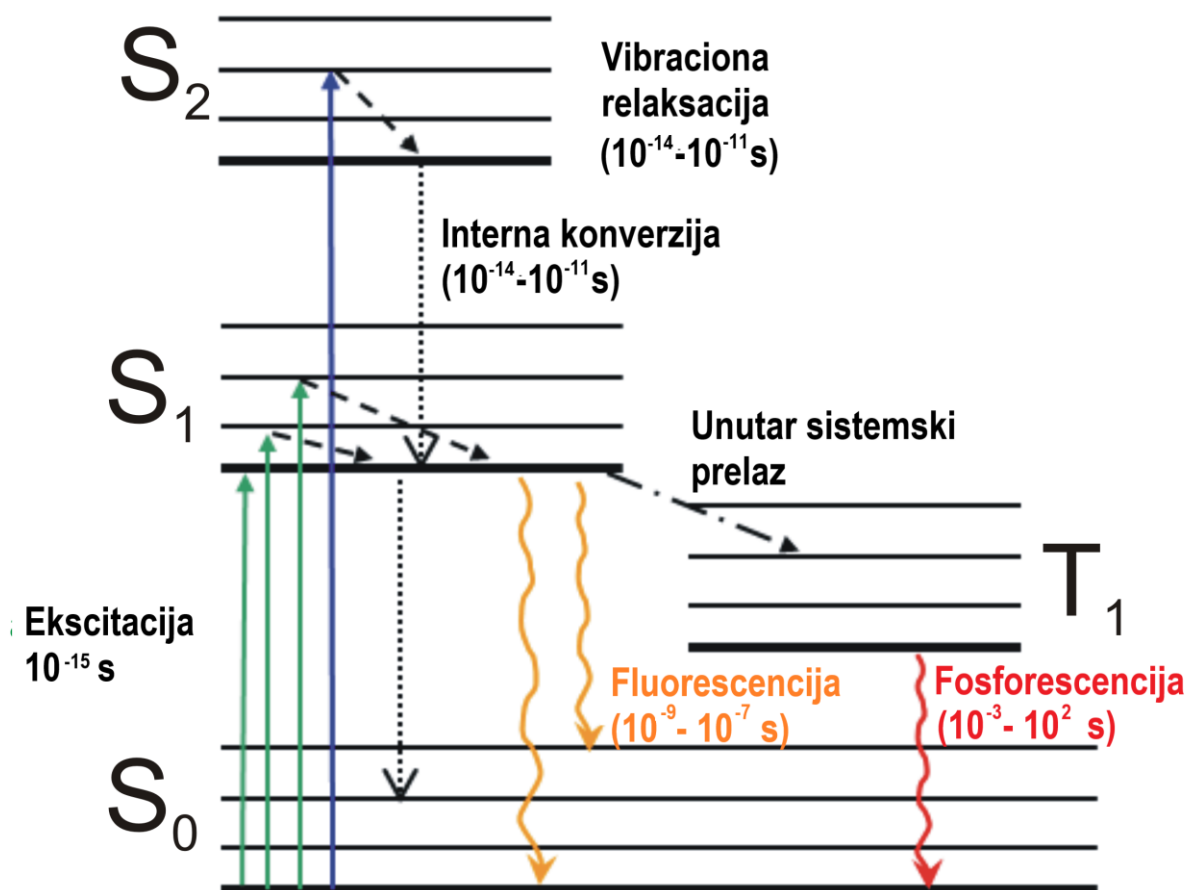
emituju u vidu svetlosti. Ova pojava se zove *fotoluminescencija*, i na osnovu vremena koje protekne od pobuđenog stanja do vraćanja u osnovno stanje deli se na *fluorescenciju* i *fosforescenciju*. Tačna definicija ova dva procesa se vrši preko selekcionih pravila, dozvoljenih i nedozvoljenih prelaza. U osnovnom stanju, upareni elektron ima dva moguća ekscitaciona nivoa. Elektron u pobuđenom stanju je uparen sa drugim elektronom u osnovnom stanju i on se putem fluorescencije vrlo brzo vraća ($\sim 10^{-8}$ s) u osnovno stanje prelazom dozvoljenim po spinu [69]. Kada elektron u pobuđenom stanju ima isti spin kao elektron u osnovnom stanju, tada se njegov prelaz u osnovno stanje dešava relativno sporo (od 1 ms do 1 s) putem fosforescencije. Kada molekul ima paran broj elektrona nalazi se u osnovnom singletnom stanju (S0). U ekscitovanom stanju elektron može da menja spin i tada je molekul u tripletnom stanju (T1). Pobuđena stanja se označavaju sa S1, S2, ... (Slika 2.3.1.).



Slika 2.3.1. Prelazi iz osnovnog singletnog i moguća pobuđena singletna ili tripletna elektronska stanja

Poljski fizičar Aleksandar Jablonski je predložio dijagram pomoću kog se često objašnjava mehanizam fotoluminescencije, tzv. dijagrama Jablonskog. Na dijagramu (Slika 2.3.2.) su prikazana elektronska i vibraciona stanja molekula, kao i prelazi između njih. Apsorpcijom fotona iz UV-VIS opsega elektromagnetnog spektra od strane elektrona, molekul prelazi iz osnovnog stanja u jedno pobuđeno stanje S1 ili S2. Ukoliko se molekul ekscitovao do stanja S2, posle veoma brzih procesa interne konverzije i vibracione relaksacije ($\sim 10^{-12}$ s) prelazi u prvi vibracioni nivo prvog pobuđenog stanja S1. Tokom ovih procesa energija se predaje okolini. Usled sudara sa molekulima iz okoline dolazi do procesa vibracione relaksacije i prelaska na nulti vibracioni nivo prvog pobuđenog stanja S1. Na ovaj način postaje prvi vibracioni nivo singleta S1 najnaseljeniji i molekul može preći u osnovno elektronsko stanje fluorescencijom (radijacioni proces dozvoljen po spinu i traje 10^{-9} s) ili singletnim gašenjem (neradijacionim procesom). Ekscitacioni i emisioni spektar se odnose kao

predmet i lik u ogledalu. Ukoliko dođe do neradijacionog prelaza, emisijski spektar će biti pomeren ka većim talasnim dužinama kada dolazi do *Stokesovog* pomeranja. Takođe, luminescencija može da nastane i anti-*Stokesovim* mehanizmom, kada elektron sa već pobuđenog nivoa posle ekscitacije se dodatno pobuđuje (obično termalno) i prelazi na neki viši energetski nivo.



Slika 2.3.2. Jablonski dijagram procesa fluorescencije i fosforescencije. Kada se ekscituju molekuli prelaze iz osnovnog stanja S_0 u pobuđeno stanje S_1 ili S_2 . Relaksacijom iz S_1 stanja dolazi do fluorescencije, a relaksacijom iz T_1 stanja dolazi do fosforescencije.

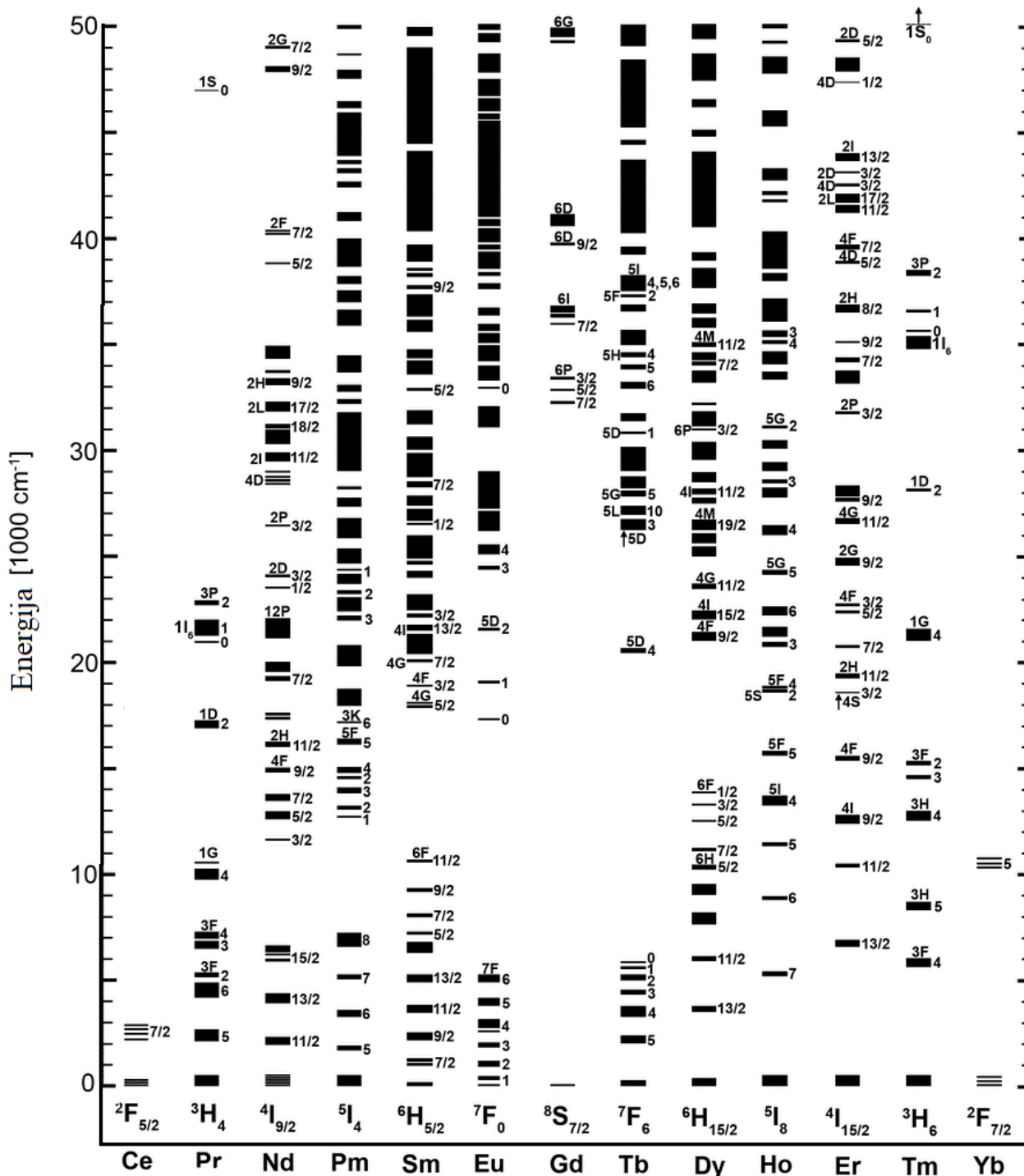
Molekul može untrasistemskim prelazom da pređe u pobuđeno tripletno stanje T_1 , posle čega sledi brzi proces vibracione relaksacije na najniži nivo tripletnog stanja. Ukoliko pređe na osnovni nivo S_0 radijacionim prelazom, elektron emituje foton u vidu fosforescencije, a vreme trajanja prelaza ($\sim 10^{-3}$ s) je obrnuto proporcionalno njegovoj verovatnoći. I u ovom slučaju je moguće da se vraćanje u S_0 stanje odvija neradijacionim procesom tripletnog gašenja.

Fotoluminescencija koja se javlja kod nanofosfora na bazi neorganskih materijala se može podeliti na *unutrašnju* i na *spoljašnju* fotoluminescenciju [70]. Unutrašnja fotoluminescencija je

rezultat elektronskih prelaza unutar samog materijala (matrice) i može biti *međuzonska* fotoluminescencija, *ekscitonska* fotoluminescencija i *rekombinaciona* fotoluminescencija. Spoljašnja fotoluminescencija je rezultat elektronskih prelaza u materijalima u kojima postoje defekti ili unesene nečistoće u vidu jona aktivatora. Spoljašnja fotoluminescencija neorganskih materijala može se podeliti na *nelokalizovanu* (ekscitaciono-emisioni procesi se odvijaju preko elektrona i šupljina matrice) i na *lokalizovanu* (ekscitaciono-emisioni procesi su vezani za lokalizovan luminescentni centar u vidu unete nečistoće (dopant jon) ili neke vrste kreiranog defekata) [70].

Nanofosfori na bazi neorganskih materijala u osnovi se sastoje od materijala domaćina (matrice) (eng. host material) i luminescentnog centra u vidu jona aktivatora (eng. activator). Na taj način joni aktivatora su okruženi jonima kristala matrice i formiraju luminescentne centre na kojima se dešavaju ekscitaciono-emisioni procesi [70]. Elektronska struktura atoma, koja je razlika između energetskih nivoa, upravlja njegovom sposobnošću da služi kao aktivator. Za postizanje što bolje efikasnosti luminescencije obično se dopira mala količina aktivatora u materijal matrice, reda veličine nekoliko atomskih procenata (mada može da ide i do 10 procenata). U nekim slučajevima aktivatori mogu biti i glavni konstituenti fosforinih materijala (npr. u mineralima). U najznačajnije aktivatore spadaju joni prelaznih metala (Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} itd.) i joni retkih zemalja (Eu^{3+} , Dy^{3+} , Sm^{3+} , Ce^{3+} , Tm^{3+} , Tb^{3+} itd.). Slika 2.3.3. prikazuje *Dieke*-ov dijagram energetskih nivoa trovalentnih jona retkih zemalja. Ovi energetski nivoi obuhvataju ultraljubičastu, vidljivu i infracrvenu oblast spektra. Talasna dužina emitovana od strane luminescentnog centra zavisi pre svega od vrste atoma aktivatora, njegove elektronske strukture, i od okruženja koje pruža kristalna matrica. Pored jona aktivatora nekada se fosforima dodaju i joni senzibilizatori (eng. sensitizer) kako bi se izvršio transfer energije. Dejstvom svetlosti na fosforini materijal, jon koji se prvi pobudi naziva se senzibilizator, a jon na koji se vrši transfer energije i koji potom emituje luminescenciju se naziva aktivator. Ukoliko se želi povećanje intenziteta anti-Stoksove emisije, mogu se dodati i različiti joni alkalnih metala (kao što je Li^+ joni) pored aktivatora i senzibilizatora.

Emisioni spektri fosfora koji su dopirani jonima retkih zemalja sastoje se od uskih, oštih traka, dok fosfori dopirani jonima prelaznih metala daju spektre širokih emisionih traka [70]. Joni retkih zemalja koji popunjavaju *4f* orbitale, koje su malog radijusa, zaštićeni su od spoljašnjeg uticaja atoma matrice i zbog toga zadržavaju slične optičke karakteristike u kristalnim rešetkama različitih matrica. Nasuprot njima, joni prelaznih metala popunjavanju *3d* orbitale koje su velikog radijusa i izloženi su uticaju okolnih atoma matrice, tako da im optičke karakteristike u velikoj meri zavise od kristalne strukture matrice i značajno se razlikuju u odnosu na slobodne jone.



Slika 2.3.3. Dieke-ov dijagram energetske nivoa trovalentnih jona retkih zemalja

Kako bi se ispoljili luminescentni prelazi koje poseduju dopanti u vidu retkih zemalja, materijal domaćin treba da se pre svega odlikuje dobrim provodnim karakteristikama. Energija koja je potrebna za prelazak elektrona iz valentne u provodnu zonu mora biti veća od energije fotona koja se emituje sa luminescentnog centra. Dielektrični potencijal matrice domaćina treba da bude

reda veličine većeg od 1 MeVcm^{-1} . Na taj način se onemogućava apsorpcija vidljive svetlosti i smanjuje intenzitet luminescencije usled rasejanja elektrona [71]. Takođe, materijal domaćin treba da bude termički stabilan, da se odlikuje velikom čvrstoćom i niskom rastvorljivošću u vodi, što su sve odlike fluorapatita koje su opisane u prethodnom poglavlju.

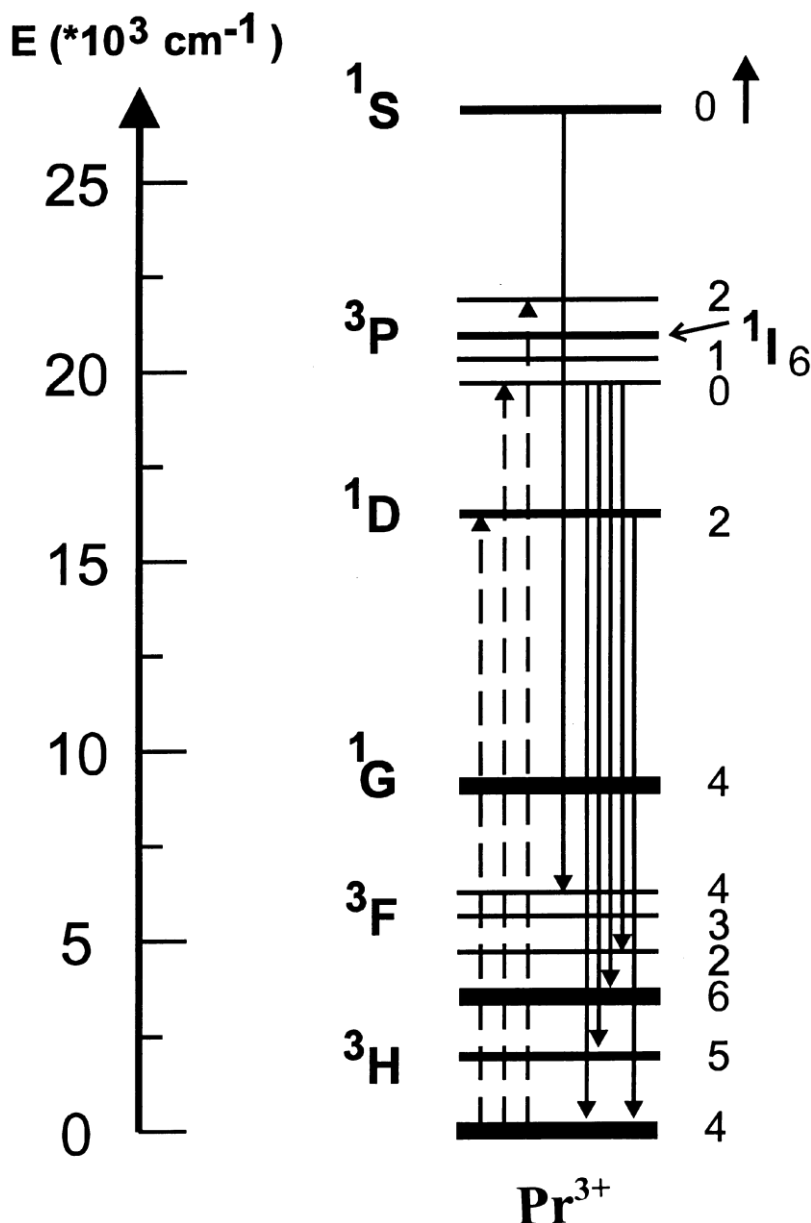
2.3.1. Prazeodimijum jon (Pr^{3+}) kao dopant

Prazeodimijum spada u grupu retkih metala iz serije lantanoida, i uvek se u prirodi javlja u mineralima zajedno sa drugim metalima retkih zemalja [72]. To je duktilni metal sa tvrdoćom uporedivom sa srebrom, kao i bojom i veoma je cenjen zbog svojih hemijskih, magnetnih, električnih i optičkih svojstava. Veoma je reaktivan da bi se našao u elementarnom obliku, tako da se u prisustvu vazduha prevlači slojem zelenog oksida. Najlakše formira oksidaciono stanje +3, koje je jedino stabilno u vodenom rastvoru. Sa hladnom vodom reaguje vrlo sporo, a sa toplom vodom reakcija je brza pri čemu nastaje prazeodimijum-hidroksid. U čvrstim jedinjenjima može biti u oksidacionom stanju +4, a u nekim posebnim uslovima i +5. Vodeni joni Pr^{3+} su žuto-zelene boje, ali takođe istu boju daje staklima i keramici kada se koristi kao pigment za bojenje [73]. U industrijskim aplikacijama se koristi zbog njegove sposobnosti da filtrira žutu svetlost iz izvora svetlosti. Dopiranje Pr^{3+} u fluoridno staklo omogućava mu da se koristi kao jednodimenzionalno optičko vlakno [74]. Silikatni kristali dopirani Pr^{3+} jonima korišćeni su za usporavanje svetlosnog pulsa od nekoliko stotina metara u sekundi [75]. Prazeodimijum kao sastojak dimidijum stakla absorbira UV zračenje pa se koristi za izradu naočara za zavarivače [73].

Prazeodimijum je treći član serije lantanoida, i nalazi se između cerijuma i neodijuma u periodnom sistemu. Ima 59 elektrona koji su raspoređeni u konfiguraciji $[\text{Xe}]4f^36s^2$. Teoretski svih 5 spoljnih elektrona mogu da se ponašaju kao valentni elektroni, ali aktivnost svih pet zahteva ekstremne uslove, tako da uglavnom ima tri valentna elektrona (retko u nekim jedinjenjima četiri). On je prvi lantanoid kod kog $4f$ orbitale imaju niži nivo energije od $5d$ orbitala. Prazeodimijum je paramagnetan na sobnoj temperaturi i za razliku od drugih lantanoida on je paramagnetan na svim temperaturama iznad 1 K [76]. Legure prazeodimijuma sa kobaltom i gvožđem su snažni stalni magneti koji se koriste za vetroturbine, pa se smatra veoma bitnim elementom u obnovljivim izvorima energije.

Joni Pr^{3+} se često koriste kao aktivatori u crvenim, zelenim, plavim i ultraljubičastim fosforima. Luminescencija prazeodimijuma se sastoji od nekoliko multipleta kao što su 400-410 nm ($^1\text{S}_0$ - $^1\text{I}_6$), 480-500 ($^3\text{P}_0$ - $^3\text{H}_4$), 610-630 ($^1\text{D}_2$ - $^3\text{H}_6$), 650-670 ($^3\text{P}_0$ - $^3\text{F}_2$), 750-770 ($^3\text{P}_0$ - $^3\text{F}_4$) i UV prelazi

(5d-4f) [1, 77]. Boja emisije Pr^{3+} jona zavisi mnogo od kristalne matrice domaćina, koncentracije jona aktivatora i uslova ekscitacije [78]. Slika 2.3.4. prikazuje dijagram energetske nivoa u Pr^{3+} sa skalom energija od $60\,000\text{ cm}^{-1}$, koja se sastoji od velikog broja energetskih prelaza.



Slika 2.3.4. Dijagram energetske nivoa u Pr^{3+} jonu [77].

Prazeodimijum spada u lake retke zemlje i nije previše toksičan. Otkriveno je da lake retke zemlje su od presudnog značaja za neke metanotrofne bakterije koje žive u vulkanima, kao što je *Methylacidiphilum fumarolicium* [79]. Međutim još uvek nije otkrivena njegova biološka uloga u nekom složenijem živom organizmu. Poslednjih godina mnoga istraživanja se bave ispitivanjem nanočestica na bazi retkih zemalja za bio-medicinske primene [80]. Utvrđeno je da toksičnost ovih nanočestica pre svega zavisi od njihovih hemijskih osobina, površine i veličine čestica. Zbog toga

postoji potreba za stavljanje ovih elemenata u matriks hemijskog jedinjenja koje će biti biokompatibilno, kao što je fluorapatit.

2.4. Sinteze nanofosfora na bazi fluorapatita za bio-medicinske primene

Kontrolisana sinteza luminescentnih nanočestica definisanog oblika, veličine i kristaliničnosti je važna za proučavanje korelacija između strukture i luminescentnih osobina, kako sa fundamentalnog tako i sa praktičnog stanovišta.

Nanomaterijali na bazi fluorapatita su prvobitno sintetisani reakcijama u čvrstom stanju na visokim temperaturama, kao i mehano-hemijskom metodom sinteze [81]. Dobijanje finijih nanostrukture fluorapatita je moguće kontrolisanim reakcijama iz rastvora u koje spadaju metode kao što su precipitacija, neutralizacija, hidrotermalni postupak, sol-gel postupak i sinteza u rastvoru podržana mikrotalasima. Od ovih metoda, luminescentni nanomaterijali na bazi fluorapatita dopirani retkim zemljama koji bi se primenjivali u bio-medicini su do sada najčešće sintetisani hidrotermalnim postupcima koji su bili praćeni nekim tipom obrade kao što je kalcinacija ili sušenje. U ovoj disertaciji je prikazano dobijanje takvih nanofosfora najjednostavnijim postupkom precipitacije, koji je praćen kratkom aktivacijom na povišenoj temperaturi. Svaki od ovih postupaka ima i prednosti i mane, kao i parametre koji utiču na osobine dobijenih luminescentnih nanomaterijala fluorapatita, a koje treba kontrolisati.

2.2.1. Sinteza u čvrstoj fazi

Obično su do sada fosfori na bazi dopiranih fluorapatita sintetisani reakcijom u čvrstoj fazi. Reakcije u čvrstoj fazi se odvijaju na visokim temperaturama, pa su glavni nedostaci ove metode formiranje velikih zrna i male hemijske homogenosti [81]. Takođe, zbog slabe kontrole procesa može doći i do formiranja neželjenih faza tokom reakcije. Kao krajnji proizvod se dobijaju čestice mikrometerske veličine. Najveći nedostaci ove sinteze su velika potrošnja energije i velike investicije u opremu.

Pojedinačni kristali fluorapatita dopirani Pr^{3+} jonima su sintetisani standardnom *Czochralski* metodom na temperaturi od oko 1500 °C [82]. Postupak sinteze se sastoji od zagrevanja reaktanata u komori preciznom kontrolom temperature. Kada se reaktanti potpuno rastope, mali semenski kristal montiran na kraju rotirajuće osovine polako se spušta u rastop, a potom veoma sporo povlači prema gore i izvlači monokristalni PrFAP. Osovina se okreće u smeru suprotnom kazaljci na satu, a

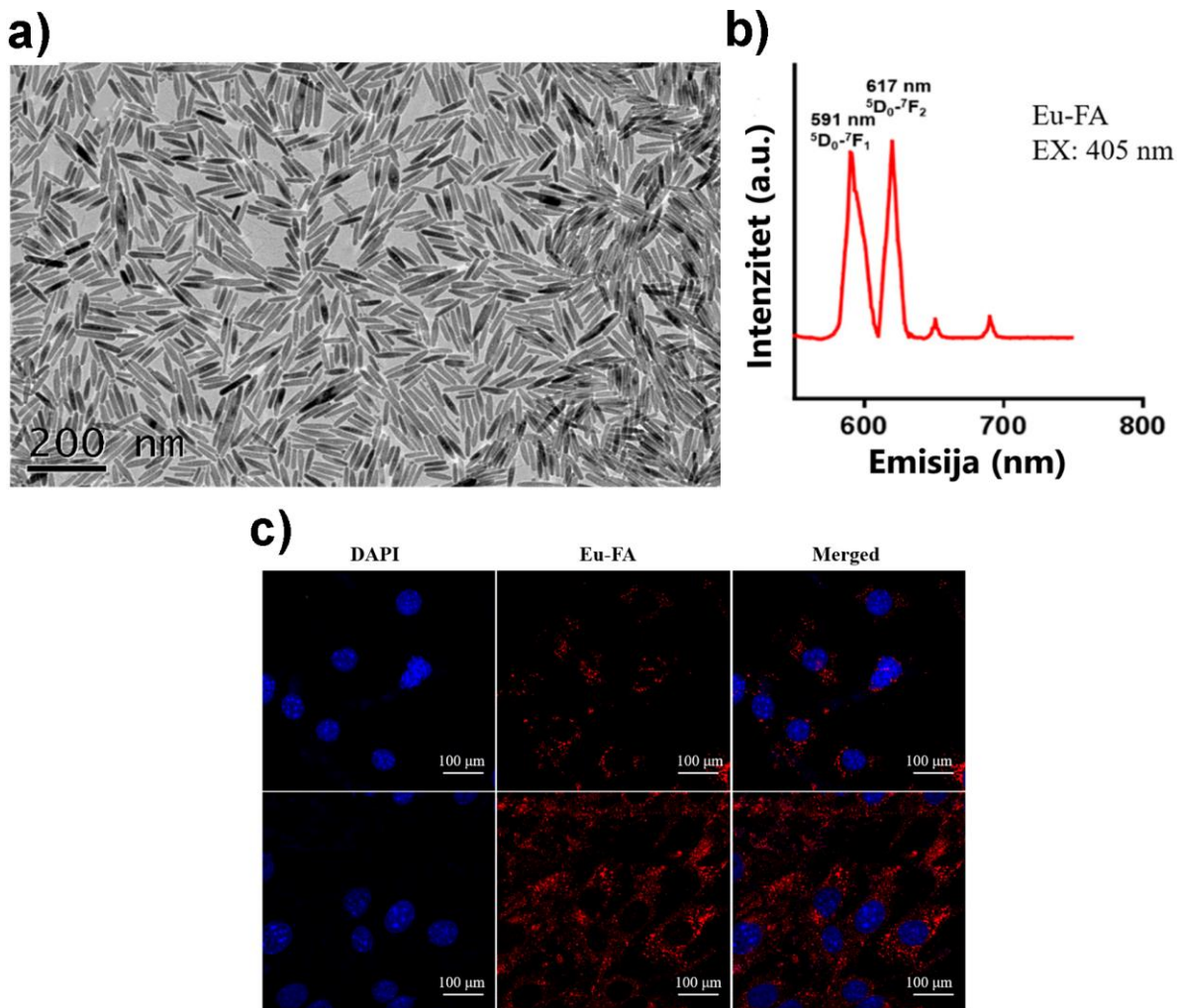
komora u smeru kazaljke na satu. Postupak se obično izvodi u inertnoj atmosferi argona (Ar). Na ovaj način dobijaju se monokristali mikrometarske veličine, koji se potom primenjuju u laserima.

2.2.2. *Sinteza iz rastvora*

Hidrotermalna metoda

Nanokristali fluorapatita dopirani retkim zemljama koji su do sada primenjivani kao kontrasti za biosnimanja su sintetisani hidrotermalnom metodom [3, 10]. Hidrotermalna sinteza se zasniva na prethodnoj pripremi perkusora, polaznih suspenzija ili rastvora i njihovom izlaganju visokim temperaturama (obično 400 °C) i pritiscima (100 MPa) u zatvorenom sistemu [81]. Pritom može da dođe do rastvaranja i reakcije između jedinjenja koji pri normalnim uslovima sinteze ne reaguju. Ovom metodom su dobijene čestice visoke čistoće, kontrolisane stehiometrije i veličine, uske raspodele veličine čestica, kontrolisane morfologije i mikrostrukture, visoke kristaliničnosti i tako dalje [81, 83]. Dobijanje čestica željene veličine i morfologije u hidrotermalnoj sintezi zahteva pažljivu kontrolu raznih termodinamičkih i netermodinamičkih parametara - temperature, pH, vremena sinteze i brzine mešanja, ali i vrste perkusora, njihova hemijska čistoća i veličina čestica perkursora [83].

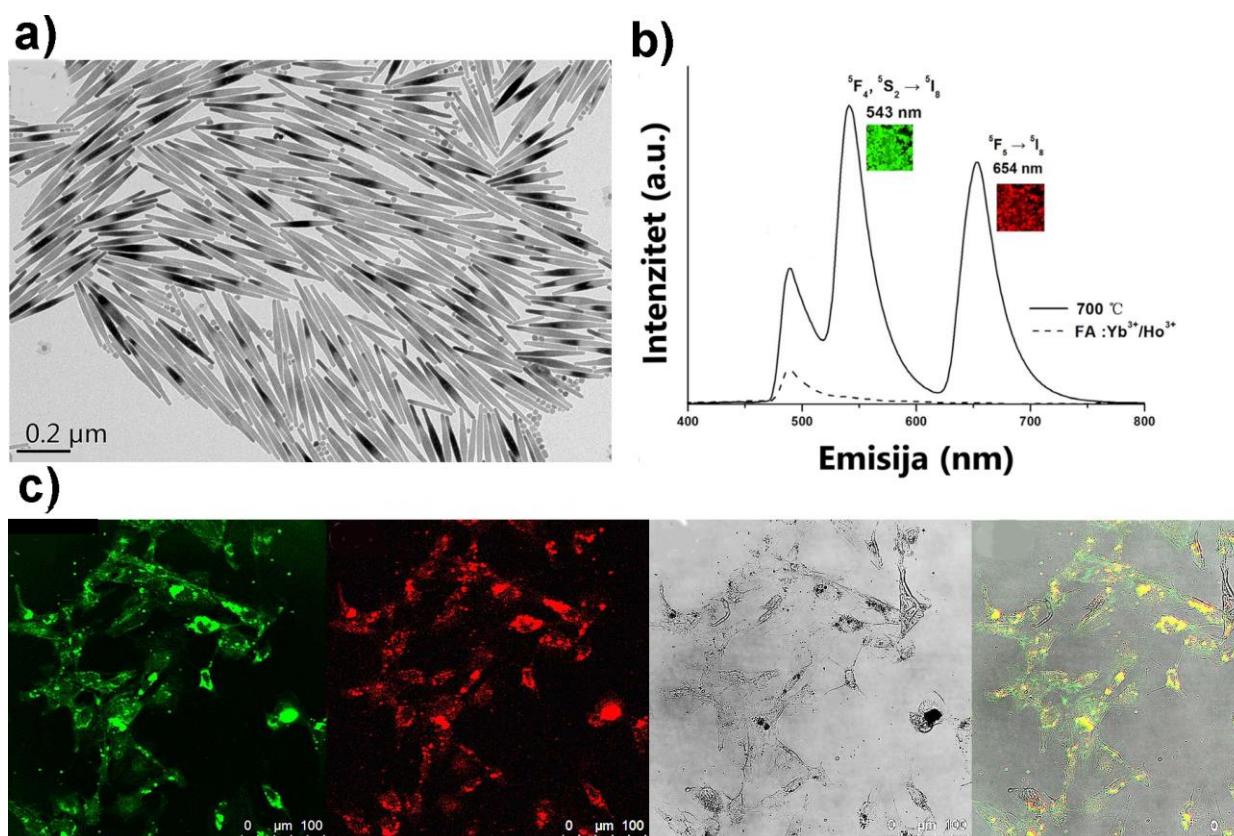
Down-konverzije nanaočestice FAP-a dopirane Eu^{3+} jonima su sintetisane hidrotermalnom metodom na 160 °C [10]. Prvo je oktadecilamin rastvoren u oleinskoj kiselini uz zagrevanje, a potom su dodati etanol i vodeni rastvor $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ uz mešanje. Nakon toga su dodavani NaF, $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ i Na_3PO_4 uz mešanje i zatim je suspenzija zagrevana na 160 °C 16 h. Dobijene nanočestice su odvojene centrifugiranjem iz suspenzije i osušene. Sintetisane nanočestice su štapićastog oblika veličine do oko 200 nm i pokazuju karakterističnu emisiju koja potiče od dopiranog Eu^{3+} jona na 591 i 619 nm pod UV ekscitacijom od 405 nm (Slika 2.4.1.). Potom su ćelije kancera A375 inkubirane sa luminescentnim nanočesticama Eu-FAP i posmatrane pod laser skenirajućim konfokalnim mikroskopom (LSM780, Carl Zeiss), u kontrastu sa ćelijama obojenim sa DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol). Crveni signal koji potiče od luminescencije Eu-FAP kristala je posmatran u citoplazmi, ali i u nukleusu koji je bio obojen u plavo sa DAPI.



Slika 2.4.1. (a) TEM mikrograf pokazuje Eu-FAP nanokristale štapićaste morfologije. (b) Crvena emisija Eu-FAP nanoprahova pod UV ekscitacijom. (c) Plava fluorescencija od DAPI i crvena fluorescencija od Eu-FAP nanočestica posmatrane u citoplazmi i nukleusu [10].

Up-konverzije nanočestice FAP-a dopirane sistemom $\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ su takođe sintetisane hidrotermalnom metodom na 160 °C, koja je praćena kratkom aktivacijom na 700 °C [3]. Kao i kod FAP-a dopiranog Eu^{3+} , sličan postupak je korišćen i u ovom slučaju. Oktadecilamin je rastvoren u oleinskoj kiselini i etanolu uz zagrevanje u autoklavu. Nakon toga su dodavani vodeni rastvori $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Ho}(\text{NO}_3)_3$, Na_3PO_4 i NaF uz mešanje. Suspenzija je zagrevana na 160 °C u trajanju od 16 h, nakon čega je ohlađena na sobnoj temperature, a nanočestice su odvojene centrifugiranjem i isprane. Dobijene nanočestice su aktivirane kalcinacijom na 700 °C, 2h u prisustvu vazduha.

Luminescentne nanočestice FAP:Yb/Ho su štapićastog oblika veličine od 16 do 286 nm. Ekscitacijom na 980 nm u NIR oblasti dobija se emisija na 543 i 654 nm. Ovakav profil luminescencije omogućava multifotonska snimanja na konfokalnom mikroskopu (Slika 2.4.2.).



Slika 2.4.2. (a) TEM mikrograf FAP:Yb/Ho nanokristala posle hidrotermalne sinteze na 160 °C. (b) *Up*-konverziorna emisija kristala sa (puna linija) i bez (isprekidana linija) aktivacije na 700 °C, sa gore ubačenim slikama emisije od konfokalnog lasera. (c) Slike multifotonske konfokalne luminescencije (ekscitovane sa 980 nm) [3].

Precipitaciona metoda

Sinteza ultračistih fluorapatitnih prahova sa nanometarskom veličinom monodisperznih čestica je moguća dobro kontrolisanim procesom taloženja. Proces taloženja uključuje mešanje dva ili više reaktanta, kada se hemijskom reakcijom između jona formira i taloži nerastvorno jedinjenje (precipitat), čija je koncentracija veća od proizvoda rastvorljivosti [81]. Sintetisani talog se izdvaja filtracijom, ispira, suši i na kraju obično kalciniše da bi se formirala željena kristalna faza. Uz veliki gradijent koncentracije i velike brzine reakcije teško se može kontrolisati dobijanje čestica uniformne veličine. Zato je potrebno obezbediti blago i kontinualno narušavanje koncentracione ravnoteže u perkursorskim rastvorima. Ako se novi nukleusi stvaraju u toku rasta kristala neće se kao krajni proizvod dobiti monodisperzni prah.

Nedavno su sintetisane nanočestice FAP-a dopirane Yb^{3+}/Er^{3+} sistemom metodom precipitacije podržanom mikrotalasima [17]. Prvo su odgovarajuće molarne koncentracije Yb^{3+} i Er^{3+} jona rastvorene u rastvor $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, pa su pomešane sa natrijum citratom $Na_3C_6H_5O_7$.

Zatim su smeši u kapima dodavani $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ i NH_4F . Ovako dobijena smeša je mešana 1h, a potom tretirana mikrotalasima 25 min (2.45 GHz, 600 W, 105 ± 5 °C). Dobijeni precipitati su termički tretirani na 1300 °C, 2 h. Dobijene nanočestice su bile štapićastog oblika veličine između 13 i 20 nm. Nanočestice su pokazivale emisiju u NIR oblasti na 1532 nm, koja se dobija ekscitacijom na 980 nm. Visoka biokompatibilnost dobijenih luminescentnih nanočestica u IR oblasti spektra, obećava moguće primene u biosnimanjima dobokih tkivnih struktura.

Nanokristali fluorapatita dopirani Pr^{3+} jonima su u ovoj disertaciji sintetisani najjednostavnijom metodom hemijskog taloženja tzv. ko-precipitacijom. Hemijska precipitacija se zasniva na činjenici, da je pri sobnoj temperaturi i u baznoj sredini (pH 10) fluorapatit najmanje rastvorljiv i obično najstabilnija faza kalcijum-fosfata u vodenom rastvoru [44]. Sa druge strane, hidroksiapatit je najstabilniji i najmanje rastvorljiv pri sobnoj temperaturi i u kiselj sredini na pH 4,2 [45, 84, 85]. Kako bi se dobili nanokristali FAP-a dopirani Pr^{3+} jonima, kao izvori katjona Ca^{2+} i Pr^{3+} upotrebljene su soli nitrata, a kao izvori anjona soli fosfata i fluorida. Tipičan postupak precipitacije uključuje dodavanje kap po kap jednog reagensa u drugi pod kontinuiranim i umerenim mešanjem, dok se održava molarni odnos elemenata Ca/P u stehiometrijskom odnosu u FAP-u od 1,67. Kao poslednji korak, rezultirajuća suspenzija se podvrgava starenju, filtrira, ispira i suši, i na kraju usitni u prah.

Morfologija, stepen kristaličnosti i raspodela veličine sintetisanih nanočestica apatita dosta zavise od metoda sinteze i vremena starenja precipitata. Prah koji se dobija jednostavnim procesom taloženja na sobnoj temperaturi je obično nestehiometrijski i slabo iskristalisan sa česticama bez nekog definisanog oblika. Mnogi faktori uzrokuju ove poteškoće, ali se smatra da primenjena pH vrednost i temperatura tokom reakcije taloženja i/ili koraka starenja su faktori od najvećeg uticaja. Nestehiometrijska karakteristika se može javiti kao rezultat defekata kristalne rešetke u vidu vakansi, zatim supstitucije različitih jona (kao sto su karbonati, natrijum i hlorid) ili prisustva dodatne faze itd. Pored pH vrednosti i temperature pokazano je da i brzina mešanja i ukapavanja rastvora takođe utiču na dobijanje stehiometrijskog fluorapatita. Ukapavanje rastvora anjona u rastvor katjona treba da je sporo uz umereno mešanje, kako bi se izbeglo stvaranje lokalnih nehomogenosti i dobio čist proizvod. Stoga, precizna kontrola procesnih parametara tokom sinteze je neophodna kako bi se dobili prahovi sa minimalnim defektima. Povećanje stepena kristaličnosti čestica je u direktnoj vezi sa porastom temperature tokom sinteze. U ovoj disertaciji nedostaci procesa taloženja na sobnoj temperaturi su otklonjeni naknadnim procesom termičke obrade dobijenih nanokristala u kratkom vremenu, kojim se postiže povećanje i kristaličnosti i intenziteta luminescencije.

3. Eksperimentalni deo

Dobijanje novih kontrastnih agenata za biosnimanja obuhvatalo je istraživanja iz nekoliko naučnih disciplina, pa je eksperimentalni deo ove disertacije podeljen u sedam celina. Prvo su sintetisani nanofosfori po jednostavnom i ekonomičnom postupku iz rastvora, koji je praćen termičkom aktivacijom u kratkom vremenu. Zatim se u drugoj fazi pristupilo fizičko-hemijskoj karakterizaciji dobijenih nanofosfora. U trećoj fazi detaljno su ispitane luminescentne osobine, i analizirani su podaci dobijeni fluorescentnom spektroskopijom primenom multivariacione analize. DFT kalkulacije su u četvrtoj fazi predvidele strukturne promene koje nastaju dopiranjem Pr^{3+} jona u FAP kristalnom sistemu u poređenju sa dobijenim eksperimentalnim podacima. U petoj i šestoj fazi su urađene studije hemokompatibilnosti i biokompatibilnosti. Na kraju u sedmoj fazi istraživanja urađena su *in vitro* i *ex vivo* biosnimanja dobijenih nanofosfora i ćelija kancera na fluorescentnim mikroskopima.

3.1. Sinteza luminescentnih nanokristala čistog FAP-a i FAP-a dopiranih Pr^{3+} jonima

Luminescentni nanokristali čistog FAP-a i FAP-a dopiranih Pr^{3+} jonima su sintetisani hemijskom metodom ko-precipitacije na sobnoj temperaturi (25 °C), nakon čega je usledila termička obrada na 110, 700, i 1000 °C. Za sintezu nanokristala korišćene su hemikalije p.a. čistoće i njihova lista je data u Tabeli 3.1.1. Sinteza nanofosfora je urađena u Laboratoriji za zaštitu od zračenja i zaštitu životne sredine Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ Univerziteta u Beogradu.

Tabela 3.1.1. Lista hemikalija korišćenih za sintezu FAP i PrFAP nanokristala

Hemikalija	Hemijska formula	Čistoća
Kalcijm-nitrat tetrahidrat	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	98,50%
Prazeodimijum-nitrat heksahidrat	$\text{Pr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	98,00%
Diamonijum-fosfat	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	99,00%
Amonijum-fluorid	$(\text{NH}_4)\text{F}$	96,00%
Amonijum-hidroksid	NH_4OH	99,99%

Pomoću hemikalija analitičke čistoće pripremljeno je nekoliko vodenih rastvora, tako što su $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ i $(\text{NH}_4)\text{F}$ rastvoreni odvojeno u bidestilovanoj vodi. Kako bi se dobila stehiometrijska FAP jedinjenja, atomski odnos $[\text{Pr}/(\text{Pr}+\text{Ca})] \cdot 100\%$ bio je 0, 0,1, 0,5 i 1% sa konstantnim molskim odnosom $(\text{Pr}+\text{Ca})/\text{P}$ koji je iznosio 1,67. Uzorci dopirani Pr^{3+} jonima su sintetisani sa količinom katjona od $(\text{Pr}+\text{Ca})=0,125$ mol. Rastvor anjona je dodavan postepeno u kapima u rastvor katjona uz neprestano mešanje suspenzije (500 rpm). Na taj način je postignuto homogeno presićenje uz sprečavanje pojave lokalnih nehomogenosti. Na kraju je pH vrednost suspenzije podešena na $10 \pm 0,5$ dodavanjem NH_4OH , pošto je ranije pokazano da je fluorapatit stabilan u baznoj sredini. Kako bi fluorapatit što bolje iskristalisao, suspenzija je podvrgnuta starenju u matičnom rastvoru 16 h na sobnoj temperaturi (25°C) uz konstantno mešanje (500 rpm). Posle 16 h starenja, suspenzija je filtrirana pomoću vakuumske filtracionog seta, a nastali talog je zatim tri puta ispiran bidestilovanom vodom. Filtriran i ispran talog zaostao na filter papiru je sušen u sušnici na 110°C tokom 12 h. Dobijeni amorfni nanomaterijali su dalje aktivirani kalcinacijom na 700°C i na 1000°C u atmosferi vazduha tokom 1 h. Konačno, nakon kalcinacije, dobijeni nanomaterijali su usitnjeni u prah. Nomenklatura prahova je prikazana u Tabeli 3.1.2.

Tabela 3.1.2. Nomenklatura sintetisanih uzoraka na osnovu atomskog udela Pr^{3+} i temperature obrade

Atomski udeo Pr^{3+} [%]	Oznaka uzorka		
	Sintetisani uzorci sušeni na 110°C	Aktivirani uzorci na 700°C	Kalcinisani uzorci na 1000°C
0%	FAPs	FAPa	FAPk
0,1%	PrFAP0.1s	PrFAP0.1a	PrFAP0.1k
0,5%	PrFAP0.5s	PrFAP0.5a	PrFAP0.5k
1%	PrFAP1s	PrFAP1a	PrFAP1k

3.2. Metode fizičko-hemijske karakterizacije nanokristala

Na osnovu fizičko-hemijske karakterizacije nanomaterijala proučavaju se njihova svojstva, dobijaju uvidi o postignutim željenim karakteristikama i potencijalnim primenama. Za karakterizaciju sintetisanih nanoprahova korišćene su uobičajne eksperimentalne metode za određivanje njihovog sastava, kristalne strukture, veličine čestica i morfologije. Kako je termička aktivacija bitan faktor u dobijanju željenih luminescentnih karakteristika, urađena je i termijska analiza sintetisanih uzoraka.

3.2.1. Rendgenska difrakcija praha (XRD)

Rendgenska strukturna analiza je fizička metoda pomoću koje se dobijaju osnovni parametri o kristalnoj strukturi ispitivanog materijala, tako što se vrši difrakcija X-zraka sa kristalografskih ravni. Prvenstveno se ovom metodom vrši kvalitativna analiza supstance dobijanjem karakterističnog difraktograma (svaki mineral ima svoj jedinstven otisak), ali se može uraditi i kvantitativna analiza daljom primenom matematičkih modela, kao što je *Ritveld*-ova analiza.

Rendgenska difrakcija praha (XRPD) snimljena je pomoću difraktometra Rigaku Ultima IV Japan u oblasti 2θ od 10° do 80° pri koraku od $0,02^\circ$ koristeći Cu $K\alpha$ zračenje ($\lambda = 1,540 \text{ \AA}$). Snimanja su vršena u Laboratoriji za materijale na Fizičkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Za određivanje parametara jedinične ćelije a , c i V dobijenih nanomaterijala korišćen je program „Fullprof“ i podprogram „Le Bail fit“ koji se nalazi u paketu. Fitovanje je vršeno u odnosu na standard sintetičkog fluorapatita.

Prosečna veličina kristalita d (nm) izračunata je korišćenjem *Scherrer*-ove formule (1):

$$d = 0,9\lambda / \beta \cos\theta \quad (1)$$

gde su:

λ - talasna dužina rendgenskih zraka,

θ - je Bragov ugao difrakcije,

β - je širina difrakcionog maksimuma na polovini visine najintenzivnijeg pika.

3.2.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR) je pre svega kvalitativna analiza na osnovu koje je izvršena identifikacija karakterističnih apatitnih funkcionalnih grupa prema položaju apsorpcionih traka u infra-crvenom spektru. Pored glavnih funkcionalnih grupa FTIR analizom mogu biti detektovane i nečistoće. Snimanja dobijenih uzoraka su vršena u srednjoj oblasti infracrvnog spektra (MID-IR od 400-4000 cm^{-1}) i u dalekoj oblasti (FAR-IR od 200-400 cm^{-1}). Dok se srednja oblast IR spektra koristi za identifikaciju osnovnih vibracija supstance, daleka oblast IR spektra se koristi za detekciju teških atoma neorganskih supstanci čije se vibracije ne pojavljuju u srednjoj oblasti.

Infracrveni spektri (FTIR) snimljeni su spektrofotometrom Nicolet 6700 FTIR, Thermo Scientific i ATR tehnikom na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Na istom uređaju su snimljeni i FAR spektri pomoću ekstenzije za FAR infracrvenu spektralnu oblast.

3.2.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) sa elementalnom analizom (EDX)

Morfologija i veličina čestica nanofosfornih materijala su bitni faktori koji određuju njihove luminescentne osobine, kao što je intenzitet fluorescencije, pa samim tim i primene. Za osnovnu karakterizaciju morfoloških osobina sintetisanih uzoraka odabrana je skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM). Skenirajuća elektronska mikroskopija zasniva se na interakciji materijala sa visokoenergetskim usmerenim snopom elektrona koji emituje katoda. Usled ovih interakcija dolazi do formiranja slike na osnovu detekcija sekundarnih elektrona čiju emisiju uzrokuje ekscitovanje usmerenim snopom elektrona.

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) uzoraka je urađena na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu na skenirajućem elektronskom mikroskopu SEM, JEOL JSM-6390LV na sobnoj temperaturi sa pogonskim naponom 30 kV u atmosferi azota. Mapiranje hemijskog sastava uzoraka je dobijeno sa energetski disperzionom rendgenskom spektroskopijom (EDS, Oxford Aztec X-max) koja radi u sklopu SEM uređaja. Pre analize, površina uzorka je prevučena slojem zlata.

3.2.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija sa emisijom polja (FE-SEM)

Morfološka karakterizacija aktiviranih uzoraka na nanometarskom nivou izvršena je

skenirajućom elektronskom mikroskopijom sa emisijom polja (FE-SEM), kod koje se emisija elektrona umesto katodom postiže pomoću jakih polja (eng. Field Emission). FE-SEM može da postigne uvećanja i do milion puta i da se pored analize površine nanomaterijala koristi za analizu veličine i raspodele čestica.

Skenirajuća elektronska mikroskopija sa emisijom polja (FE-SEM) izvedena je na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa TESCAN Mira3 KSMU koji radi na 20 kV na sobnoj temperaturi. Pre analize na FE-SEM-u uzorci su naparavani metodom katodnog spaterovanja na uređaju Polaron SC 7610 i prevučeni tankim slojem zlata.

3.2.5. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) sa elementalnom analizom (EDX)

Morfologija i veličina primarnih nanočestica aktiviranih uzoraka su detaljnije analizirani transmisionom elektronskom mikroskopijom (TEM). Princip rada TEM mikroskopa je isti kao kod SEM mikroskopa, ali je mehanizam formiranja slike drugačiji. Pored sekundarnih elektrona koji se detektuju i formiraju sliku kod SEM, postoje i povratno rasejani elektroni i X-zraci. Kao što i samo ime kaže TEM formira sliku na osnovu propuštenih elektrona u unutrašnjosti uzorka. Prema tome TEM analiza uzoraka se vrši u tankom i transparentnom sloju. Današnji TEM mikroskopi dostižu uvećanje i do 1,5 milion puta, čime se omogućava izučavanje molekulske strukture materijala, rasporeda kristala pa čak i detekcija atoma u kristalima.

TEM analiza rađena je u Laboratoriji za atomsku fiziku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ Univerziteta u Beogradu pomoću mikroskopa FEI Talos F200X koji radi pri naponu od 200 keV. Mikrografi su napravljeni u konvencionalnom i skenirajućem TEM (STEM) modu i snimljeni CCD kamerom sa rezolucijom od 4096×4096 piksela pomoću User Interface softverskog paketa. Sistem energetski disperzione rendgenske spektroskopije (EDX) spojen sa TEM-om, koji radi u STEM modu, je korišćen za analiziranje hemijske kompozicije uzoraka. HAADF (eng. High-angle annular dark-field) slike su dobijene u nanoprobe-TEM modu sa kamerom dužine od ~200 mm. Uzorci koji su ispitivani pomoću TEM-a su pripremljeni prema standardnoj proceduri, po kojoj su prvo čvrsti prahovi dispergovani u etanolu, a potom je uzeta kap rastvora i naneta na bakarnu mrežicu prevučenu ugljenikom i ostavljena da se osuši na vazduhu.

3.2.6. Difrakcija laserske svetlosti (DLS)

Difrakcija laserske svetlosti (DLS) je tehnika kojom se *in situ* vrši karakterizacija veličine nanočestica u suspenziji na osnovu merenja njihovog koeficijenta difuzije (D) i određivanja hidrodinamičkog prečnika po formuli (2):

$$D = k_B T / 6\pi\eta R \quad (2)$$

gde su:

k_B - Bolcmanova konstanta

T - temperatura

η - viskoznost sredine

R - hidrodinamički prečnik sfernih čestica

Difrakcija laserske svetlosti (DLS) uzoraka je urađena na Katedri za inženjerstvo materijala na Tehnološkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu. Raspodela veličine čestica je određena pomoću dinamičkog rasejanje svetlosti, a zeta potencijal čestica određen je faznom analizom rasejanja svetlosti i mešovitim modom merenim pomoću instrumenta Zetasizer Nano ZS sa MPT-2 Autotitrator Malvern Instruments, Malvern, U. K. Kod DLS merenja pretpostavljen je sferni oblik nanočestica.

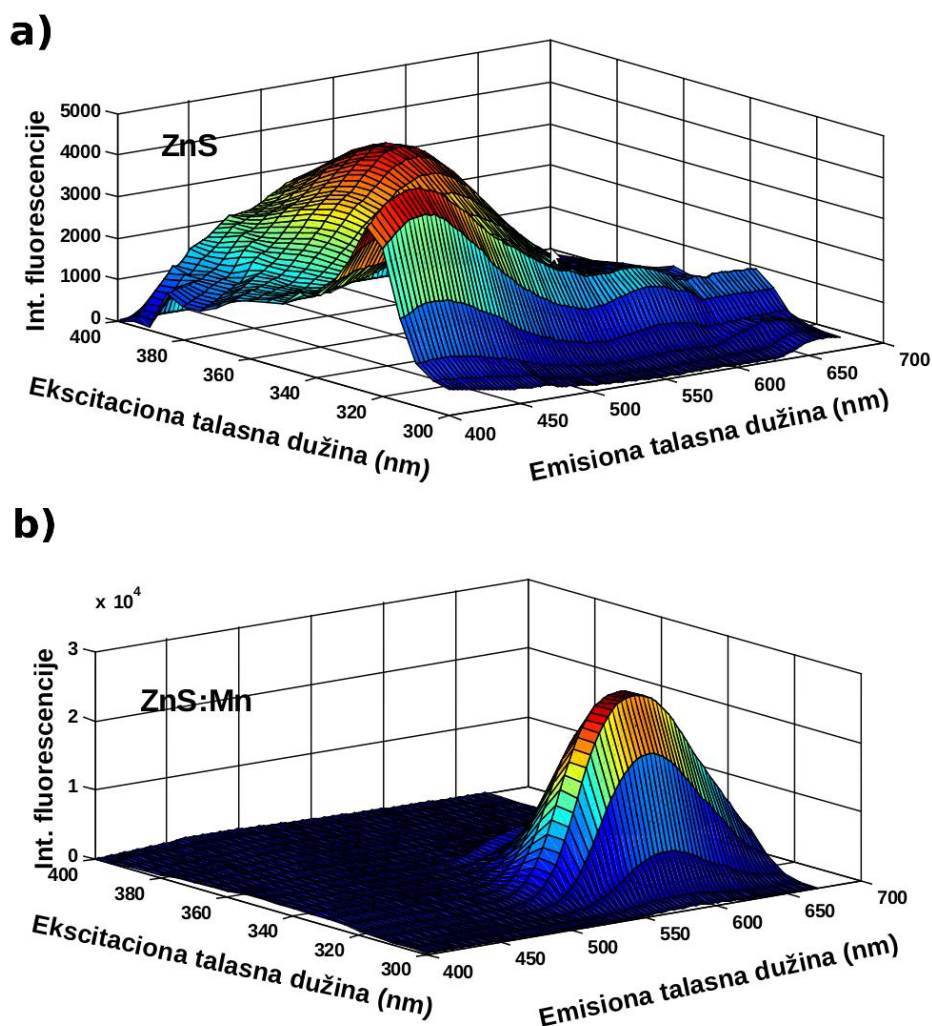
3.2.7. Termijske metode analize (TG-DSC)

Za dobijanje nanofosfora na bazi dopiranih fluorapatita potrebno je dobro poznavanje termičke stabilnosti i faznih prelaza tokom termičkih tretmana. Termičko ponašanje uzoraka je ispitivano termogravimetrijskom analizom (TG), a promena faza i dekompozicija fluorapatita su praćene diferencijalnom skanirajućom kalorimetrijom (DSC). TG analiza je metoda kojom se prati promena mase ispitivanog uzorka u funkciji temperature. DSC metoda prati promenu entalpije (endotermne i egzotermne prelaze) u funkciji temperature koja se dešava istovremenim zagrevanjem ispitivnog uzorka i referentnog materijala (standarda).

Termička analiza je urađena pomoću SDT Q-600 simultanog TGA-DSC instrumenta u Laboratoriji za termičku analizu na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu. Merenja su sprovedena sa stopom zagrevanjem 20 K/min u N_2 atmosferi (protok je bio 50.0 ml/min) u temperaturnom opsegu od 30–1200 °C. Za eksperimente su korišćeni uzorci od po 3 mg, zajedno sa standardom Al_2O_3 .

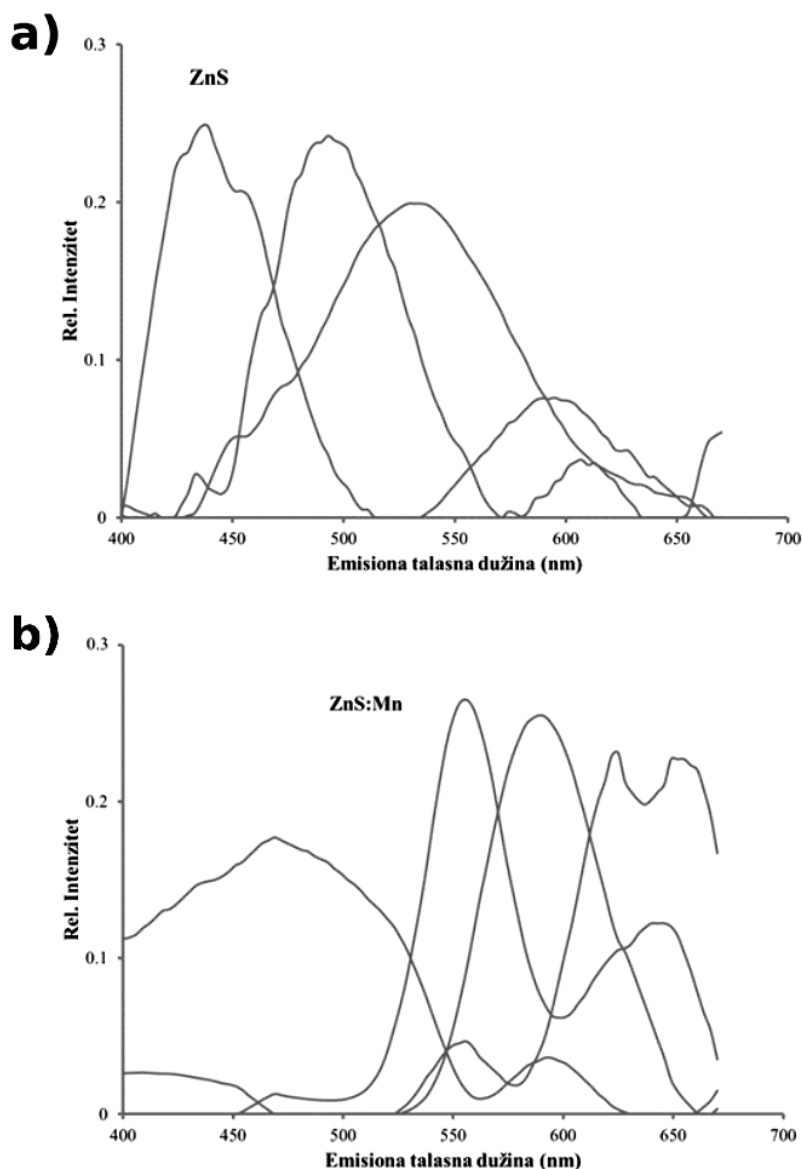
3.3. Ispitivanja nanokristala fluorescentnom spektroskopijom i analiza spektara

Primena spektroskopskih metoda u naučnim istraživanjima u oblasti materijala, ali i medicine, ima značajni porast poslednjih decenija jer su brze i neinvazivne. Do ovog porasta primene spektroskopskih metoda je došlo i zbog primenjene matematike koja je uvećala opšta znanja iz oblasti analiziranja spektroskopskih podataka. Tako se danas spektroskopijom može uraditi i kvalitativna i kvantitativna analiza uzoraka, i izvesti zaključci o fizičkim i hemijskim osobinama. Veći deo ove disertacije je baziran na primeni fluorescentne spektroskopije, koja je vrlo osetljiva metoda jer može da detektuje i nekoliko fotona istovremeno. Izlaganjem uzorka seriji ekscitacija određenih talasnih dužina sa detektovanjem emisije na takođe više talasnih dužina, dobijeni podaci se mogu prikazati u vidu ekscitaciono-emisione matrice. Kao primer formiranja ekscitaciono-emisionih matrica su uzeti uzorci nanokristala ZnS i dopirani ZnSMn (Slika 3.2.1.)



Slika 3.3.1. Grafički prikaz ekscitaciono-emisionih matrica sa kontur mapom (a) nanokristala ZnS i (b) dopiranih ZnSMn nanokristala. Emisija pokazuje jasan crveni pomeraj dopiranjem Mn [69].

Multivarijaciona rezolucija krivih je hemometrijski metod koji se pomoću bilinearne dekompozicije eksperimentalne matrice uspešno koristi za ekstrahovanje relevantnih informacija o čistim komponentama u višekomponentnim sistemima [69]. U slučaju fluorescentne spektroskopije, svaki red matrice podataka korespondira broju ekscitacionih talasnih dužina, a svaka kolona predstavlja odgovarajuću emisionu talasnu dužinu. Rešenje matrice se može dobiti metodom naizmeničnih najmanjih kvadrata i ekstrahovanjem komponentata sistema (Slika 3.2.2.).



Slika 3.3.2. Grafički prikaz ekstrahovanih komponentata MRC-ALS metodom iz ekscitaciono-emisione mape (a) nanokristala ZnS i (b) dopiranih nanokristala ZnSMn. Dopiranjem Mn ostaju komponente sa maksimumom na oko 450 i 550 nm, a formiraju se nove komponente na 600 i 650 nm zbog nastanka novih hemijskih veza [69].

Spektrofluorimetar Horiba Jovin Ivon Fluoromax 4 TCSPC, koji se nalazi na Departmanu za žive sisteme na Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, korišćen je za ispitivanje fluorescentnih svojstava uzoraka. Za sve ekscitacije korišćena je Xe lampa jačine 450 W. Mape fluorescencije uzoraka dobijene su u opsegu od 350-650 nm, a spektri su mereni uz integraciono vreme od 0,1 s i 1 nm za ekscitacione i emisione slitove. Sva merenja su izvršena na sobnoj temperaturi. Za svaki uzorak prikupljen je niz emisionih spektara ekscitovani variranjem talasnih dužina sa korakom od 3 nm u opsegu 320-350 nm za sintetisane i kalcinisanе uzorke i 400-500 nm za aktivirane dopirane uzorke. Na ovaj način se formira matrica ekscitacija i emisija sa dimenzijom 11x251 za svaki uzorak, koja je analizirana pomoću multivarijacione rezolucije krivih-naizmeničnih najmanjih kvadrata (MCR-ALS). Sve MCR-ALS analize su izvršene korišćenjem softverskog paketa (Camo ASA), kao i metodama koje su razvijene na istom Departmanu za žive sisteme Instituta za multidisciplinarna istraživanja.

Na osnovu ekstrahovanih fluorofora od interesa, takođe je merena fluorescencija nanokristala korišćenjem ekscitacija na talasnim dužinama koje su jednake onima koje su korišćene za fluorescentnu mikroskopiju (405 nm/488 nm).

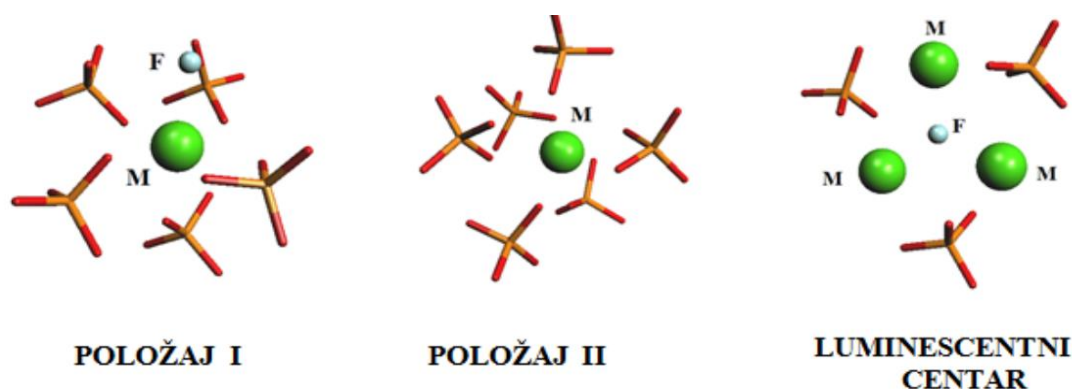
3.4. Predviđanje strukturnih promena kvantno-hemijskim proračunima

Molekulsko modelovanje u računarskoj hemiji se vrši različitim pristupima i nivoima teorije, u zavisnosti od tipa problema koji se rešava. Za ovu studiju je izabrana DFT metoda koja opisuje elektronska stanja materijala preko raspodele elektronske gustine sistema. Teorija funkcionala gustine (eng. Density Functional Theory (DFT)) je računarski kvantno mehanički metod modelovanja, koji može odrediti osobine elektronskog sistema korišćenjem funkcije gustine elektrona. Najviše primenjivan je hibridni funkcional B3LYP (eng. Becke, 3-parameter, Lee-Yang-Parr) metod [86]. To je hibridni funkcional koji sadrži i DFT izmenske korelacione energije i izmensku energiju Hartree-Fock-a (popravka energije za klasično kulonovsko odbijanje), kako bi se poboljšale performanse proračuna. Pored odabira nivoa teorije kojom se vrši modelovanje, bitan je i odabir bazičnog skupa, vektora koji definiše prostor u kome se rešava dati problem [87].

Kvantno-hemijski proračuni su rađeni u cilju ispitivanja uticaja zamene Ca^{2+} jona Pr^{3+} jonom na supramolekularnu strukturu dopiranog fluorapatita. Početna struktura FAP-a optimizovana je metodom hibridnog funkcionala B3LYP, a izmenjene strukture Pr^{3+} dopirane FAP-a optimizovane su metodom nerestriktivnog B3LYP (UB3LYP). Ovaj hibridni funkcional u kombinaciji sa bazisnim skupom 6-31G (d) ili 6-31G (d,p) je standardan za molekulsko

modelovanje. Svi proračuni su izvršeni u softverskom paketu Gaussian09 (verzija D.01) [88], a greška BSSE (eng. Basis Set Superposition Error) je uklonjena „conterpoise“ komandom (CP) [89]. Proračuni su rađeni na Institututu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu. Numeričke simulacije su rađene korišćenjem PARADOX superkompjuteru Instituta za fiziku Univerziteta u Beogradu.

Preliminarna analiza kristalnih struktura FAP-a dobijenih iz baze kristalnih struktura časopisa „*American Mineralogist*“ rađena je u cilju kreiranja model sistema za kvantno-hemijske proračune koji mogu da reprodukuju fluorescentne spektre dopiranih FAP-a [90]. *Ab initio* proračuni fluorescentnih spektara su urađeni za tri geometrije, sa jonima metala u položajima I i II, dok treći model sistem sadrži tri katjona metala, tri PO_4^{3-} jona i F^- jon u centru (luminescentni centar (slika 3.4.1)). Treći model sistem pokazao je najbolje slaganje sa eksperimentalnim podacima.



Slika 3.4.1. Model sistem za kvantno-hemijske proračune za reprodukciju fluorescentnih spektara dopiranih fluorapatita [90].

3.5. Studije hemokompatibilnosti

Hemokompatibilnost ispitivanog nanomaterijala se može definisati kao sposobnost materijala da u kontaktu sa ljudskom krvlju u određenom vremenskom periodu ispitivanja ne uzrokuje promene krvi, tj. njenog sastava [91]. Krv po sastavu čine 50-60% krvna plazma i od 50-40% krvne ćelije (eritrociti, leukociti i trombociti) [83]. Kada je krv u kontaktu sa nanomaterijalima može doći do liziranja eritrocita i do oslobađanja hemoglobina u krvnu plazmu, što u organizmu može izazvati oštećenja jetre i renalne funkcije. Slobodni hemoglobin ima karakterističnu absorbanciju na 540 nm, pa je to iskorišćeno u ispitivanju hemolitičkih osobina ispitivanog

nanomaterijala.

Hemolitički *in vitro* testovi su neophodni kako bi se izvršila evaluacija biokompatibilnosti i toksičnosti nanokristala koji su u kontaktu sa ćelijama ljudske krvi. Hemolitička aktivnost dobijenih uzoraka je ispitivana metodom koja je opisana u literaturi [92, 93], a testovi hemolize su izvedeni po protokolima u Laboratoriji za fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ Univerziteta u Beogradu. U posebne plastične kivete je dodano po 100 mg svakog sterilnog uzorka nanokristala, zajedno sa 10 ml sterilnog fiziološkog rastvora (Hemofarm, Srbija). Uzorci sveže krvi korišćeni u testovima su dobijeni od zdravih ljudi volontera u ambulanti Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ Univerziteta u Beogradu. Uzorak sveže krvi od 8 mL je razblažena sa 10 ml sterilnog fiziološkog rastvora i po 0,2 ml ove razblažene krvi je dodano u svaku kivetu sa uzorcima nanokristala. Kivete sa smešom su stabilizovane na 37 °C u trajanju od 30 min, a potom su inkubirane na istoj temperaturi u vodenom kupatilu sa šejkerom u trajanju od 60 minuta. Posle inkubacije kivete sa smešom su centrifugirane sa 700 rpm u trajanju od 10 minuta. Iz tečnosti koja se nalazi iznad čvrstog ostatka nakon centrifugiranja (supernatant) količina slobodnog hemoglobina je određivana spektrofotometrijski. Za analizu slobodnog hemoglobina u supernatantu na 540 nm korišćen je Perkin Elmer Lambda 35 UV–VIS spektrofotometar. Pored ovih uzoraka bile su uključene i pozitivna kontrola (destilovana voda) i negativna kontrola (sterilni fiziološki rastvor). Stepem hemolize (*HR*) ja računat prema jednačini (1):

$$HR = (Dt - Dnc)/(Dpc - Dnc) \times 100\% \quad (3)$$

gde su:

Dt – absorbanca uzoraka,

Dnc – absorbanca negativne kontrole i

Dpc – absorbanca pozitivne kontrole.

Svi eksperimenti hemolize su ponovljeni tri puta, a prikazani rezultati se odnose na srednje vrednosti.

3.6. Studije biokompatibilnosti

Procena tolerancije živog tkiva na nanomaterijale može se izvršiti na osnovu *in vitro* testova njegove biokompatibilnosti. Stvarna procena biokompatibilnosti se može dobiti samo u *in vivo* testovima na eksperimentalnim životinjama, a potom kroz sveobuhvatna klinička ispitivanja. Pored

biokompatibilnosti nanočestica sa ljudskom krvlju, ispitivana je i biokompatibilnost sa ćelijama kancera. Studija biokompatibilnosti nanokristala je izvedena na Departmentu za Nanofotoniku Internacionalne laboratorije za nanotehnologije (INL) u Bragi u Portugaliji.

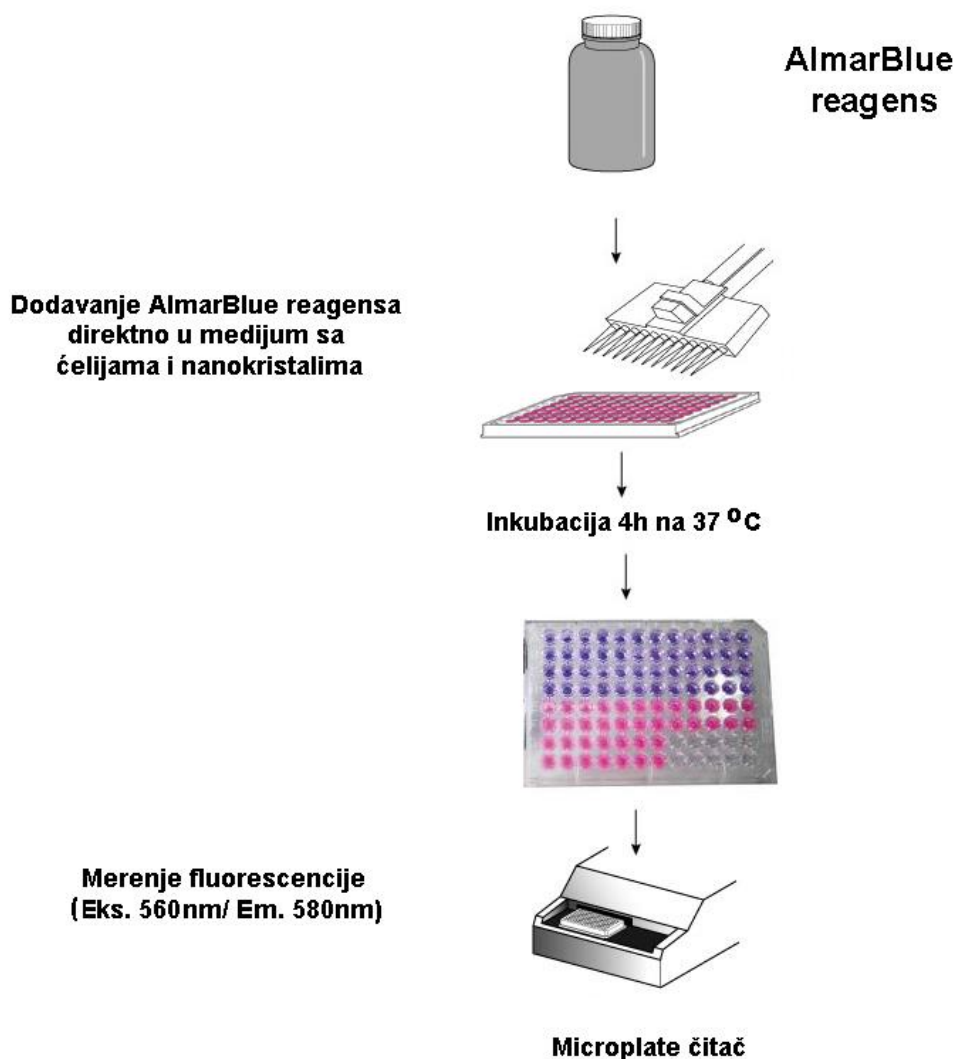
3.6.1. Ćelijska kultura

Za studiju vijabilnosti ćelija (broj zdravih ćelija u totalnom ćelijskom uzorku) i eksperiment biosnimanja, kultivisane su dve različite linije ćelija kancera. Ćelijske linije ljudskog karcinoma pluća A549 i karcinoma kože A431 su održavane u posudama za kultivaciju tkiva T75 (eng. Flasks) na 37 °C u 5% CO₂ atmosferi. Ćelije su bile kultivisane u DMEM (eng. Dulbecco Modified Eagle Medium) ćelijskom medijumu (Lonza BioWhittaker) sa 4.5 g/l glukoze i sa dodatkom 10 %v/v HyClone Fetal Clone III Serum (GE Healthcare) i 1 %v/v Penicillin/Streptomycin rastvora.

3.6.2. Studije vijabilnosti ćelija

Kako bi se ispitala biokompatibilnost ćelija kancera i nanokristala, ćelije su kultivisane u 96 odeljaka na pločici sa 5×10^3 ćelija/odeljku sa 100 µl DMEM ćelijskog medijuma tokom 24 h. Zatim su u svaki odeljak sa ćelijama dodavani kontrolni FAP i PrFAP nanokristali u koncentracijama 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 31, 63, 125 i 250 mg/ml i inkubirani tokom 72 h. Za kvantifikaciju vijabilnosti ćelija je u svaki odeljak sa 100 µl ćelijskog medijuma dodano 10 ml rastvora Resazurin 42 (koji se komercijalno naziva Alamar Blue) [94] razblaženog do 0,05 mg/ml u PBS-u, a zatim je usledila inkubacija 4 h na 37 °C. Fluorescencija je očitana na čitaču Microplate (SinergiH1, BioTek) sa ekscitacijom na 560 nm i emisijom na 590 nm (ilustracija na Slici 3.6.1.). Rezultati su analizirani u odnosu na kontrolne ćelije koje su kultivisane bez dodavanja nanokristala. Svi eksperimenti su izvedeni u tri primerka i izvedena su tri nezavisna eksperimenta.

Morfološka analiza ćelijskih linija izvedena je na optičkom mikroskopu (SMZ 745, Nikon) pre i posle 72 h inkubacije sa nanokristalima.



Slika 3.6.1. Studije vijabilnosti ćelija pomoću *AlmarBlue* reagensa

3.7. Studije biosnimanja fluorescentnim mikroskopima

Studije biosnimanja su izvedene pomoću fluorescentne mikroskopije širokog polja i konfokalne mikroskopije na Departmentu za Nanofotoniku Internacionalne laboratorije za nanotehnologiju u Bragi u Portugaliji. U klasičnoj fluorescentnoj mikroskopiji širokog polja se istovremeno ekscituje celo vidno polje izvorom svetlosti, dok se kod konfokalne selektivno ekscituju fluorofore u horizontalnoj ravni i tako detektuje fluorescencija po dubini uzorka [95]. U konfokalnoj mikroskopiji se koriste laseri određene talasne dužine koji ekscituju pojedinačne fluorofore, tako se ne može videti osvetljeno celo vidno polje kao kod klasične, nego se naknadno

softverima formira ukupna slika.

3.7.1. Priprema uzoraka za snimanje

Ćelije kancera A431 i A549 su kultivisane u 8 odeljaka na μ -slajdovima (Ibidi GmbH, slika 3.7.1.) sa 100 ml DMEM u toku 24 h. Nakon toga, ćelijama su dodani kontrolni FAP i PrFAP nanokristali u koncentraciji od 125 $\mu\text{g/ml}$ i zajedno su inkubirani tokom 48 h. Posle inkubacije, odeljci sa ćelijama su isprani tri puta fiziološkim rastvorom fosfatnog pufera (PBS) da bi se uklonili suvišni nanokristali, a zatim su ćelije fiksirane sa 4% paraformaldehidom (PFA). Na kraju je dodan PBS u svaki odeljak i ćelije su snimane na mikroskopima.



Slika 3.7.1. Pločica sa μ -slajdovima (Ibidi GmbH) za pripremu ćelija za biosnimanja na luminescentnom konfokalnom i mikroskopu širokog polja [96].

3.7.2. Fluorescentna mikroskopija širokog polja

Ćelije inkubirane sa PrFAP nanokristalima posmatrane su fluorescentnim mikroskopom širokog polja (NikonTi-E), slika 3.7.2, upotrebom laserskih ekscitacija od 488 nm i 405 nm (Agilent). Fluorescentni mikroskop širokog polja je opremljen odgovarajućim setom filtera za emisiju (Semrock) kako bi se blokirala sva neželjena svetlost izvan opsega emisije (uklonila autofluorescencija ćelija). Ovo je značajno u situacijama kada je nivo signala koji dolazi iz uzorka nizak, jer tada setovi filtera sa širokim opsezima omogućavaju maksimalnu efikasnost prikupljanja signala. Mikroskop je opremljen i ultra osetljivom EM-CCD kamerom (iXon 897, Andor) dizajniranom za detekcije u sistemima sa niskim nivoom signala emisije, pružajući izuzetnu brzinu frejmova i osetljivost od jednog fotona.



Slika 3.7.2. Fluorescentni mikroskop širokog polja (NikonTi-E) [97].

3.7.3. Konfokalna mikroskopija

Osnovna prednost konfokalne fluorescentne mikroskopije u odnosu na klasičnu je detektovanje emisije iz veoma malog volumena u uzorku. Pored toga, konfokalnom mikroskopijom se selektivno detektuje emitovana fluorescencija iz tankog sloja po dubini iz samo jedne fokalne ravni, pri čemu svetlost od drugih ravni ostaje blokirana zaslonom uređaja. Ovo omogućava proučavanje pojedinačnih delova u ćeliji, pa i samih organela.

Ćelijska internalizacija PrFAP nanokristala i njihova lokalizacija u citoplazmi okarakterisane su snimanjem fluorescencije pomoću konfokalnog mikroskopa (LSM780, Zeiss), slika 3.7.3, sa laserskim ekscitacijama na 488 nm. Emisija luminescencije sakupljena je u rasponu od 499 do 692 nm.



Slika 3.7.3. Konfokalni mikroskop Zeiss LSM 780 [98].

3.7.4. Analiza slike

Slike dobijene kod mikroskopije širokim poljem analizirane su sa Fiji-ImageJ softverom. Konfokalne slike z-preseka i ortogonalni prikaz kreirani su pomoću softvera Zen2010, (Zeiss).

4. Rezultati i diskusija

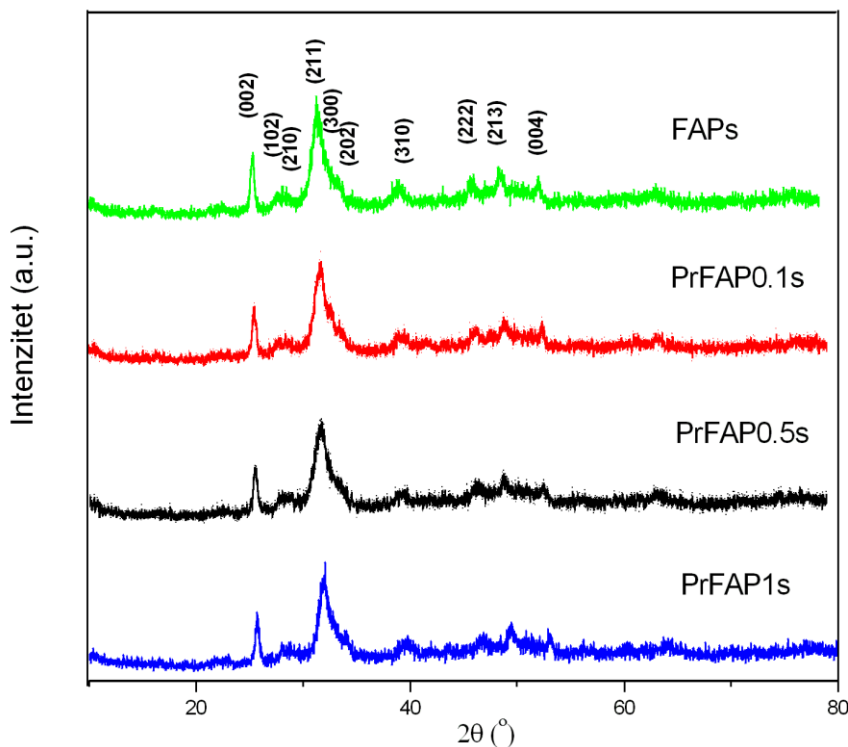
Dobijanje nove vrste nanofosfora sa multikolornim osobinama koji bi se primenjivali kao kontrastni agenti za bio-medicinske aplikacije zahteva multidisciplinarni pristup istraživanju. Fluorapatitni nanomaterijali dopirani sa 0,1, 0,5 i 1 % Pr^{3+} su sintetisani metodom ko-precipitacije pri uslovima obrade na sobnoj temperaturi, a dobijeni slabokristalni materijali su kalcinirani na 700 i 1000 °C kako bi se povećala kristaličnost i intenzitet luminescentnih prelaza. Temperature od 700 °C su dovoljno visoke da se dobiju čestice dobre kristaličnosti, dobre disperzije i očekivane emisije [3, 35, 36]. Termički tretmani na 750 °C i višim temperaturama umesto toga dovode do aglomeracije čestica uz pojavu sekundarnih faza u posmatranom keramičkom sistemu. Nakon sinteze nanofosfora izvršena je fizičko-hemijska karakterizacija kako bi se definisale strukturne, morfološke i luminescentne osobine i kako bi se odabrala temperatura obrade koja daje nanokristale pogodne za bio-medicinske primene. U sledećem koraku je urađena kvantno-hemijska analiza uticaja dopiranja Pr^{3+} jona na fluorapatitni kristalni sistem i uspostavljene su korelacije sa parametrima dobijenim za sintetisane nanokristale s ciljem definisanja mehanizma supstitucije. Na kraju su ispitane biokompatibilnost i hemokompatibilnost aktiviranih nanokristala i analizirana je njihova podobnost kao kontrasta za *in vitro* i *ex vivo* biosnimanja ćelija kancera pomoću luminescentne konfokalne mikroskopije i mikroskopije širokog polja.

4.1. Fizičko-hemijska karakterizacija dobijenih nanofosfora

4.1.1. Sintetisani uzorci sušeni na 110 °C

Sintetisane nanostrukture podvrgnute su XRD analizi u cilju definisanja strukture, sastava i fazne čistoće. XRD difraktogrami FAPs i Pr^{3+} dopiranih FAPs uzoraka prikazani su na slici 4.1.1.

Intenziteti i položaji svih difrakcionih pikova su u skladu sa odgovarajućim standardnim difraktogramom čiste heksagonalne faze FAP [ICSD br. 56314] (prostorne grupe $P6_3/m$) [99]. Nisu detektovane dodatne kristalne faze i nečistoće, što ukazuje na to da su Pr^{3+} joni uspešno supstituisani u kristalnu rešetku FAP-a. Široki pikovi i mali intenziteti ukazuju na malu veličinu kristalita i nizak stepen kristalichnosti.



Slika 4.1.1. Strukturna analiza nanokristala FAPs i PrFAPs na osnovu rendgenske difrakcije praha.

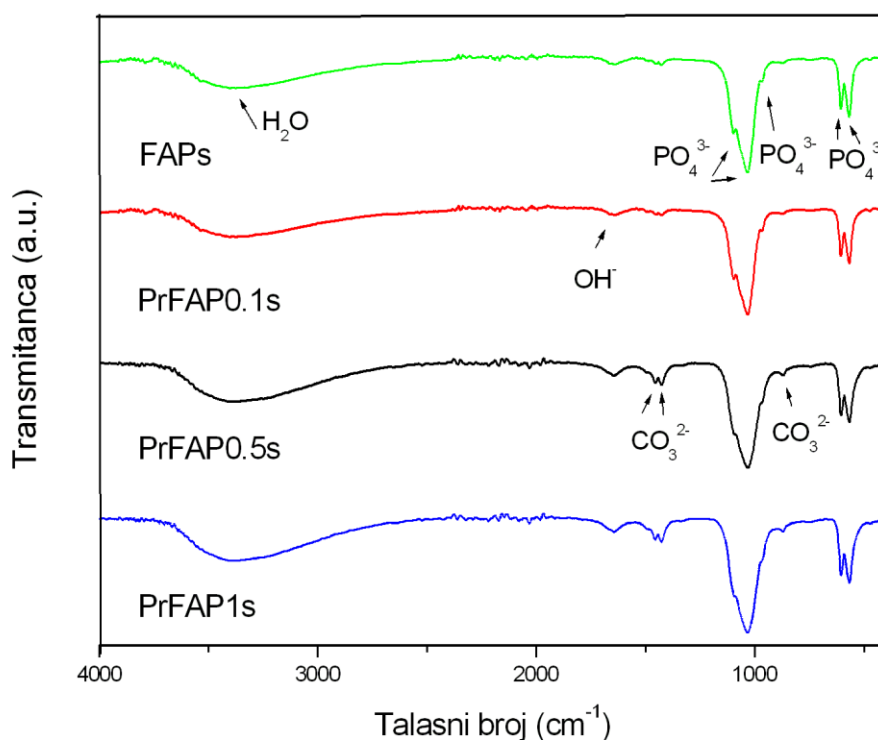
Kako bi se ispitaio uticaj dopiranja Pr^{3+} na FAP kristalit, određeni su parametri rešetke, upoređeni i prikazani u tabeli 4.1.1. Parametri rešetke a i c i zapremina jedinične ćelije smanjuju se za sve uzorke kada se koncentracija dopanta povećava, osim za uzorak PrFAP0.1s. Ova skupljanja su mala i rezultat su zamene većih jona Ca^{2+} ($1,13 \text{ \AA}$) manjim jonima Pr^{3+} ($1,12 \text{ \AA}$), zbog razlike u radijusu između jona [100]. Takođe, veličina kristalita se smanjuje s povećanjem koncentracije dopant jona za sve uzorke. Veličine kristalita izračunate po *Scherrer*-ovoj formuli su $d(\text{FAPa})=20 \text{ nm}$, $d(\text{PrFAP0,1a})=21 \text{ nm}$, $d(\text{PrFAP0,5a})=19 \text{ nm}$ i $d(\text{PrFAP1a})=15 \text{ nm}$. Ovo smanjenje veličine kristalita apatita sa povećanjem koncentracije dopant jona je u saglasnosti sa literarnim podacima o supstituciji manjih jona retkih zemalja u FAP rešetki [29, 101]. Kako su joni retkih zemalja slični jonima Ca^{2+} po radijusu, u prirodnim apatitima supstituišu njihove obe pozicije u rešetki (Ca1 i Ca2) [59]. Takođe je postojala mogućnost da joni Pr^{3+} ne supstituišu isključivo položaje Ca^{2+} , već se dopant joni pojavljuju u posebnim položajima u kristalnoj strukturi koji modifikuju kristalno

okruženje [54]. To bi mogao biti razlog malog povećanja parametara u uzorku PrFAP0.1s. Odnos parametara rešetke c/a za sve uzorke iznosi 0,73. Ovaj konstantan odnos parametara potvrđuje da heksagonalna apatitna struktura nije narušena dopiranjem Pr^{3+} jona. Male varijacije u parametrima kristalne rešetke ukazuju da postoje izvesne deformacije u kristalnoj strukturi.

Tabela 4.1.1. Parametri jediničnih ćelija i veličina kristalita FAPs i PrFAPs uzoraka.

Uzorak	Parametri jediničnih ćelija			Veličina kristalita
	a (Å)	c (Å)	V (Å ³)	d (nm)
FAPs	9.328 (4)	6.837 (4)	515.213	20
PrFAP0.1s	9.339 (4)	6.825 (4)	515.602	21
PrFAP0.5s	9.317 (4)	6.825 (4)	513.072	19
PrFAP1s	9.305 (4)	6.813 (4)	510.905	15

Spektri infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR) FAPs i Pr^{3+} dopiranih FAPs uzoraka prikazani su na slici 4.1.2. FTIR spektri svakog uzorka sadrže karakteristične trake apatitnih jedinjenja. Trake koje se pojavljuju na 565–603 cm^{-1} pripadaju (ν_4) simetričnim vibracijama istezanja PO_4^{3-} grupa, dok trake na 1032–1095 cm^{-1} potiču od asimetričnih vibracija istezanja (ν_3). Kada se koncentracija dopanta povećava u uzorcima se pojavljuje pikovi malog inteziteta na oko 866, 1427 i 1456 cm^{-1} (za ν_3 vibracije) što se pripisuje CO_3^{2-} jonima [102, 103]. Trake na 866, 1427 i 1456 cm^{-1} ukazuju na supstituciju PO_4^{3-} grupa i F^- jona sa CO_3^{2-} , poznatu kao karbonatni-fluorapatit AB-tipa [104, 45]. Kada se sinteza fluorapatita vrši iz vodenog rastvora u baznim uslovima u otvorenom sistemu, favorizuje se ugradnja CO_2 iz atmosfere [59]. Ovi joni se pojavljuju zbog potrebe sistema za kompenzacijom naelektrisanja, zato što su dvovalentni katjoni kalcijuma zamenjeni trovalentnim jonima prazeodimijuma. Neka istraživanja, trake na 867, 1420 i 1450 cm^{-1} ne pripisuju karbonatnom apatitu, jer mogu poticati iz karbonata adsorbovanog na površini kristala apatita ili od odvojene karbonatne faze sa apatitnim kristalima [105]. Ovi negativno naelektrisani joni adsorbovani na površini apatita mogu se ukloniti ako se rezultirajući talog ispere etanolom [32]. Mali pik od oko 1650 cm^{-1} pripada vibracijama OH^- grupa. Kod sinteze FAP iz vodenog rastvora uvek će se mala količina F^- jona zameniti OH^- jonima [45]. Široki apsorpcioni opseg na 2500–3700 cm^{-1} povezan je sa adsorbovanom vodom još uvek prisutnom u osušenim uzorcima.



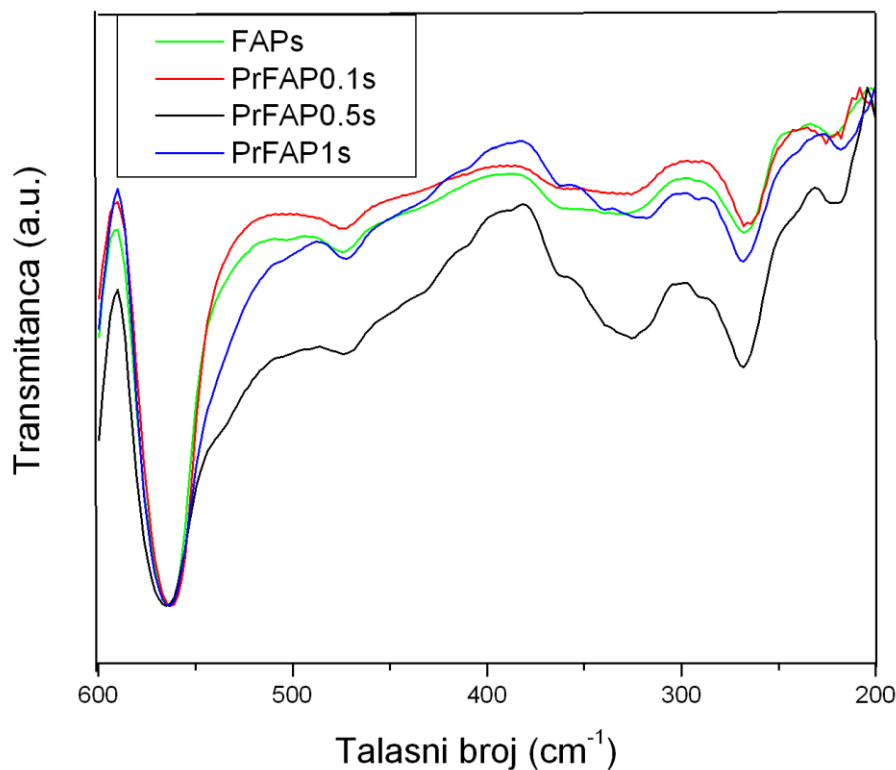
Slika 4.1.2. Frekvencije vibracionih traka na FTIR spektrima FAPs i PrFAPs uzoraka.

Tabela 4.1.2. Dodeljivanje FTIR vibracionih traka za FAPs i PrFAPs uzorke.

Uzorak	Vibracione trake (cm ⁻¹)							
	PO ₄ ³⁻ (ν ₄)		CO ₃ ²⁻	PO ₄ ³⁻ (ν ₁)	PO ₄ ³⁻ (ν ₃)		CO ₃ ²⁻	OH ⁻
FAPs	565.4	603.8		966.4	1032.1	1095.7	1427.3	1643.7
PrFAP0.1s	566.0	604.4		966.8	1032.1	1095.8	1427.4	1637.0
PrFAP0.5s	565.6	603.9	866.6	966.3	1031.8	1094.4	1428.6	1636.2
PrFAP1s	565.2	603.5	864.0	964.3	1031.3	1094.1	1427.1	1455.1 1646.2

FAR transmisioni infracrveni spektri u opsegu od 200 do 600 cm⁻¹, prikazani na slici 4.1.3., odgovaraju vibraciji savijanja P-O veza fosfatne grupe zajedno sa vibracijama kontakata između metala i kiseonika M-O i O-M-O [106]. Ove FAR-infracrvene frekvencije prvenstveno zavise od M-O veza i menjaće se kako se katjoni u strukturi menjaju. Uzorci čistih FAPs i PrFAP0.1s imaju sličnu distribuciju pikova. Naime, postoji naglašen opseg od vibracija P-O veza na 560 cm⁻¹ i na 470 cm⁻¹, kuplovane sa makazastom deformacionom vibracijom u ravni O-M-O (δ_m) na 331cm⁻¹, ljuljajućom deformacionom vibracijom u ravni O-M-O(δ_w) na 267 cm⁻¹ i savijajućom deformacionom vibracijom van ravni M-O(ν_w) na 223 cm⁻¹. U uzorcima PrFAP0.5s i PrFAP1s su prisutne isto ove vibracije, ali pored njih postoje i novi pikovi u opsegu od 400 do 320 cm⁻¹ koji verovatno potiču od vezanih Pr³⁺ jona. Apsorpcioni intenziteti traka rastu sa porastom koncentracije

dopanta, za uzorke PrFAP0.5s i PrFAP1s, jer intenzitet trake zavisi od veličine promene dipolnog momenta.

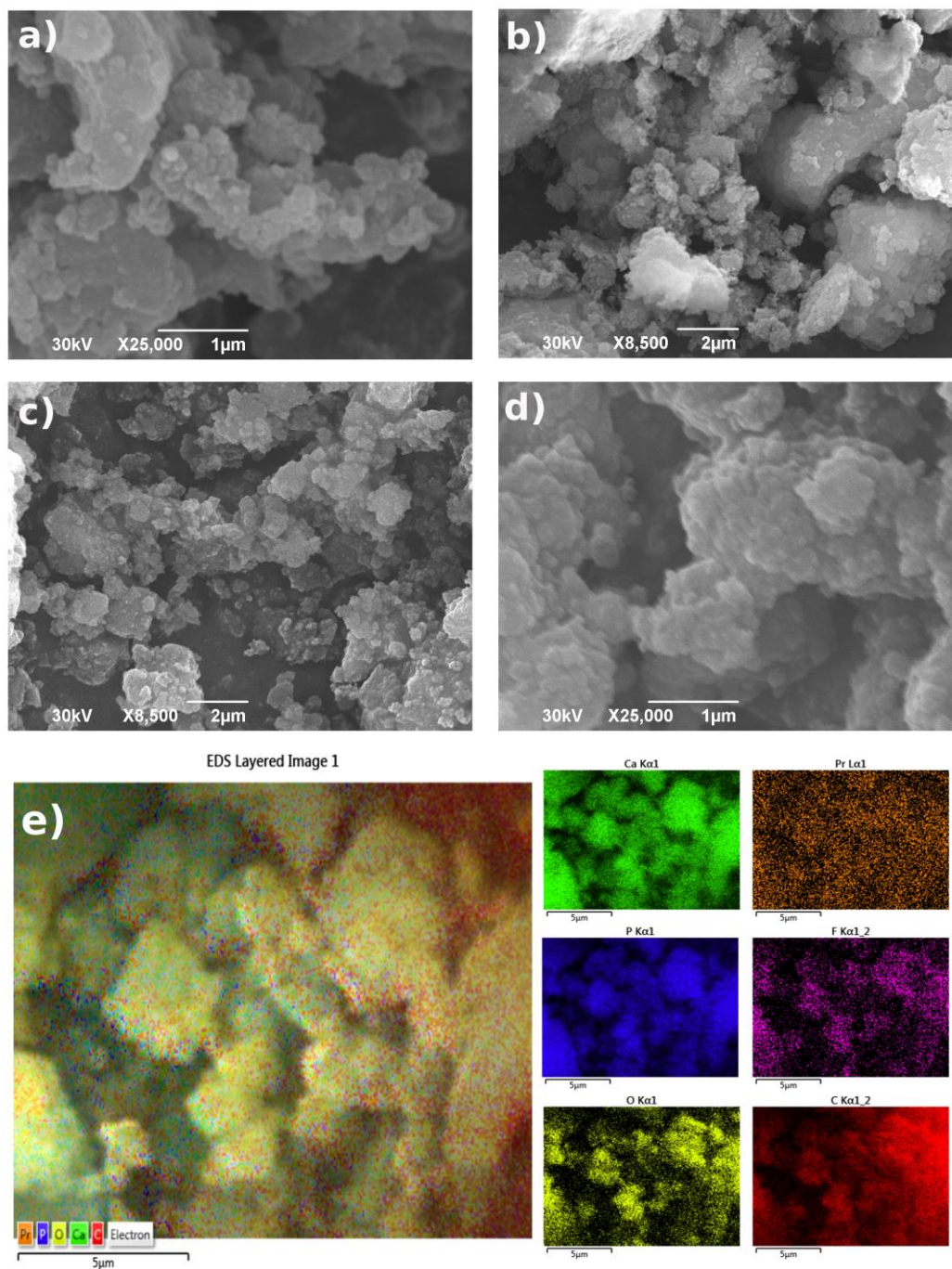


Slika 4.1.3. Frekvencije vibracionih traka na FAR IR spektrima FAPs i PrFAPs uzoraka.

Tabela 4.1.3. Dodeljivanje FAR IR vibracionih traka za FAPs i PrFAPs uzorke.

Uzorak	Vibracione trake (cm^{-1})							
	$\text{PO}_4^{3-} (\nu_4)$	$\text{PO}_4^{3-} (\nu_2)$	Pr-O			O-M-O (δ_m)	O-M-O (δ_w)	M-O (ν_w)
FAPs	565.4	477.6				331.4	267.9	223.1
PrFAP0.1s	562.8	474.1				326.0	267.7	225.6
PrFAP0.5s	565.1	473.5	400.1	360.6		325.6	268.4	221.6
PrFAP1s	563.8	673.1	400	360	340.2	318.5	268.5	218.1

Morfologija čestica praha ispitana skenirajućom elektronskom mikroskopijom zajedno sa elementnim mapiranjem FAPs i dopiranih PrFAPs uzoraka prikazana je na slici 4.1.4.

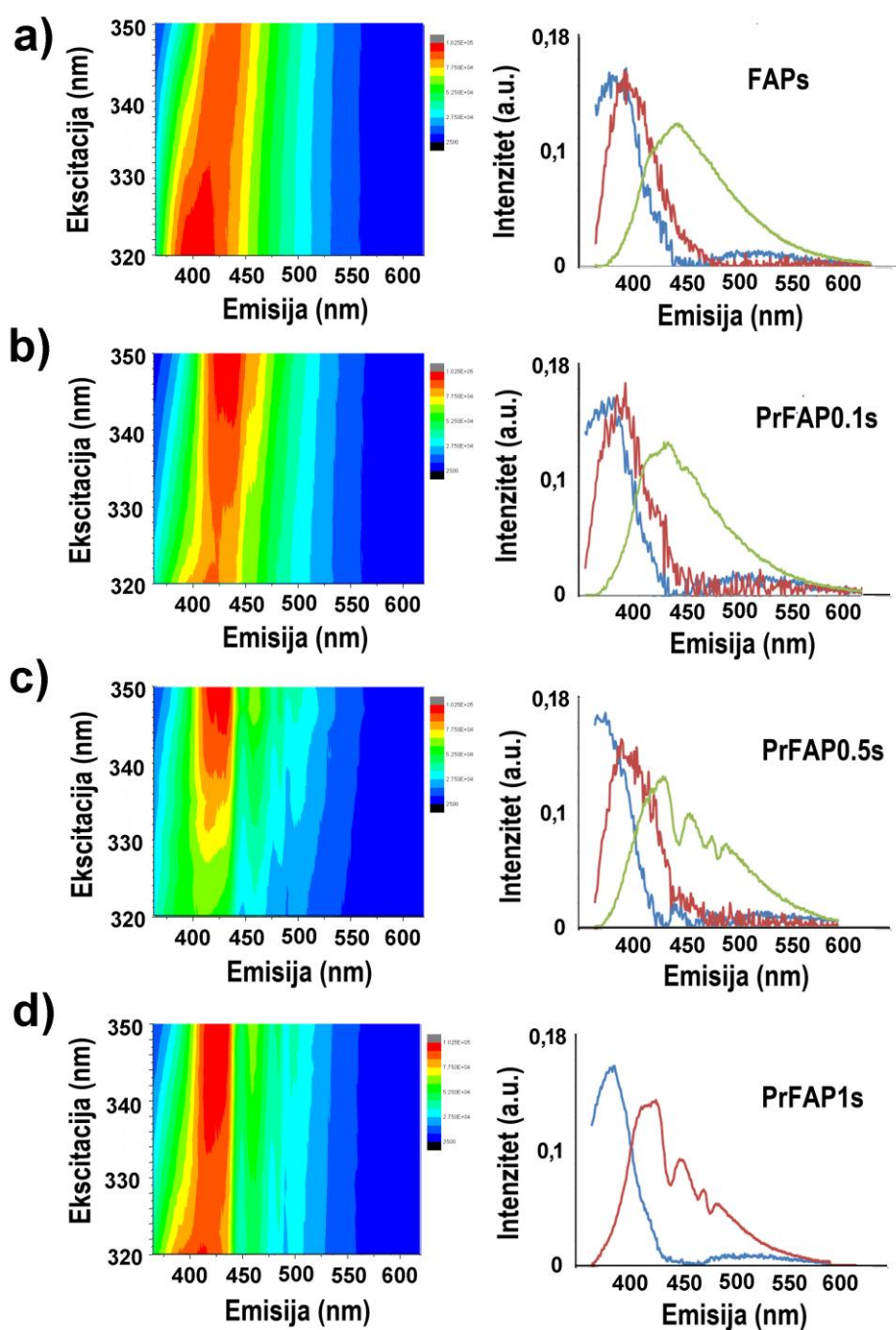


Slika 4.1.4. Morfološka analiza sintetisanih nanoprahova na bazi SEM mikrografa (a) FAPs, (b) Pr FAP0.1s, (c) PrFAP0.5s i (d) PrFAP1s uzorka. (e) EDS elementarna analiza PrFAP1s uzorka.

SEM mikrografi (Slika 4.1.4 a,b,c,d) pokazuju da su FAPs i PrFAPs dopirani uzorci sastavljeni od čestica nano veličine nepravilnog sfernog oblika koje lako formiraju neravnomerno raspoređene aglomerate. Takođe, merenja raspodele veličine čestica metodom difrakcije laserske svetlosti (DLS) nisu dala validne rezultate, zbog nepravilnog sfernog oblika čestica koji dovodi do

rasejanja svetlost [107, 108]. EDS mapiranje uzorka PrFAP1s sa prostornom raspodelom elemenata u uzorku s najvećom koncentracijom Pr^{3+} prikazano je na Slici 4.1.4.e. Može se videti da su joni Pr^{3+} raspoređeni relativno uniformno po uzorku, verovatno umesto Ca^{2+} jona.

Ekscitaciono-emisione mape uzoraka FAPs i PrFAPs zajedno sa komponentama fluorescentnih spektara prikazane su na slici 4.1.5. Svi uzorci imaju široki opseg ekscitacija u UV oblasti sa maksimumom na oko 350 nm. Ova apsorpcija UV svetlosti je verovatno rezultat prenosa naelektrisanja u kristalnoj rešetki sa najelektronegativnijeg atoma F– Ca^{2+} (CT) [27]. Uobičajeni luminescentini $f-f$ prelazni Pr^{3+} jona nisu vidljivi u području veće talasne dužine zbog njihovog značajno nižeg intenziteta emisije u poređenju sa intenzitetom emisije FAP domaćina. Čisti FAPs uzorak je pokazao jak široki opseg emisije domaćina u rasponu 390-500 nm sa maksimumom emisije u ljubičastom području vidljivog dela spektra na oko 420 nm. Nakon što je Pr^{3+} substituisan u rešetku domaćina, uzorci su još uvek pokazivali intenzivan široki opseg emisije domaćina, ali sa pojavom re-apsorpcionih prelaza Pr^{3+} jona u plavo-zelenom regionu. Ovi pikovi re-apsorpcije emisije između 440 i 500 nm dodeljeni su tipičnim ekscitacionim prelazima Pr^{3+} unutar konfiguracije $4f^2-4f^2$ (što se može i videti na ekscitacionom spektru na slici 4.3.4. a) [26, 109]. Dodatni minimumi u spektru emisije na 448, 473 i 487 nm odgovaraju ekscitacionim prelazima $^3\text{P}_2-^3\text{H}_4$, $^3\text{P}_1-^3\text{H}_4$, $^1\text{I}_6$ i $^3\text{P}_0-^3\text{H}_4$ [26, 109]. Može se primetiti da nedostaje maksimum emisije na oko 595 nm povezan sa transferom $^3\text{H}_4$ na $^1\text{D}_2$ nivo koji je karakterističan za FAP mikrokrystal dopiran Pr^{3+} [26, 109]. To je posledica prisustva anojonskih vrsta koje zadržavaju (eng. quenching) luminescenciju i visoke efikasnosti prenosa energije između nano-FAP matrice domaćina i dopant jona. Zadržavanje luminescencije sa $^3\text{P}_0$ nivoa u karbonatnom-fluoropatitu ranije istraživanje opisuje kao posledicu transfera ekscitacione energije na vibracije rešetke [110]. Za retke zemlje značajno zadržavanje se dešava kada je razlika u energijama između elektronskih nivoa aproksimativno jednaka energiji četiri fonona [110, 111]. Energetska razlika između $^3\text{P}_0$ i nižeg $^1\text{D}_2$ nivoa je aproksimativno 3580 cm^{-1} , što je partikularno ekvivalentno četiri fonona ν_2 vibracije karbonatnih grupa ($870-880\text{ cm}^{-1}$) [110, 111]. Ovo je u saglasnosti sa karbonatnim grupama koje je pokazao FTIR spektar (Slika 4.1.2).



Slika 4.1.5. Ekscitaciono-emisione mape (levo) i dominantne komponente fluorescentnih spektara K1, K2 i K3 identifikovane MCR-ALS analizom (desno). (a) FAPs, (b) PrFAP0.1s (c) PrFAP0.5s i (d) PrFAP1s uzorak.

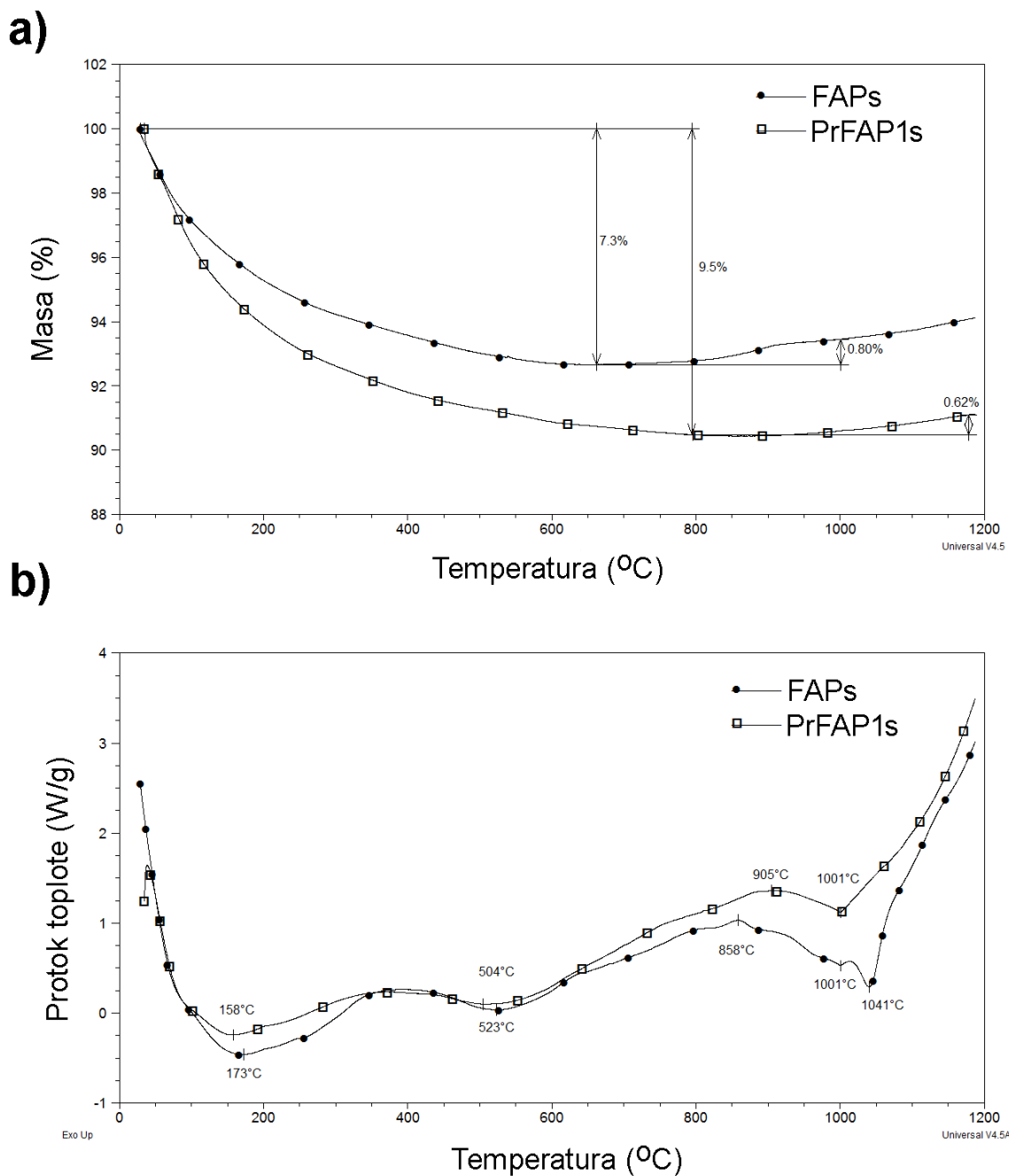
Table 4.1.4. Vrednosti maksimuma komponenta MCR-ALS analize.

Uzorak	Maksimumi komponenta		
	K1	K2	K3
FAPs	377	388	435
PrFAP0.1s	384	397	434
PrFAP0.5s	372	396	430
PrFAP1s	384	-	423

Za dekompoziciju dobijenih spektara korišćena je metoda multivarijacione rezolucija krivih – naizmeničnih najmanjih kvadrata (MCR–ALS), koja je prikazana na desnoj strani slike 4.1.5. Ova metoda se koristi za ekstrakciju broja komponenti fluorescencije koje uzorak emituje. Trokomponentna analiza bila je adekvatna za sve uzorke, osim za uzorak PrFAP1s. Dobijene vrednosti za maksimume komponenata fluorescencije navedene su u Tabeli 4.1.4. MCR-ALS analiza pokazuje da je položaj prve komponente K1 (plave linije na desnom grafiku na slici 4.1.5.) nešto niži za uzorke FAPs i PrFAP0.5s, ali dolazi i do crvenog pomeraja od FAPs do PrFAP1s. Komponenta K2 (crvene linije na desnom grafiku na slici 4.1.5.) takođe pokazuje crveni pomeraj koji ide od FAPs do uzorka PrFAP0.1s i PrFAP1s, dok uzorak PrFAP0.5s malo odstupa od ovog trenda. Komponenta K3 (zelene linije na desnom grafiku na slici 4.1.5.) pokazuje plavi pomeraj koji ide od uzorka FAPs do PrFAP0.1s i PrFAP0.5s. Za PrFAP1s uzorak komponenta K3 se stapa sa komponentom K2 i gasi, kao posledica stvaranja vakansi u strukturi usled supstitucije Ca^{2+} sa Pr^{3+} jonima. Takođe, stvaranje vakansi je uočeno pri supstituciji Ca^{2+} sa Eu^{3+} za apatit dobijen u uslovima obrade na niskim temperaturama [32]. Analiza emisionih spektara zajedno sa rezultatima XRD i FTIR analize dovodi do zaključka da u sistemu postoji zamena Ca^{2+} sa Pr^{3+} jonima koja je praćena kompenzacijom naelektrisanja u vidu ugradnje anjonskih vrsta HO^- i CO_3^{2-} koje zadržavaju luminescenciju dopanta.

Termička obrada nanoapatita na visokim temperaturama je obično neophodna kako bi se dobile nanočestice visokog stepena kristaličnosti i odgovarajuće veličine pogodne za pripremu biomaterijala, nanofosfora, katalizatora i adsorbenata [112]. Na Slici 4.1.6. ilustrovana je termička analiza uzoraka FAPs i PrFAP1s. Prvo su analizirani termogrami uzoraka (slika 4.1.6. (a)) kako bi se dobile informacije o procentu gubitka mase na različitim temperaturama i izveo zaključak o termičkoj stabilnosti nanoprahova. TGA krive pokazuju dva različita stepena promene mase u funkciji temperature. U prvom stepenu uniformnim zagrevanjem uzoraka od sobne temperature do 800 °C dolazi do kontinualnog gubitka mase od 7,3 % za FAPs, i od 9,5 % za PrFAP1s. Ovaj gubitak mase može se povezati sa gubitkom adsorbovane i hemijski vezane vode iz uzoraka. Po karakterističnim TGA krivama za FAP, do 600 °C pored vode odlaze i adsorbovani i okludovani molekuli karbonata u dva stepena, a na većim temperaturama u trećem stepenu dolazi do njihove dekompozicije i daljeg smanjenja mase [45, 112, 113]. Ovo navodi na zaključak da su se karbonati u našem slučaju ugradili u strukturu, usled kompenzacije naelektrisanja, što su i potvrdile trake na FTIR spektrima. Iznad temperature od 800 °C sve do 1000 °C u drugom stepenu dolazi do povećanja mase uzoraka usled dehidroksilacije apatita i to za FAPs 0,80 % [112, 113]. Uzorak PrFAP1s u opsegu temperatura 800-1000 °C ne pokazuje promenu mase, već se povećanje mase dešava u intervalu od 1000-1200 °C i to od 0,62%. Ovo navodi na zaključak da dopiranje Pr^{3+}

stabilizuje strukturu FAPa, što su i pokazala ranija istraživanja termičke analize fluorapatita dopiranih retkim zemljama koje stvaraju vakanse u strukturi [114].



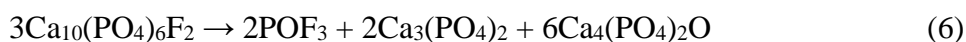
Slika 4.1.6. Termička analiza sintetisanih uzoraka. TG krive FAPs i PrFAP1s uzorka (a). DSC krive FAPs i PrFAP1s uzorka (b).

DSC krive (Slika 4.1.6. (b)) i endotermni pikovi na njima potvrđuju odlazak vode iz uzoraka. Adsorbovana voda koja nije otišla sa sušenjem uzorka na 110 °C odlazi do 173 °C za FAP i do 158 °C za PrFAP1. Hemijski vezana voda odlazi na 523 °C za FAP i 504 °C za PrFAP1. Temperatura dekarbonacije FAP-a se smanjuje sa povećanjem sadržaja karbonata [45]. Prirodni

karbonatni-fluorapatiti počinju sa otpuštanjem CO₂ na nekih 800 °C za uzorke sa niskim sadržajem karbonata, dok za FAP sa visokim sadržajem karbonata odlazak počinje na nižim temperaturama od oko 520 °C [45]. Vrlo mala egzotermna reakcija na 858 °C kod uzorka FAPs i na 985 °C za PrFAP1s eventualno se može pripisati promeni kristalne strukture, no kriva bi trebala biti mnogo oštrija za takvu promenu. Ova egzotermna reakcija može biti u vezi sa degradacijom OH⁻ grupa u strukturi. U ovom temperaturnom opsegu započela je dehidroksilacija A mesta apatita sa odlaskom vode i nastankom oksifluorapatita. Tokom dehidroksilacije dolazi do spajanja dva OH⁻ jona, nastaje voda koja isparava i ostaju O²⁻ joni i vakansa od vodonika u strukturi (reakcija (5)). Takođe, odlaskom CO₂ ostaju O²⁻ joni u strukturi [112, 113]. Kako bi se očuvala neutralnost PrFAP strukture usled zamene katjona i kompenzacije naelektrisanja, nastaje oksifluorapatit.



Takođe, na 1001 °C kod oba uzorka se javlja izražen endotermni pik, koji u ovom slučaju može biti u vezi sa degradacijom oksifluorapatitne faze u fluorapatitnoj strukturi i povećanjem mase usled nastanka produkata. Posebno kod uzorka FAPs postoji još jedan izražen endotermni pik na 1042 °C, koji dodatno potvrđuje degradaciju ove oksifluorapatitne faze u strukturi. Ovaj pik na 1042 °C se ne pojavljuje za dopirani uzorak PrFAP1, što ide u prilog povećanju stabilnosti FAP strukture dopiranjem Pr³⁺ jona u odnosu na čist FAP. Prema literaturnim podacima stabilnost oksifluorapatitne strukture (OAP) se može očekivati u oblasti 800–1050 °C [112]. Postoje dva moguća pravca dekompozicije OAP na oko 1050 °C, po kojima može nastati smeša tetrakalcijumfosfata (TTCP) i trikalcijumfosfata (TCP), ili može nastati smeša TCP i CaO [112]. Nakon ove temperaturne oblasti po literaturnim podacima može doći do dekompozicije FAP-a na temperaturama od 1170 do 1200 °C po reakciji (6).



Iz ovih merenja može se izvesti zaključak da dodatkom Pr³⁺ jona FAP postaje termički stabilnija struktura, što se vidi na višim temperaturama. Razlog za ovu veću termičku stabilnost leži u specifičnim magnetnim osobinama koje imaju atomi lantanoida zbog postojanja *f* orbitala i slobodnih elektrona u njima, a čijim unosom u apatitnu matricu se stvaraju jače privlačne sile putem formiranja oksifluorapatita [114].

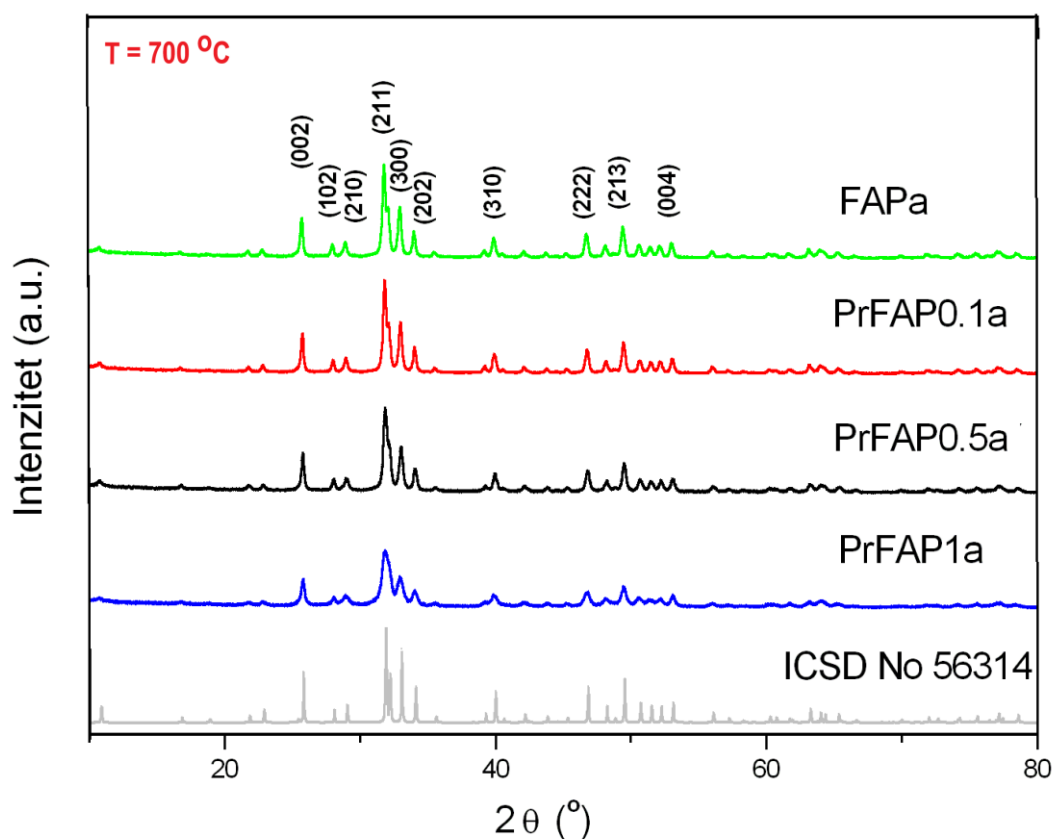
Na osnovu rezultata TGA-DSC analize sintetisani uzorci su kalcinirani na 700 i 1000 °C kako bi se uklonile nečistoće, i povećali kristaličnost i intenzitet luminescentnih prelaza.

Kalcinacijom na 700 °C se uklanjaju voda i karbonati iz materijala, postižu se dobra disperzija i kristaličnost čestica sa željenom emisijom. Kalcinacija sintetisanih nanokristala na 1000 °C izvršena je kako bi se utvrdilo da li je kristalna struktura sintetisanog FAP-a očuvana nakon tretmana na visokim temperaturama, da li je pretrpela fazne transformacije i koji su uticaji na luminescentne osobine nanokristala.

4.1.2. Termički tretirani uzorci na 700 °C i 1000 °C

Tokom procesa kalcinacije sintetisanih uzoraka dolazi do fizičkih i hemijskih promena, što utiče na strukturne osobine dobijenih kristala. Kako bi se odredio uticaj temperatura kalcinacije od 700 °C i 1000 °C na veličinu i oblik kristala, stepena kristaličnosti i luminescentne osobine, izvršena je fizičko-hemijska karakterizacija termički tretiranih uzoraka.

Rezultati karakterizacije aktiviranih uzoraka na 700 °C su većim delom objavljeni u radu [115]. Rendgenske difrakcije aktiviranih nanoprahova na 700 °C upoređene su sa standardnom FAP referencom [ICSD br. 56314] i prikazane na slici 4.1.7. Svi difrakcioni maksimumi potiču od sintetičkog fluorapatita, što ukazuje na formirane jednofazne kristale visoke kristaličnosti kod svih uzoraka aktiviranih na 700 °C. Oštri karakteristični pikovi heksagonalne FAP strukture pripadaju prostornoj $P6_3/m$ grupi porodice apatita. Ova heksagonalna kristalna struktura apatita ima dobru stabilnost i podržava stabilne fluorescentne prelaze ugrađenih jona retke zemlje [1-3]. Položaj difrakcionih pikova u regionu od 31° do 35° pomera se ka većim vrednostima ugla za Pr^{3+} dopirane uzorke. Štaviše, promene parametara kristalne rešetke su potvrđene i izražene kao smanjivanje zapremine jedinične ćelije za uzorke PrFAP0.1a (523,6 (2) Å³) i PrFAP0.5a (523,446 (3) Å³) i malo širenje za PrFAP1a (525.185 (3) Å³) u poređenju sa čistim FAP-om (524.779 (3) Å³) (prikazano u Tabeli 4.1.5.). Vrednosti prosečne veličine kristalita za aktivirane uzorke izračunate po Scherrer-ovoj formuli zaokružene su na: $d(\text{FAPa}) = 32$ nm, $d(\text{PrFAP0.1a}) = 27$ nm, $d(\text{PrFAP0.5a}) = 20$ nm i $d(\text{PrFAP1a}) = 12$ nm. Smanjenje veličine kristalita sa porastom koncentracije dopanta je u skladu sa manjim radijusom Pr^{3+} jona (1,13 Å) u poređenju sa jonima Ca^{2+} (1,14 Å), koji su supstituisani u kristalnoj rešetki FAP-a [100]. Što se tiče opadanja intenziteta refleksija i vrednosti prosečne veličine kristalita sa povećanjem koncentracije Pr^{3+} , može se pretpostaviti da je kristaličnost nanočestica malo narušena jer supstitucija Pr^{3+} stvara defekte u strukturi. To pokazuje i odnos parametara c/a koji je konstantan za sve uzorke i iznosi 0,73, kao i u slučaju sintetisanih uzoraka.

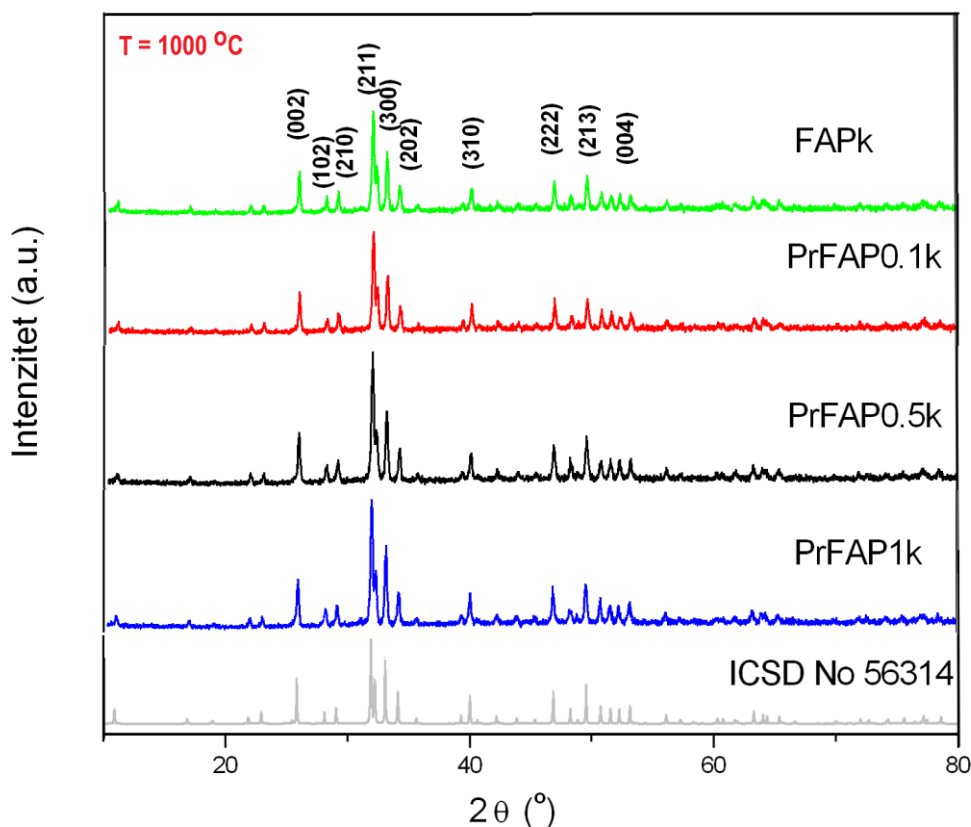


Slika 4.1.7. Strukturna analiza aktiviranih nanokristala FAPa i PrFAPa na 700 °C na osnovu rendgenske difrakcije praha [115].

Table 4.1.5. Parametri jediničnih ćelija i veličina kristalita FAPa i PrFAPa uzoraka nanokristala aktiviranih na 700 °C [115].

Uzorak	Parametri jediničnih ćelija			Veličina kristalita
	a (Å)	c (Å)	V (Å ³)	d (nm)
FAPa	9.3775(3)	6.8910(2)	524.779(3)	32
PrFAP0.1a	9.370(2)	6.886(2)	523.6(2)	27
PrFAP0.5a	9.36902(3)	6.85577(2)	523.446(3)	20
PrFAP1a	9.38533(3)	6.88465(3)	525.185(3)	12

Rendgenski difraktogrami kristalnih nanoprahova FAPk i Pr³⁺ dopiranih PrFAPk uzoraka kalciniranih na 1000 °C prikazani su na slici 4.1.8. Intenziteti i položaji svih difrakcionih pikova su u skladu sa odgovarajućim standardnim difraktogramom čiste heksagonalne faze FAP [ICSD br. 56314] prostorne grupe P₆/m. Nisu uočene dodatne kristalne faze i nečistoće. Porastom temperature difrakcioni maksimumi se sužavaju i postaju oštiri, a intenziteti rastu što ukazuje na uređenje kristalne strukture i povećanje veličine kristalita u odnosu na sintetisane i aktivirane uzorke.



Slika 4.1.8. Strukturna analiza nanokristala FAPk i PrFAPk kalciniranih na 1000 °C na osnovu rendgenske difrakcije praha.

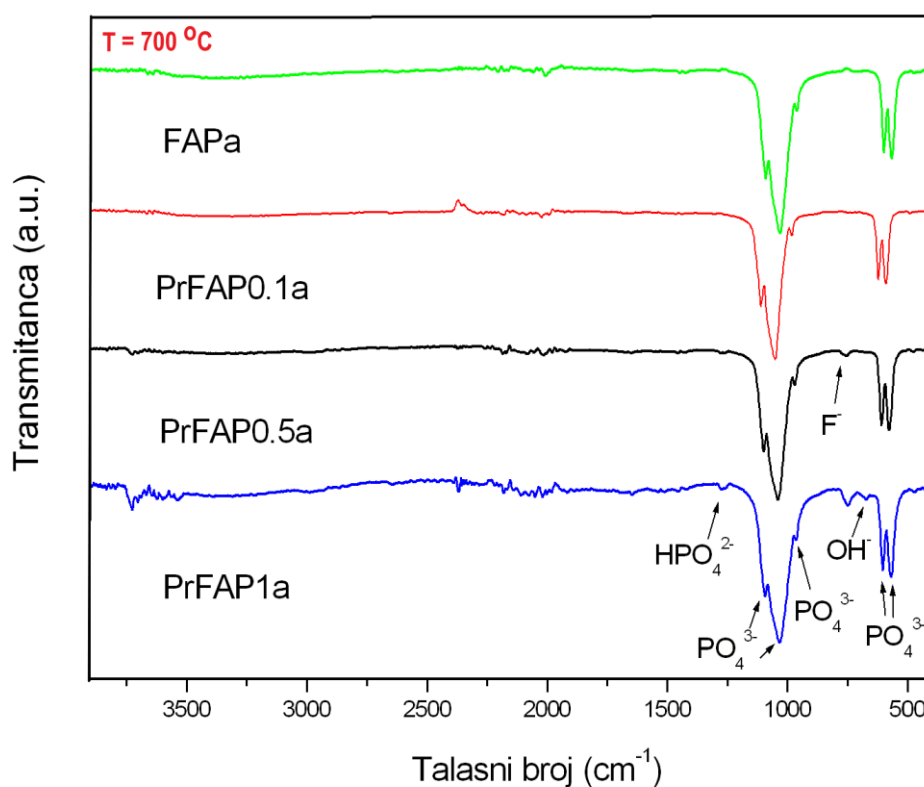
Table 4.1.6. Parametri jediničnih ćelija i veličina kristalita FAPk i PrFAPk uzoraka kalciniranih na 1000 °C.

Uzorak	Parametri jediničnih ćelija			Veličina kristalita
	a (Å)	c (Å)	V (Å ³)	d (nm)
FAPk	9.366 (2)	6.881 (2)	522.81 (3)	109
PrFAP0.1k	9.366 (4)	6.881 (4)	522.82 (3)	93
PrFAP0.5k	9.365 (4)	6.881 (4)	526.837(3)	72
PrFAP1k	9.382 (2)	6.978 (2)	532.06 (2)	58

Parametri rešetke, zapremina jedinične ćelije i veličina kristalita za uzorke FAPk i PrFAPk kalcinirane na 1000 °C prikazani su u Tabeli 4.1.6. Vrednosti za parametre rešetke a i c i zapreminu jedinične ćelije se povećavaju za sve uzorke kako se koncentracija dopanta povećava. Ova povećanja zapremine jedinične ćelije su mala za uzorke FAPk (522.81(3) Å³), PrFAP0.1k (522.82(3) Å³), PrFAP0.5k (526.837(3) Å³) i malo veća za PrFAP1k (532.06(2) Å³), i u skladu su sa širenjima koja su pokazali termogrami na temperaturama od 800 °C za FAP i oko 1000 °C za PrFAP1. Takođe, veličina kristalita se smanjuje s povećanjem koncentracije dopant jona za sve

uzorke, od 105 nm za čist prah FAPk do 93 nm za PrFAP0.1k, 72 nm za PrFAP0.5k i 58 nm za PrFAP1k. Ako se porede sa aktiviranim uzorcima, veličine kristalita su tri puta veće u proseku, a u poređenju sa sintetisanim uzorcima i do pet puta veće. Dejstvo visoke temperature obezbeđuje povoljne uslove da se fini kristali kombinuju jedni sa drugima i formiraju veće kristale. Porast u veličini kristalita u odnosu na aktivirane i sintetisane uzorke može biti posledica re-kristalizacije na visokim temperaturama i rasta novih kristala [116]. Odnos parametara rešetke c/a za uzorke iznosi 0,73, osim za PrFAP1k za koji je 0,74. Ovo malo povećanje može biti u vezi sa stvaranjem faze oksifluorapatita.

Spektri infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR) FAPa i PrFAPa nanoprahova aktiviranih na 700 °C prikazani su na Slici 4.1.9., zajedno sa karakterističnim vibracijama strukture apatita prikazane u Tabeli 4.1.7.



Slika 4.1.9. Frekvencije vibracionih traka na FTIR spektrima FAPa i PrFAPa uzoraka aktiviranih na 700 °C [115].

U FTIR spektrima trake koje se pojavljuju na 1032–1095 cm^{-1} pripadaju asimetričnoj vibraciji istezanja PO_4^{3-} grupa (ν_3), trake na 966 cm^{-1} pripadaju vibraciji PO_4^{3-} grupa (ν_1), dok

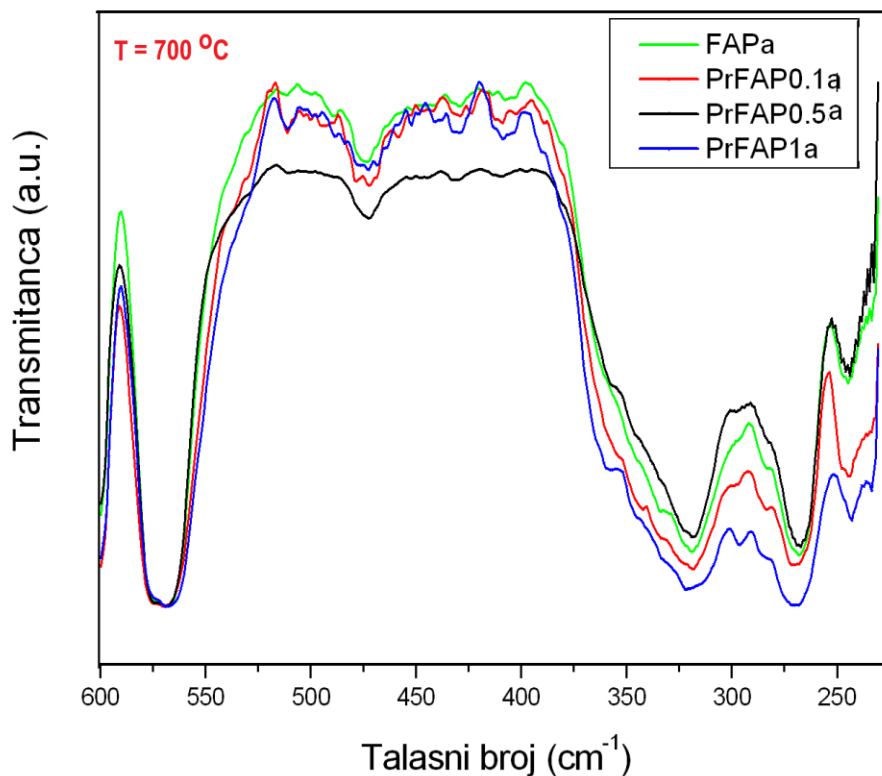
trake na 565–603 cm^{-1} potiču od simetričnih vibracija istežanja PO_4^{3-} grupa (ν_4). Vibracije na 752,1 i 749,0 cm^{-1} karakteristične su za ugrađene F^- jone u apatitnu rešetku, i dokaz da su dizajnirane količine fluorida supstituisane u strukturi apatita [117-119]. Za uzorak PrFAP1a formiranje dodatnih traka na 667,4 i 1265 cm^{-1} karakteristično je za zamene F^- jona OH^- jonima i nastanak fluoro-hidroksiapatita [118, 119]. Takođe je vibraciona traka na 1265 cm^{-1} u nekim izveštajima dodeljena HPO_4^{2-} grupi, koja tokom sinteze lako može da zameni fosfate u strukturi apatita [119]. S obzirom da je tokom sinteze odnos $\text{Ca}+\text{Pr}/\text{P}$ bio fiksiran i iznosio 1,67, kako bi se dobila stehiometrijska fluorapatitna jedinjenja, anjonske vrste neutrališu disbalans naelektrisanja nastao zamenom Ca^{2+} sa Pr^{3+} u FAP rešetki. Uočljivo je odsustvo CO_3^{2-} traka i kako su termogrami pokazali (vidi Sliku 4.1.6.) karbonatne grupe napuštaju strukturu u obliku CO_2 ostavljajući O^{2-} i vakansu u rešetki. Povećavanje sadržaja Pr^{3+} i formiranje O-H trake pomera vibracije PO_4^{3-} grupa na manje vrednosti u slučaju uzorka PrFAP1a (Tabela 4.1.7.).

Tabela 4.1.7. Dodeljivanje FTIR vibracionih traka za FAPa i PrFAPa uzorke aktivirane na 700 °C

[115].

Uzorak	Vibracione trake (cm^{-1})							
	$\text{PO}_4^{3-}(\nu_4)$		$\text{OH}^-(\nu_L)$	$\text{F}^-(\nu)$	$\text{PO}_4^{3-}(\nu_1)$	$\text{PO}_4^{3-}(\nu_3)$	$\text{HPO}_4^{2-}(\text{OH}^-)$	
FAPa	571.2	603.6			966.4	1036.0	1096.0	
PrFAP0.1a	572.3	603.9			966.8	1036.0	1095.7	
PrFAP0.5a	571.6	603.7		752.1	966.3	1036.1	1095.7	
PrFAP1a	568.7	603.3	667.4	749.0	964.3	1033.3	1094.3	1275.0

FAR transmisioni infracrveni spektri u opsegu od 200 do 600 cm^{-1} , prikazani na Slici 4.1.10., odgovaraju vibraciji savijanja P-O veza fosfatne grupe kuplovane sa vibracijama kontakata između metala i kiseonika M-O i O-M-O [106]. Naglašen je opseg vibracija P-O veza na 560 cm^{-1} i na 470 cm^{-1} , kuplovane sa makazastom deformacionom vibracijom u ravni O-M-O (d_m) na 331 cm^{-1} , ljuljajućom deformacionom vibracijom u ravni O-M-O (d_w) na 267 cm^{-1} i savijajućom deformacionom vibracijom van ravni M-O (ν_w) na 223 cm^{-1} . U uzorcima PrFAP0.5a i PrFAPa pored ovih vibracija postoje i mali pikovi od 440 do 360 cm^{-1} koji verovatno potiču od vezanih Pr^{3+} jona (Tabela 4.1.8.). Uočljivo je da najveći apsorpcioni intenziteti u ovom opsegu frekvencija ima spektar PrFAP0.5a uzorka.



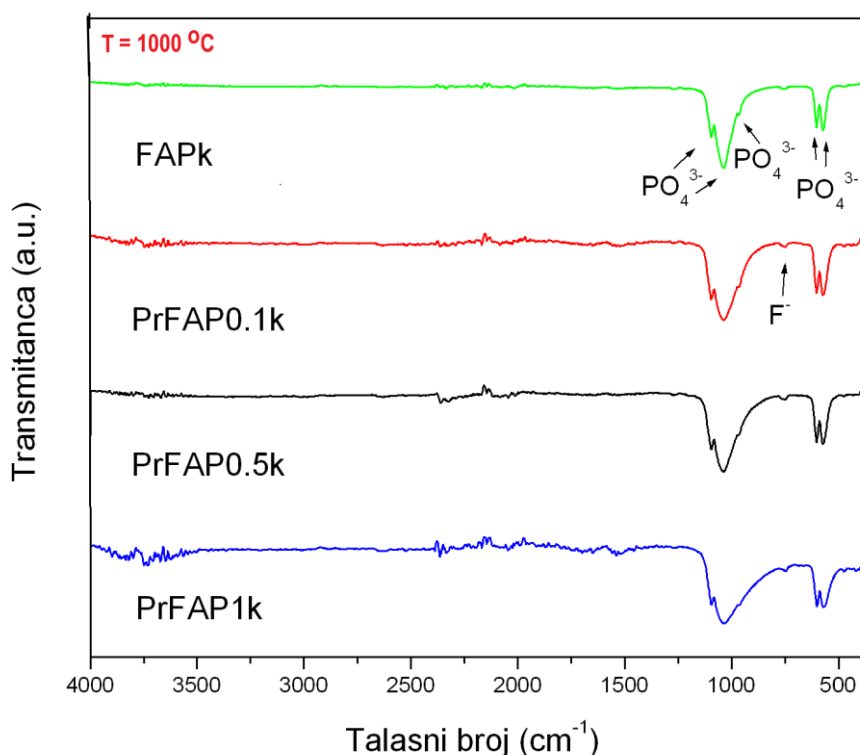
Slika 4.1.10. Frekvencije vibracionih traka na FAR IR spektrima FAPa i PrFAPa uzoraka aktiviranih na 700 °C.

Tabela 4.1.8. Dodeljivanje FAR IR vibracionih traka za FAPa i PrFAPa uzorke aktivirane na 700 °C.

Uzorak	Vibraciona traka (cm ⁻¹)					
	PO ₄ ³⁻ (ν ₄)	PO ₄ ³⁻ (ν ₂)	Pr-O	O-M-O (δ _m)	O-M-O (δ _w)	M-O (ν _w)
FAPa	568.7	473.5		318.9	267.9	244.8
PrFAP0.1a	568.7	472.4	409.2	318.6	271.5	244.4
PrFAP0.5a	568.7	472.6	410.2 409.3	318.6	267.4	244.1
PrFAP1a	565.5	476.5	441.4 429.5 408.8 360.4	308.9	271.9	241.9

Spektri infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR) FAPk i Pr³⁺ dopiranih FAPk uzoraka kalcinirani na 1000 °C prikazani su na slici 4.1.11. FTIR spektri od svakog uzorka sadrže karakteristične trake apatitnih jedinjenja kao i u prethodnim uzorcima. Trake koje se pojavljuju na 565–603 cm⁻¹ pripadaju (ν₄) simetričnoj vibraciji istezanja PO₄³⁻ grupa, dok trake na 1032–1095 cm⁻¹ potiču od asimetrične vibracije istezanja (ν₃). Uočljivo je da nema pikova od CO₃²⁻ i OH⁻ grupa koje su usled dejstva visoke temperature napustile uzorak, što su pokazali i termogrami (vidi Sliku 4.1.6). Zbog toga je došao i do izražaja mali pik na 760 cm⁻¹ koji potiče od ugrađenih F

jona u apatitnu rešetku [106]. Poređenjem absorpcionih traka iz Tabele 4.1.9. se može zaključiti da se vrednosti za sve vibracije pomeraju ka nižim vrednostima frekvencija kako koncentracija Pr^{3+} raste.



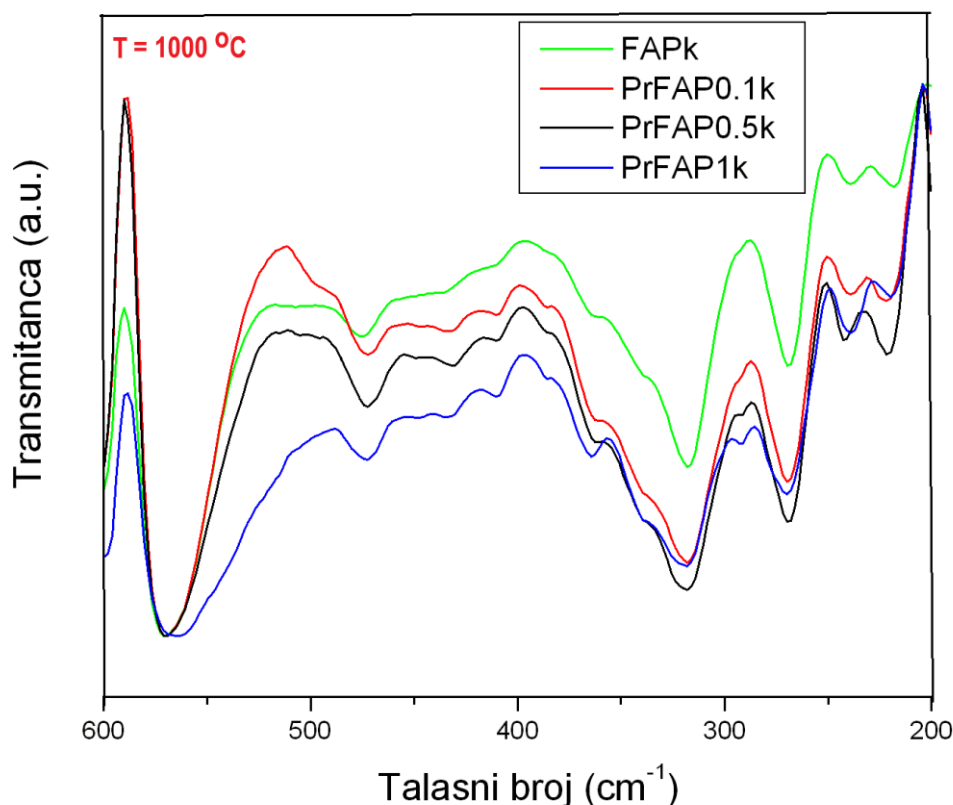
Slika 4.1.11. Frekvencije vibracionih traka na FTIR spektrima FAPk i PrFAPk uzoraka kalciniranih na 1000 °C.

Table 4.1.9. Dodeljivanje FTIR vibracionih traka za FAPk i PrFAPk uzorke kalcinirane na 1000 °C.

Uzorak	Vibracione trake (cm^{-1})				
	PO_4^{3-} (ν_4)		F^- (ν)	PO_4^{3-} (ν_1)	PO_4^{3-} (ν_3)
FAPk	572.0	602.4	760.5	966.4	1037.2 1095.0
PrFAP0.1k	571.5	602.3	760.0	966.8	1035.7 1094.7
PrFAP0.5k	572.0	602.6	750.6	969.6	1036.8 1094.9
PrFAP1k	569.4	600.4	747.2	964.6	1034.3 1094.0

FAR transmisioni infracrveni spektri u opsegu od 200 do 600 cm^{-1} , prikazani na slici 4.1.9., odgovaraju vibraciji savijanja P-O veza fosfatne grupe kuplovane sa vibracijama kontakata između metala i kiseonika M-O i O-M-O kao i kod prethodnih uzoraka [106]. Uzorci FAPk i PrFAP0.1k imaju sličnu distribuciju pikova. Naglašen je opseg vibracija P-O veza na 560 cm^{-1} i na 470 cm^{-1} , kuplovane sa makazastom deformacionom vibracijom u ravni O-M-O (d_m) na 331 cm^{-1} , ljuljajućom deformacionom vibracijom u ravni O-M-O (d_w) na 267 cm^{-1} i savijajućom deformacionom vibracijom van ravni M-O (ν_w) na 223 cm^{-1} . U uzorcima PrFAP0.5k i PrFAP1k pored ovih vibracija

postoje i novi pikovi u oblasti od 430 do 359 cm^{-1} koji verovatno potiču od vezanih Pr^{3+} jona. Apsorpcioni intenziteti traka rastu ravnomerno sa porastom koncentracije dopanta, jer intenzitet trake zavisi od veličine promene dipolnog momenta. Pikovi su mnogo izraženiji po intezitetu kako se povećava koncentracija dopanta nego kod sintetisanih uzoraka, što je posledica veće kristalčnosti uzoraka.

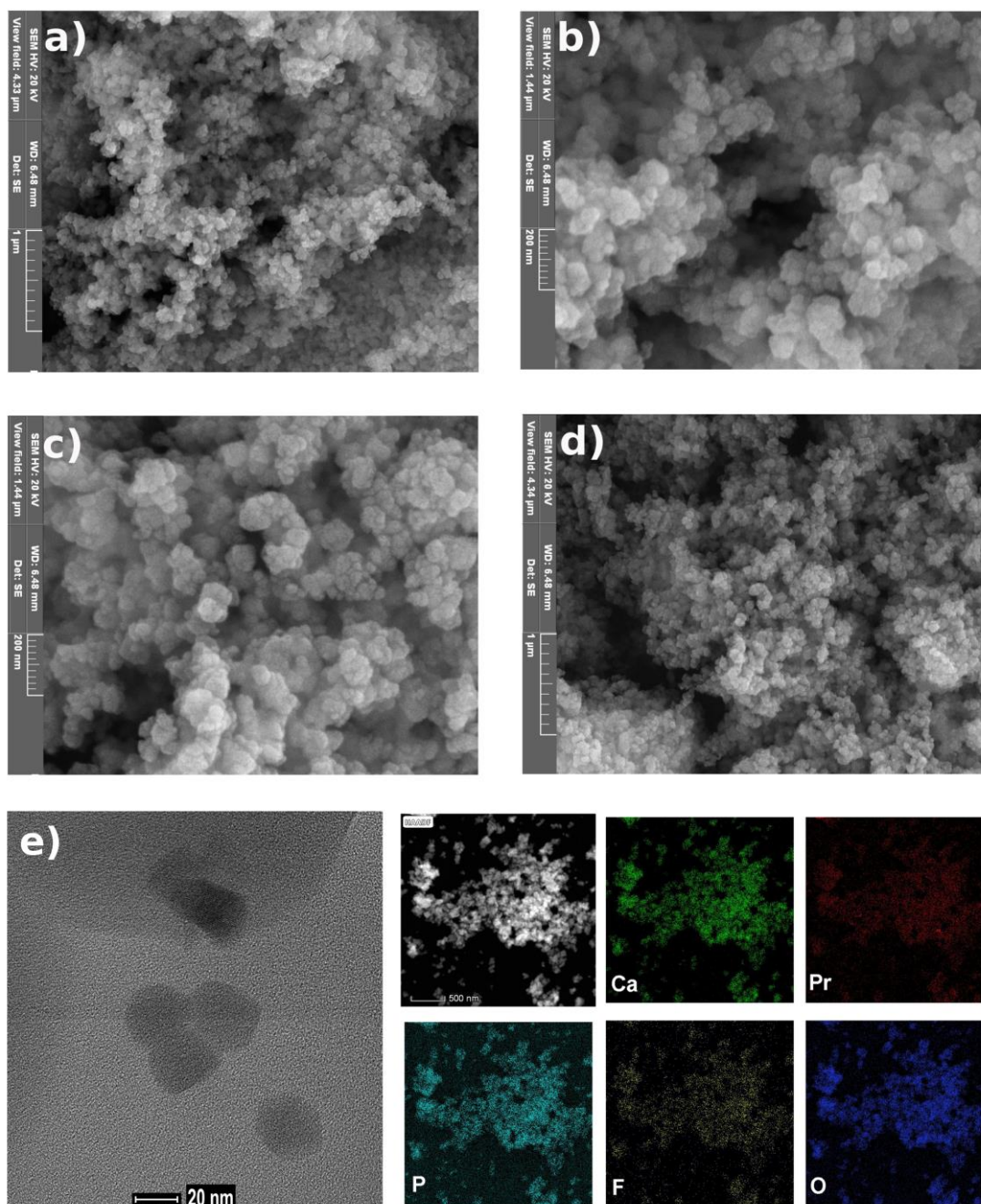


Slika 4.1.12. Frekvencije vibracionih traka na FAR IC spektrima FAPk i PrFAPk uzoraka kalciniranih na 1000 °C.

Table 4.1.10. Dodeljivanje FAR IC vibracionih traka za FAPk i PrFAPk uzorke kalcinirane na 1000 °C.

Uzorak	Vibracione trake (cm^{-1})						
	$\text{PO}_4^{3-}(\nu_4)$	$\text{PO}_4^{3-}(\nu_2)$	Pr-O		O-M-O (δ_m)	O-M-O (δ_w)	M-O (ν_w)
FAPk	570.2	475.4			317.9	269.3	239.2 218.4
PrFAP0.1k	585.3	485.6			320.3	281.6	246.1 228.2
PrFAP0.5k	569.7	472.8	431.2	410.1	359.9	318.6	269.2 242.1 221.2
PrFAP1k	564.1	473.1	428.1	410.0	364.1	318.8	270.1 239.1 219.8

Mikrografi uzoraka FAPa i PrFAPa aktiviranih na 700 °C, dobijeni skenirajućom elektronskom mikroskopijom sa emisijom elektrona polja (FE-SEM) prikazani su na slici 4.1.13.

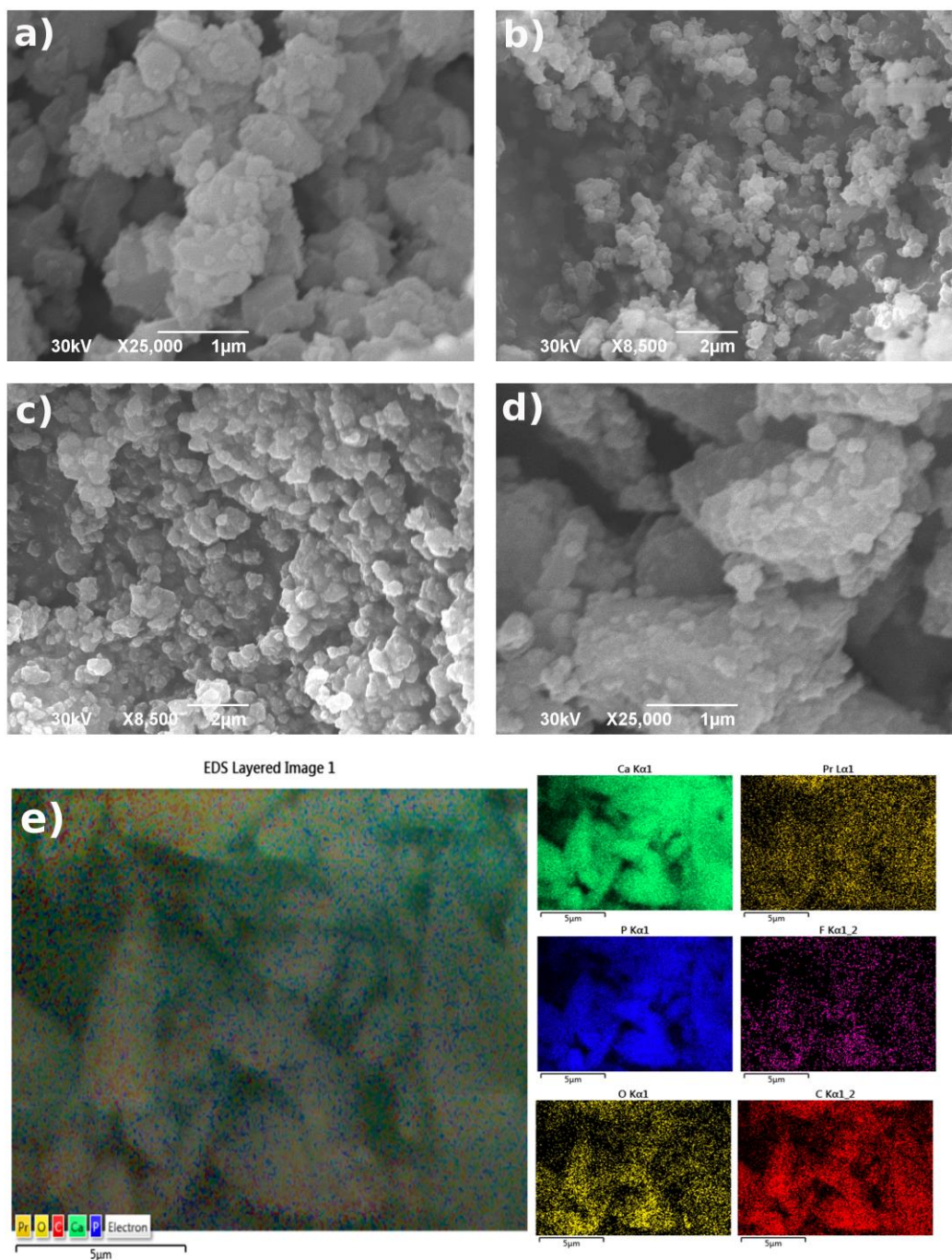


Slika 4.1.13. Morfološka analiza aktiviranih nanokristala na bazi FESEM mikrografa (a) FAPa, (b) Pr FAP0.1a (c) PrFAP0.5a i (d) PrFAP1a uzorka. (e) TEM i EDS elementarna analiza PrFAP0.5a uzorka [115].

Aktivirane čestice na 700 °C su relativno ujednačene, sferične i visoko aglomerisane. Sklonost čestica aglomeraciji najverovatnije je rezultat njihovih nanometarskih dimenzija. Morfologija i veličina čestica PrFAP0.5a nanokristala analizirani su transmisionom elektronskom mikroskopijom (TEM) i prikazani su na slici 4.1.13 e. Slika pokazuje čestice sfernog oblika od oko 20 nm, što je u saglasnosti sa veličinom kristalita koja je dobijena XRD analizom. Takođe, DLS

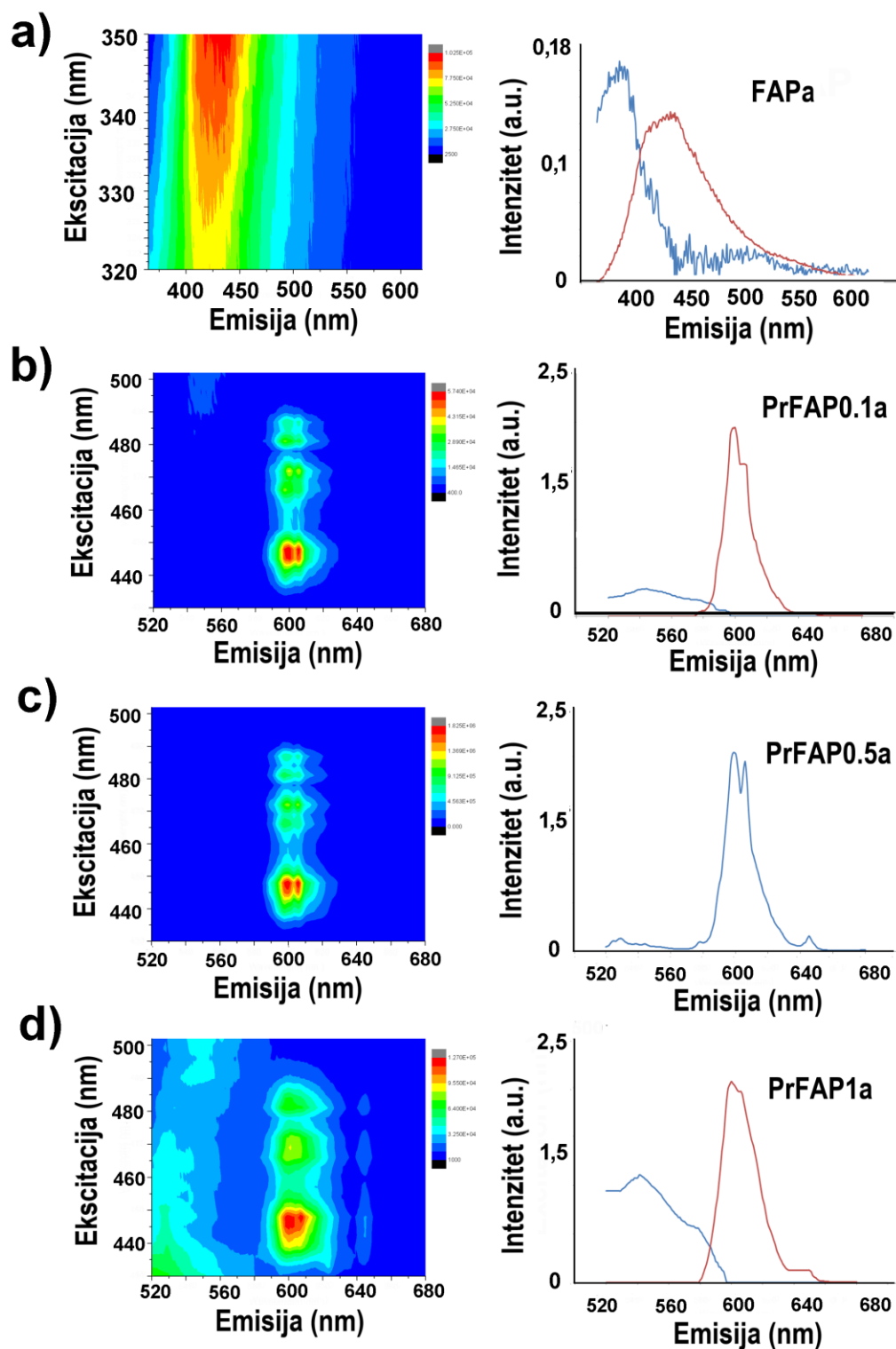
analiza je potvrdila nanometarsku veličinu čestica, o čemu će detaljnije biti reči u poglavlju 4.3. u kontekstu predviđanja interakcija nanokristala i ćelija. Mapiranje elemenata sa prostornom raspodelom u uzorku nanokristala PrFAP0.5a rađeno EDS metodom, pokazuje da su joni Pr^{3+} raspoređeni uniformno po kristalima.

Analiza morfologije kalciniranih uzoraka na 1000 °C pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije, zajedno sa mapiranjem elementnog sastava za uzorak PrFAP1k, prikazana je na Slici 4.1.14. Na mikrografima je uočljivo prisustvo aglomerisanih čestica, sa veličinama aglomerata od par stotina nanometara. DLS analiza je potvrdila postojanje čestica čiji su prečnici nešto veći od nanometarskih veličina, od oko 150 nm, kao i postojanje aglomerata od oko 500 nm. EDS analiza potvrdila je prisustvo svih elemenata u strukturi, dok su mape elemenata pokazale da dolazi do većeg koncentrisanja Pr^{3+} jona u pojedinim zonama, kao posledica dejstva visoke temperature i koalescencije čestica.



Slika 4.1.14. Morfološka analiza kalciniranih nanokristala na bazi SEM mikrografa (a) FAPk, (b) PrFAP0.1k (c) PrFAP0.5k i (d) PrFAP1k uzorka. (e) EDS elementarna analiza PrFAP1k uzorka.

Slika 4.1.15. prikazuje ekscitaciono-emisione profile uzorka aktiviranih na 700 °C (levo), zajedno sa njihovom multivarijantnom analizom (desno).



Slika 4.1.15. Ekscitaciono-emisione mape (levo) i dominantne komponente fluorescentnih spektara K1 i K2 identifikovane MCR-ALS analizom (desno). (a) FAPa, (b) Pr FAP0.1a (c) PrFAP0.5a i (d) PrFAP1a uzorka aktiviranih na 700 °C [115].

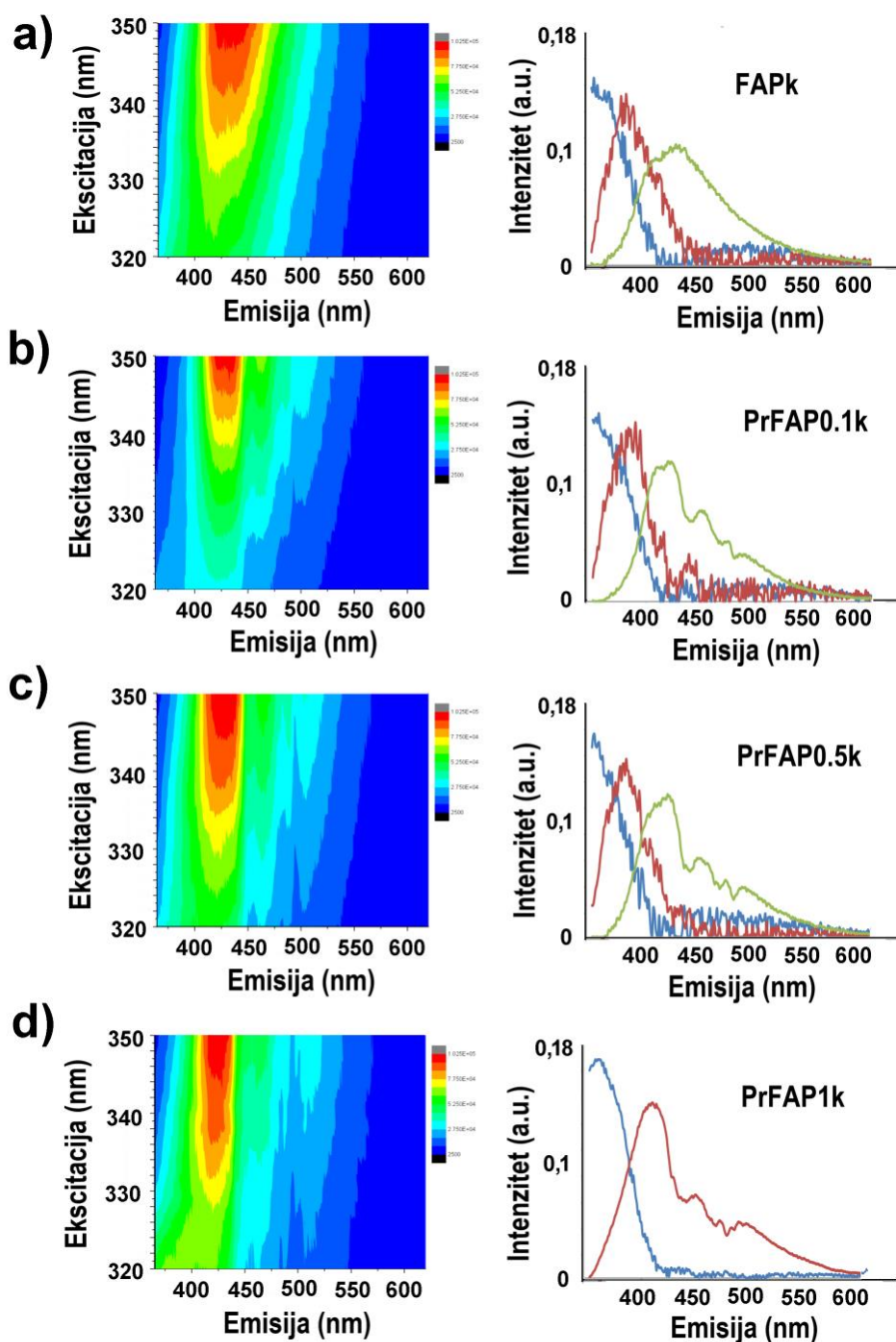
Dobijeni luminescentni nanokristali čistog FAP-a imaju maksimum fluorescencije u ljubičastom području (oko 425 nm) pod UV ekscitacijom (videti Sliku 4.1.15. a (levo)). Ranije

studije su pokazale da je samo-luminescencija FAP-a rezultat defekata u strukturi ili prenosa naelektrisanja (C-T) sa najelektronegativnijih F⁻ jona u strukturi [27]. Pošto ekscitacija u području UV oblasti nije pogodna za bio-medicinsku primenu i biosnimanja, primenom jona Pr³⁺ omogućeno je pomeranje i ekscitacije i emisije u vidljivi deo spektra, što je i ostvareno nakon aktivacije uzoraka na 700 °C. Ekscitaciono-emisione mape FAP kristala sa dopiranim Pr³⁺ snimane su u rasponu od 420 nm do 500 nm sa regionom posmatranja talasne dužine od 520 do 680 nm (vidi Sliku 4.1.15. b, c, d (levo)). Dopiranje jonima Pr³⁺ rezultira jasnim pomerajem ukupne emisije luminescencije nanokristala sa UV na vidljivi opseg, sa dva glavna maksimuma koncentrisana na 545 nm i 600 nm. Ova dva maksimuma su u skladu sa prelazima u Pr³⁺ jonima u zelenoj (³P₀→³H₄) i narandžastoj (¹D₂→³H₄) boji vidljivog spektra [109, 110].

Tabela 4.1.11. Vrednosti maksimuma komponenata MCR-ALS analize.

Uzorak	Maksimumi komponenata	
	K1	K2
FAPa	386	434
PrFAP0.1a	544	600
PrFAP0.5a	-	600
PrFAP1a	542	600

Dobijene matrice ekscitaciono-emisionih mapa analizirane su korišćenjem metoda multivarijacione rezolucija krivih–naizmeničnih najmanjih kvadrata (MCR-ALS). U slučaju čistog uzorka FAPa, emisija je sastavljena od dve komponente fluorescencije (prikazane plavim i crvenim spektrom na slici 4.1.15. a (desno)). Poreklo ovih komponenata može biti posledica dve vrste defekata u kristalnoj rešetki, kao što su zamena hidroksilne grupe i stvaranje vakansi ili prelaz naelektrisanja sa najelektronegativnijeg jona F⁻ [27]. Emisije aktiviranih FAP uzoraka sa 0.1% i 1% Pr³⁺ takođe pokazuje dve spektralne komponente (Slika 4.1.15. b i d (desno)). Ovde se spektar prikazan plavom bojom može povezati sa luminescencijom rešetke kristala FAP-a, dok crveni spektar potiče od Pr³⁺ prelaza. Samo spektar uzorka PrFAP0.5a sa 0,5% Pr³⁺ dopanta, pokazuje jedanu dominantnu komponentu fluorescencije prikazanu plavom bojom, koja se može povezati sa Pr³⁺ prelazom ¹D₂→³H₄ (slika 4.1.15. c (desno)). Kako su dobijeni karakteristični luminescentni prelazi Pr³⁺ jona u ovim nanokristalima aktiviranim na 700 °C, izvršena su detaljnija ispitivanja u pogledu luminescencije, biokompatibilnosti i potencijalnih aplikacija u biosnimanjima.



Slika 4.1.16. Ekscitaciono-emisione mape (levo) i dominantne komponente fluorescentnih spektara K1, K2 i K3 identifikovane MCR-ALS analizom (desno). (a) FAPk, (b) PrFAP0.1k (c) PrFAP0.5k i (d) PrFAP1k uzorka kalciniranih na 1000 °C.

Table 4.1.12. Vrednosti maksimuma komponenata MCR-ALS analize.

Uzorak	Maksimumi komponenata		
	K1	K2	K3
FAPk	365	395	438
PrFAP0.1k	365	400	430
PrFAP0.5k	368	395	430
PrFAP1k	-	390	420

Fluorescentni spektri FAPk i PrFAPk uzoraka kalciniranih na 1000 °C, a dobijenih pri ekscitacijama u opsegu između 320–350 nm u vidu ekscitaciono-emisionih mapa prikazani su na Slici 4.1.16 (levo). Kao i kod sintetisanih uzoraka, svi kalcinirani uzorci imaju maksimalnu vrednost ekscitacije na oko 350 nm, nastalu kao rezultat prenosa naelektrisanja sa najelektronegativnijeg atoma F⁻-Ca²⁺(CT) kristalne rešetke. Uobičajeni luminescentni *f-f* prelazni Pr³⁺ jona nisu vidljivi u području veće talasne dužine zbog njihovog značajno nižeg intenziteta emisije u poređenju sa intenzitetom emisije FAP domaćina, kao i u slučaju sintetisanih uzoraka. Čisti FAPk uzorak je pokazao jak široki opseg emisije domaćina od 390-500 nm sa maksimumom emisije u ljubičastom području vidljivog dela spektra na oko 420 nm. Nakon što je Pr³⁺ substituisan u rešetku domaćina, uzorci su još uvek pokazivali intenzivan široki opseg emisije domaćina sa re-apsorpcionim prelazima slabog intenziteta od strane Pr³⁺ jona u plavo-zelenom regionu. Takođe, na mapama se može primetiti smanjenje intenziteta emisije domaćina sa povećanjem koncentracije Pr³⁺ jona (Slika 4.1.16. (levo)). Pikovi re-apsorpcije emisije domaćina između 440 i 500 nm dodeljeni su tipičnim ekscitacionim prelazima Pr³⁺ unutar konfiguracije $4f^2-4f^2$ kao i u slučaju sintetisanih uzoraka [109]. Uočljivo je da i ovde nedostaje maksimum emisije na oko 595 nm povezan sa prelazom sa ³H₄ na ¹D₂ nivo, kao i u slučaju sintetisanih uzoraka [26, 109]. Tokom kalcinacije sintetisanih uzoraka na 1000 °C dolazi do stvaranja velikog broja vakansi u strukturi, usled procesa dekarbonacije i dehidroksilacije, koje i utiču na smanjenje intenziteta luminescencije domaćina i zadržavanje Pr³⁺ emisionih prelaza.

Za dekompoziciju dobijenih ekscitaciono-emisionih matrica korišćena je metoda multivarijacione rezolucije krivih-naizmeničnih najmanjih kvadrata (MCR-ALS) i rezultati su prikazani na desnoj strani Slike 4.1.16. Trokomponentna analiza bila je adekvatna za sve uzorke, osim za uzorak PrFAP1k. Dobijene vrednosti za maksimume komponenata fluorescencije navedene su u Tabeli 4.1.12. MCR-ALS analiza pokazuje da komponenta K1 (plave linije na desnom grafiku na Slici 4.1.16.) ima crveni pomeraj od FAPk do PrFAP0.5k uzorka. Za uzorak PrFAP1k komponenta K1 se stapa sa komponentom K2 i gasi. To je posledica stvaranja vakansi u strukturi i nastanka faze oksifluorapatita, naročito u uzorku PrFAP1k sa najvećom koncentracijom dopanta [114]. Komponente K2 (crvene linije na desnom grafiku na Slici 4.1.11.) i K3 (zelene linije na desnom grafiku na Slici 4.1.11.) imaju plavi pomeraj koji ide od uzorka FAPk do uzorka PrFAP1k. Analiza emisionih spektara zajedno sa rezultatima analiza XRD, FTIR i TG-DSC dovodi do zaključka da je u slučaju kalciniranih uzoraka zamena Ca²⁺ sa Pr³⁺ praćena kompenzacijom naelektrisanja u vidu nastanka anjonskih vrsta O²⁻ i vakansi na mesto vodonika koje zadržavaju luminescenciju dopanta. Takođe, stvaranje velikog broja vakansi u strukturi dodatno smanjuje luminescenciju domaćina. Ovi defekti ustvari apsorbuju ekscitacionu energiju, obično je raspršujući

u obliku vibracija rešetke [120].

Na kraju ove karakterizacije potrebno je razjasniti zbog čega uzorci aktivirani na 700 °C pokazuju karakteristične emisione prelaze Pr^{3+} jona, a uzorci kalcinirani na 1000 °C, kao i sušeni na 110 °C, ne pokazuju ove prelaze već samo luminescenciju kristalne rešetke. Generalno luminescentne osobine dopiranih nanočestica, ali i krajnje funkcionalne karakteristike suštinski zavise od kristaličnosti, koncentracije jona aktivatora, kao i od stehiometrije jedinjenja i eventualnog prisustva drugih jonskih vrsta [85]. Takođe, kada su u pitanju nanočestice ne treba zanemariti ni efekat koji imaju veličina i oblik na luminescenciju.

Sintetisane slabokristalne nanočestice PrFAP-a sastoje se od aglomerisanih čestica nepravilnog sfernog oblika i pokazuju jaku samo-luminescenciju kristalne rešetke sa dodatnom reapsorpcijom od strane Pr^{3+} jona. U ovom slučaju joni Pr^{3+} se ponašaju kao apsorberi luminescencije domaćina, što bi trebalo da dovede do re-emisije apsorbovane luminescencije. Odsustvo dodatnih emisioh prelaza Pr^{3+} jona je posledica prisustva nečistoća u kristalnoj rešetki u vidu CO_3^{2-} jona i zaostale vode. Joni CO_3^{2-} i molekuli H_2O povećavaju fononsku energiju kristalne rešetke i zadržavaju energetske prelaze u Pr^{3+} jonima [3, 110, 111].

Aktivacijom sintetisanih nanoprahova na 700 °C dobijene su nanočestice sfernog oblika i dobre disperzije, kod kojih je veličina kristalita bliska veličini nanočestice kristala. Ovakav profil kristalne matrice podržava luminescentne $4f^2-4f^2$ prelaze u Pr^{3+} jonu. Kod aktiviranih nanokristala na 700 °C pokazano je istovremeno prisustvo pored fluoridnih i hidroksilnih jona unutar kristalne rešetke, što dovodi do smanjene difuzije i na taj način do smanjenog zgušnjavanja i rasta zrna tokom kalcinacije [85]. Porast koncentracija OH^- jona u kristalnoj rešetki, dovodi do smanjenja intenziteta luminescencije Pr^{3+} jona. Ukoliko su OH^- joni na površini kristala, onda će se ponašati i kao akseptori ekscitacije, tako da mogu potpuno da gase luminescenciju [106, 121]. Tokom kalcinacije na 700 °C ne dolazi do fazne transformacije, osim što molekuli H_2O i CO_2 napuštaju strukturu.

Kalcinacijom uzoraka do 1000 °C dolazi do procesa dekarbonacije i dehidroksilacije bez razgradnje osnovne kristalne strukture, što je praćeno koalescencijom čestica i stvaranjem većih aglomerata. U kristalnoj strukturi nastaju vakanse na mestima OH^- i CO_3^{2-} jona i formiraju se O^{2-} joni, radi očuvanja neutralnosti rešetke. Prisustvo vakansi u kristalnoj rešetki nestehiometrijskog materijala, zadržava emisiju dopanta i smanjuje intenzitet emisije domaćina [114]. Elektronski prelaz u Pr^{3+} jonu može biti ometen bilo jonom nečistoće kao što je O^{2-} ili strukturnim

deformacijama, što može rezultirati suzbijanjem emisije. Potpuno gašenje luminescencije u dopiranom FAP sistemu nastaje zbog postojanja centra za hvatanje ekscitacije na površini čestica (OH akseptori) ili zbog narušene simetrije luminescentnog centra u kristalnoj rešetki FAP-a [121].

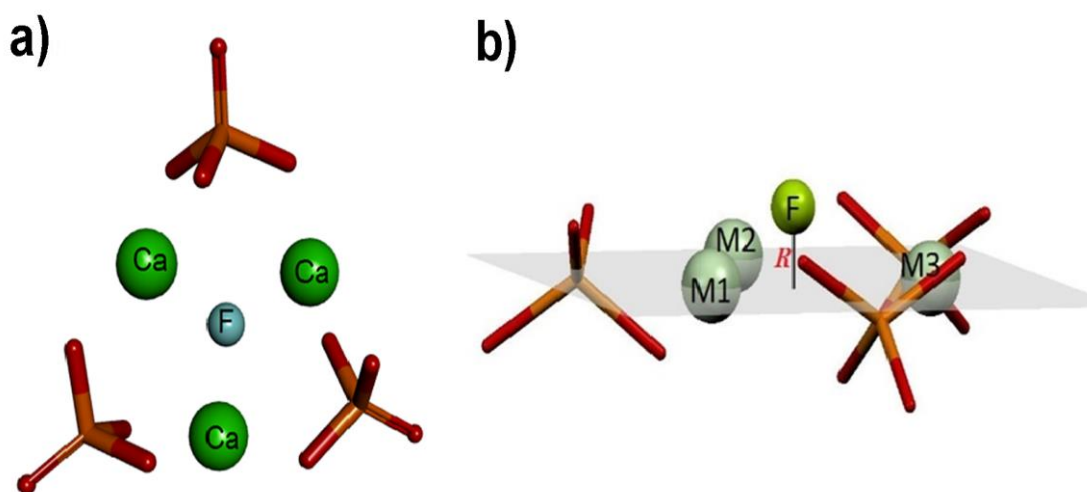
4.2. Evaluacija strukturnih promena dopiranjem Pr³⁺ u FAP kristalnom sistemu pomoću kvantno-hemijskih proračuna

Evaluacija efekata dopiranja Pr³⁺ jona na strukturu i luminescenciju FAP-a izvršena je teorijskim proračunima u odnosu na eksperimentalne podatke dobijene za nanokristale PrFAP-a aktivirane na 700 °C.

U FAP kristalima Ca²⁺ joni su smešteni u dva simetrijski različita kristalografska položaja, Ca1 (4*f*) i Ca2 (6*h*), i oba su dostupna za zamenu sa Pr³⁺ jonima [106]. Devetostruko koordinisano mesto Ca1, sa C₃ lokalnom simetrijom, povezano je sa šest fosfatnih grupa. Sedmostruko koordinisano mesto Ca2, sa C_s lokalnom simetrijom, povezano je sa pet fosfatnih grupa i jednim fluoridnim anjonom [106].

Koeficijenti zauzetosti pozicija Ca1 i Ca2 (REE–Ca2/REE–Ca1) pojedinim elementima retkih zemalja (REE) za prirodne minerale fluorapatita prethodno su izračunati korišćenjem izmerenih i interpoliranih podataka za mono-REE supstituisani uzorak fluorapatita [122]. Procenjena vrednost koeficijenta zauzetosti mesta sa prazeodimijumom je 3,22, i ukazuje na dominantnu prednost za poziciju Ca2. Ranija studija preferencija elemenata retkih zemalja za pozicije u fluorapatitu istih autora [40] takođe je pokazala da je Pr³⁺ supstituisao Ca²⁺ u Ca2 poziciji. Na osnovu ovih ranijih istraživanja izvedeni su kvantno-hemijski proračuni kako bi se istražio efekat zamene Ca²⁺ sa Pr³⁺ jonom u mestu Ca2 na supramolekularnu strukturu dopiranog fluorapatita. Početna struktura za proračun, koja odgovara bliskom okruženju jona fluorida, uzeta je iz kristalne strukture fluorapatita [123]. Struktura sadrži fluorid jon, tri jona Ca²⁺ (smeštena na mestu Ca2) i tri fosfatna jona. Radi jednostavnosti, ovaj sistem je označen kao FAP fragment. Početna struktura je optimizovana B3LIP metodom, sa bazisnim skupom SDD za jone Ca²⁺ i 6–31G bazisom za ostale elemente. Geometrija optimizovanog FAP fragmenta (Slika 4.2.1. a) pokazuje dobro slaganje sa geometrijom fragmenta koji se nalazi u kristalnoj strukturi (fluoridni joni su smešteni u ravni koju formiraju joni Ca²⁺, na udaljenosti od 2,31 Å od svakog od njih; Ca²⁺ joni su razdvojeni na rastojanju od 4,00 Å). Ovaj nivo slaganja ukazuje na pouzdan nivo teorije. Optimizovani FAP fragment koristi se kao početna struktura u kojoj su joni Ca²⁺ zamenjeni Pr³⁺

jonima. Promenjene strukture su dodatno optimizovane metodom nerestriktivan B3LIP (UB3LIP), sa bazisnim skupom SDD za jone metala i 6–31G bazisom za ostale atome. Nerestriktivan B3LIP metod je izabran jer Pr^{3+} sadrži nesparene elektrone. Zamena Ca^{2+} sa Pr^{3+} jonima dovodi do deformacije strukture dopiranih fluorapatitnih $n\text{Pr-FAP}$ sistema, gde je n broj Ca jona zamenjen Pr jonima i upoređen sa strukturom optimizovanog FAP fragmenta (Slika 4.2.1.a). Deformacija je opisana parametrima koji opisuju udaljenosti između odgovarajućih atoma i ravni kao što je prikazano na slici 4.2.1.b, dok su određene vrednosti ovih parametara date u Tabeli 4.2.1.



Slika 4.2.1. Teorijska strukturalna analiza. (a) Optimizovana struktura FAP fragmenta, ekstrahovana iz kristalne strukture korišćenjem B3LIP metode. Fluoridni jon se nalazi u ravni formiranoj sa Ca^{2+} jonima, jednako udaljenim od svakog od njih (rastojanje od 2,25 Å). Ca^{2+} ioni su razdvojeni na udaljenosti od 3,89 Å. Fosfatni joni istovremeno stupaju u interakciju sa dva Ca^{2+} jona, pri čemu prvi interaguje preko dva atoma kiseonika (bifurkirana interakcija), dok je sa drugim preko jednog atoma kiseonika (monofurkirana interakcija). (b) Ilustracija parametara koji se koriste za opisivanje strukture $n\text{Pr-FAP}$ sistema (optimizovanom metodom UB3LIP), gde M1 do M3 predstavljaju Ca^{2+} lokacije koje treba delimično zameniti Pr^{3+} jonima [115].

Uvođenje Pr^{3+} jona u FAP-sistem dovodi do povećanja odbojnih sila između jona metala i do povećanja M-M rastojanja (od 3,89 Å u FAP-u do 4,02 Å u sistemu 3Pr-FAP). Ove promene su praćene povećanjem rastojanja M-O (od 2,25 Å u FAP-u do 2,48 Å u sistemu 3Pr-FAP) i odstupanjem F^- jona od ravni koju formiraju joni metala (R parametar). Na osnovu rezultata proračuna trebalo bi očekivati porast parametara jediničnih ćelija dopiranih uzoraka (naročito zapremine, V), što se može potvrditi podacima dobijenim iz XRD analize za aktivirane uzorke.

Naime, dolazi do povećanja parametara jedinične ćelije za dopirane uzorke (na primer za 1% dopiranog uzorka $a=9,38533$ (3) Å, $c=6,888465$ (3) Å, i $V=525,185$ (3) Å³) u poređenju sa parametrima za FAP ($a=9.3775$ (3) Å, $c=6.8910$ (2) Å i $V=524.779$ (3) Å³). Sve veći broj Pr³⁺ jona u nPr-FAP sistemu dovodi do neznatnog smanjenja R odstupanja (0,97 Å u Pr-FAP, 0,95 Å u 2Pr-FAP i 0,88 Å u sistemu 3Pr-FAP) i do povećanja privlačnih sila između pozitivno naelektrisanih jona metala i negativno naelektrisanih fosfatnih i fluoridnih jona. Smanjenje zapremine sistema rezultat je ovih promena (485,88 Å³ za Pr-FAP, 479,29 Å³ za 2Pr-FAP i 472,79 Å³ za 3Pr-FAP sistem), što je u skladu sa rezultatima za smanjenje zapremina dobijenih iz XRD difrakcione analize prahova za uzorke FAPa, PrFAP0.1a i PrFAP0.5a. Za uzorak PrFAP1a treba očekivati smanjenje intenziteta luminescencije [115].

Tabela 4.2.1. Vrednosti parametara koji se koriste za opisivanje geometrije Pr³⁺-FAP sistema, izražene u Å (M-O, M-M, i R rastojanju) i Å³ (izračunate zapremine) [115].

Parametri	Pr-FAP	2Pr-FAP	3Pr-FAP
	M1=Ca ²⁺ M2=Ca ²⁺ M3=Pr ³⁺	M1=Ca ²⁺ M2=Pr ³⁺ M3=Pr ³⁺	M1=Pr ³⁺ M2=Pr ³⁺ M3=Pr ³⁺
M1-O	2.26	2.34	2.48
M2-O	2.30	2.40	2.48
M3-O	2.44	2.53	2.48
M1-M2	3.52	3.70	4.02
M2-M3	3.71	4.04	4.02
M1-M3	3.80	3.82	4.02
R	0.97	0.95	0.88
Zapremina	485.88	479.29	472.79

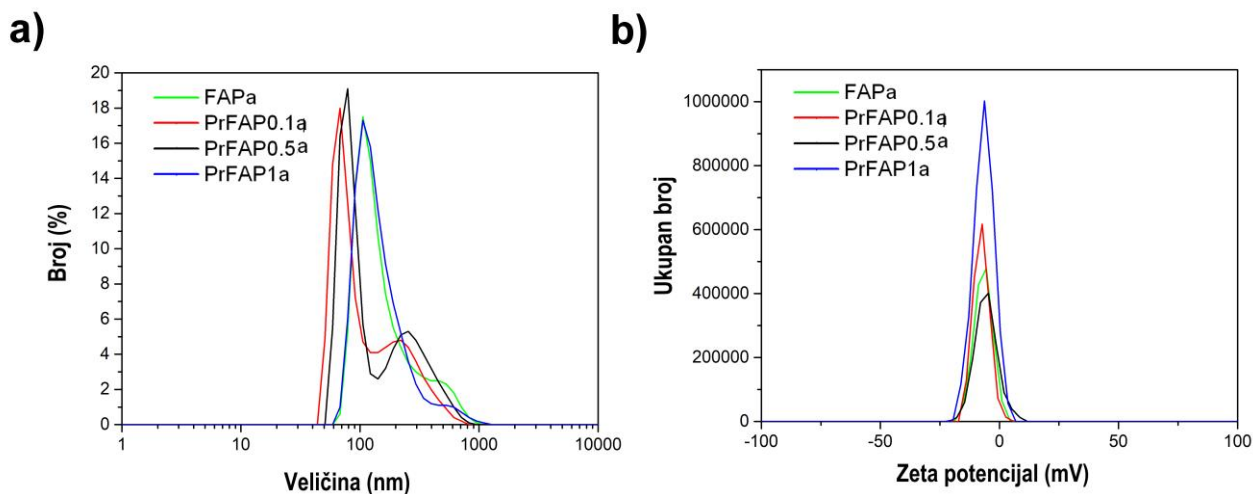
Na osnovu analize, predviđanje strukturalnih promena kvantno-hemijskim proračunima, zamena Ca²⁺ jona Pr³⁺ jonima dovodi do deformacije u strukturi dopiranog fluorapatita. Ove promene su praćene povećanjem rastojanja M-O i odstupanjem F⁻ jona od ravni koju formiraju joni metala. FTIR spektar (Slika 4.1.13) pokazuje da sa porastom Pr³⁺ koncentracije nastaju O-H vibracije, ali se u XRD difraktogramima detektuju samo čiste faze fluorapatita (Slika 4.1.12). Povećavanjem koncentracije jona Pr³⁺ povećava se količina OH⁻ jona, što je praćeno prenošenjem protona iz OH⁻ grupa u PO₄²⁻ grupu (stvaraju se HPO₄²⁻ joni (Slika 4.1.13.)). Na ovaj način se povećava negativan naboj (OH grupa je naelektrisana -1, a O jon -2), a samim tim i elektrostatička sila između Pr i O atoma, što dodatno stabilizuje strukturu. Sveukupno, na osnovu izvršene strukturne analize, pretpostavljeni mehanizam supstitucije je jedan Pr³⁺ za jedan Ca²⁺, s delimičnom supstitucijom F⁻ sa O²⁻ i OH⁻ i stvaranjem vakansi usled postizanja neutralnosti sistema. Povećanje koncentracije Pr³⁺ u FAP-u, praćeno pojavom OH⁻, O²⁻ i vakansi, dovodi do gašenja luminescence.

4.3. Evaluacija aktiviranih nanokristala kao kontrastnih agenata za biosnimanje ćelija kancera

Rezultati fizičko-hemijske karakterizacije sintetisanih nanokristala su pokazali da nanokristali aktivirani na 700 °C mogu biti pogodni kandidati za kontrastne agente za studije biosnimanja. U narednom koraku rađeni su testovi sa ćelijama i ispitane su biokompatibilnost i hemokompatibilnost nanokristala. Na kraju su urađene *in vitro* i *ex vivo* studije biosnimanja na ćelijama kancera kože i pluća pomoću konfokalnog mikroskopa i mikroskopa širokog polja. Veći deo ovih analiza je objavljen u radu [115].

4.3.1. Predviđanje interakcija ćelija i nanokristala na osnovu njihove hidrodinamičke veličine i površinskog naboja

Aktivirani nanokristali uzoraka FAPa i PrFAPa su resuspendovani u vodi i analizirane su raspodele veličine čestica i zeta-potencijala pomoću metode dinamičkog rasejanja svetlosti (DLS) (Slika 4.3.1). Eksperimentalno utvrđene vrednosti zeta-potencijala nanokristala su blago negativne u rasponu od -5 do -10 mV, a veličine hidrodinamičkog prečnika čestica se kreću između 58 i 106 nm (videti Tabelu 4.3.1).



Slika 4.3.1. Karakterizacija veličine i površinskog naboja aktiviranih nanokristala. (a) DLS distribucija veličine hidrodinamičkog prečnika čestica i (b) zeta-potencijal FAPa i PrFAPa uzoraka [115].

Table 4.3.1. Vrednosti hidrodinamičkog prečnika čestice i zeta potencijala aktiviranih nanokristala

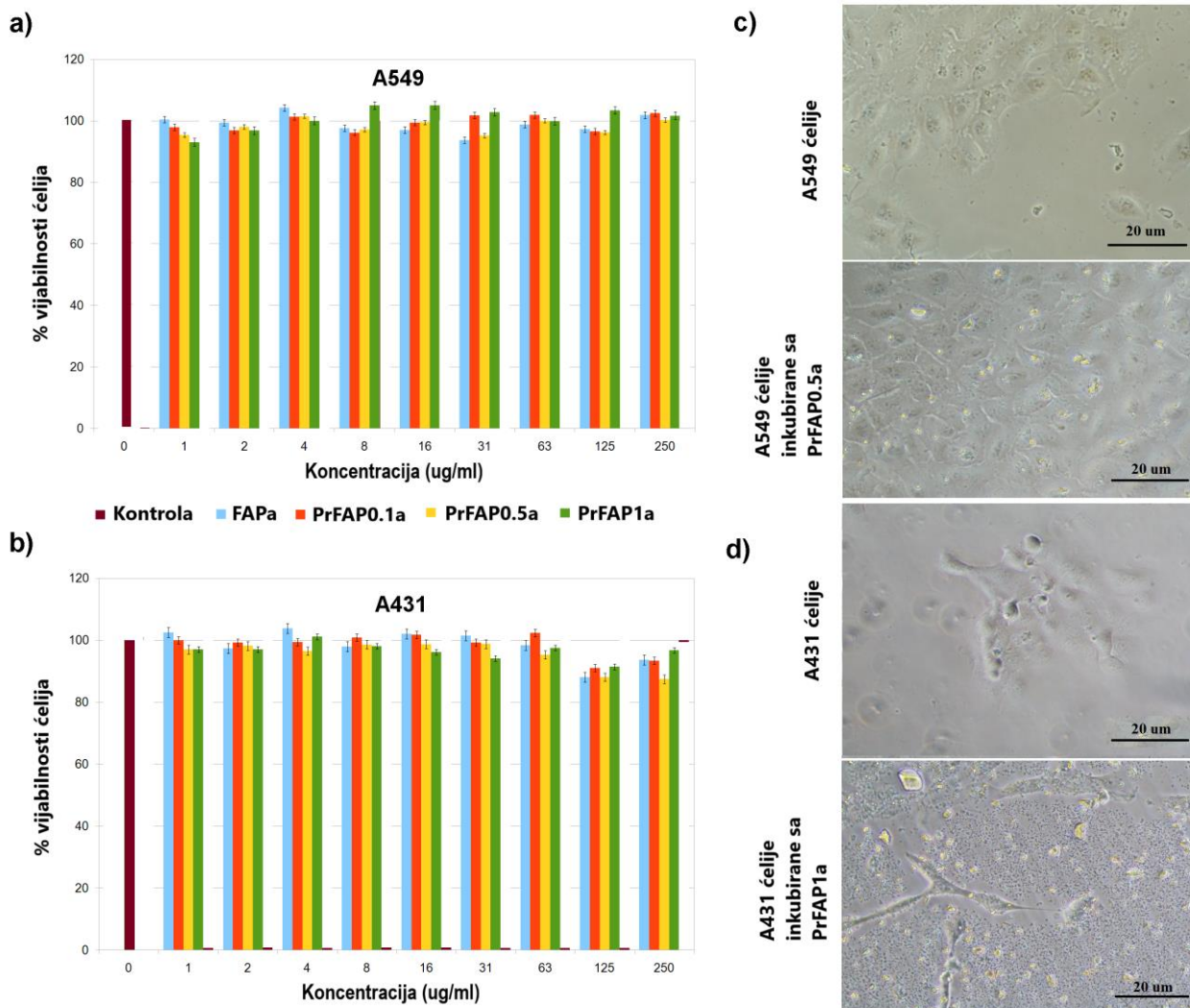
Uzorak	Veličina (nm)	Zeta potencijal (mV)
FAPa	105,7	-5,56
PrFAP0.1a	58,77	-7,27
PrFAP0.5a	78,82	-7,96
PrFAP1a	105,7	-9,57

Rezultati DLS analize FAPa i PrFAPa čestica potvrđuju hidrodinamičku veličinu kristala na nanometarskom nivou, ali i prisustvo agregata. Veličine nanokristala dobijene pomoću DLS analize ukazuju na hidrodinamički prečnik nanokristala i zato imaju nešto veće vrednosti u poređenju sa određenim veličinama nanokristala TEM metodom. Pored toga, može se primetiti određeni stepen agregacije koji ukazuje na nisku stabilnost suspenzija. Zeta-potencijal čestica koristi se za određivanje stabilnosti suspenzija, kao i za predviđanje interakcija sa ćelijama. Površina FAP-a je blago negativno naelektrisana, što čini da vodena suspenzija čestica više bude nestabilna. Dodavanjem jona dopanta povećava se negativnost, što je u skladu sa supstitucijom Ca^{2+} sa Pr^{3+} i verovatno vezivanjem anjonskih vrsta na površini kristala radi kompenzacije naelektrisanja. Na osnovu literaturnih podataka o interakcijama nanokristala apatita sa ćelijama osteoblasta koje se nalaze na površini koštanog tkiva [124, 125], očekuje se da će nanokristali PrFAPa na osnovu dobijenih eksperimentalnih vrednosti za zeta-potencijal i veličine biti pogodni za *in vitro* studije i da će ih ćelije internalizovati.

4.3.2. Biokompatibilnost i hemokompatibilnost aktiviranih nanokristala

Nanočestice koje su kandidati za kontrastne agente za primene u biosnimanjima treba da budu visoko biokompatibilne i netoksične. Za ispitivanje biokompatibilnosti upoređena je citotoksičnost tri tipa PrFAPa nanomaterijala sa 0,1%, 0,5%, 1% Pr^{3+} pored kontrolnog FAPa uzorka. Proliferacija dve ćelijske linije kancera A549 i A431, inkubirane različitim koncentracijama nanokristala FAPa i PrFAPa tokom 72 h, procenjena je korišćenjem *Resazurin* testa vijabilnosti (preživljavanja) ćelija [94]. Grafici sa Slike 4.3.3 a i b pokazuju da proliferacija ćelija za obe ćelijske linije sa različitim grupama doziranih nanokristala pokazuje normalan trend rasta, čak i pri velikoj dozi nanokristala od 240 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Sve eksperimentalne grupe ćelija sa nanokristalima pokazuju preživljavanje uporedivo sa kontrolnom grupom samo sa ćelijama. Ovaj rezultat ukazuje na očiglednu necitotoksičnost PrFAP nanokristala u testiranim uslovima, što omogućava dalje studije biosnimanja živih ćelija. Pored toga, posmatranje morfologije ćelija izvršeno je na optičkom mikroskopu pre i posle inkubacije od 72 h sa nanokristalima. Slika 4.3.3 c prikazuje morfologiju

ćelija linije A549 bez nanokristala i nakon što su inkubirane sa 125 $\mu\text{g/ml}$ PrFAP05a u toku 72 h. Takođe, isto je i za ćelije linije A431, slika 4.3.3 d samo sa ćelijama i ćelijama sa 250 $\mu\text{g/ml}$ PrFAP1a. U oba slučaja se vidi da su sve ćelije zadržale normalnu morfologiju.



Slika 4.3.3. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti FAPa i PrFAPa uzoraka sa 0,1, 0,5 i 1% Pr^{3+} . Ćelije su inkubirane sa nanočesticama tokom 72h na 37°C , ispitan je *Resazurin* test vijabilnosti i rezultati su normalizovani u odnosu na netretirane kontrolne ćelije. (a) Vijabilnost ćelija za linije A549 ćelije i (b) A431 ćelije inkubirane sa različitim koncentracijama FAPa i PrFAPa nanokristala. Transmisionne slike koje pokazuju morfologije (c) ćelija A549 bez nanokristala (gore) i ćelije inkubirane sa 125 $\mu\text{g/mL}$ PrFAP0.5a (dole); (d) A431 ćelije bez nanokristala (gore) i ćelije inkubirane sa 250 $\mu\text{g/mL}$ of PrFAP1a (dole) [115].

Analiza biokompatibilnosti i rezultati ispitivanja morfologije ćelija ukazuju na to da su nanokristali PrFAPa sa različitim količinama dopiranih Pr^{3+} jona biokompatibilni i netoksični za žive ćelije, stoga su obećavajući kandidati za biološku upotrebu. Ovi rezultati su u saglasnosti sa

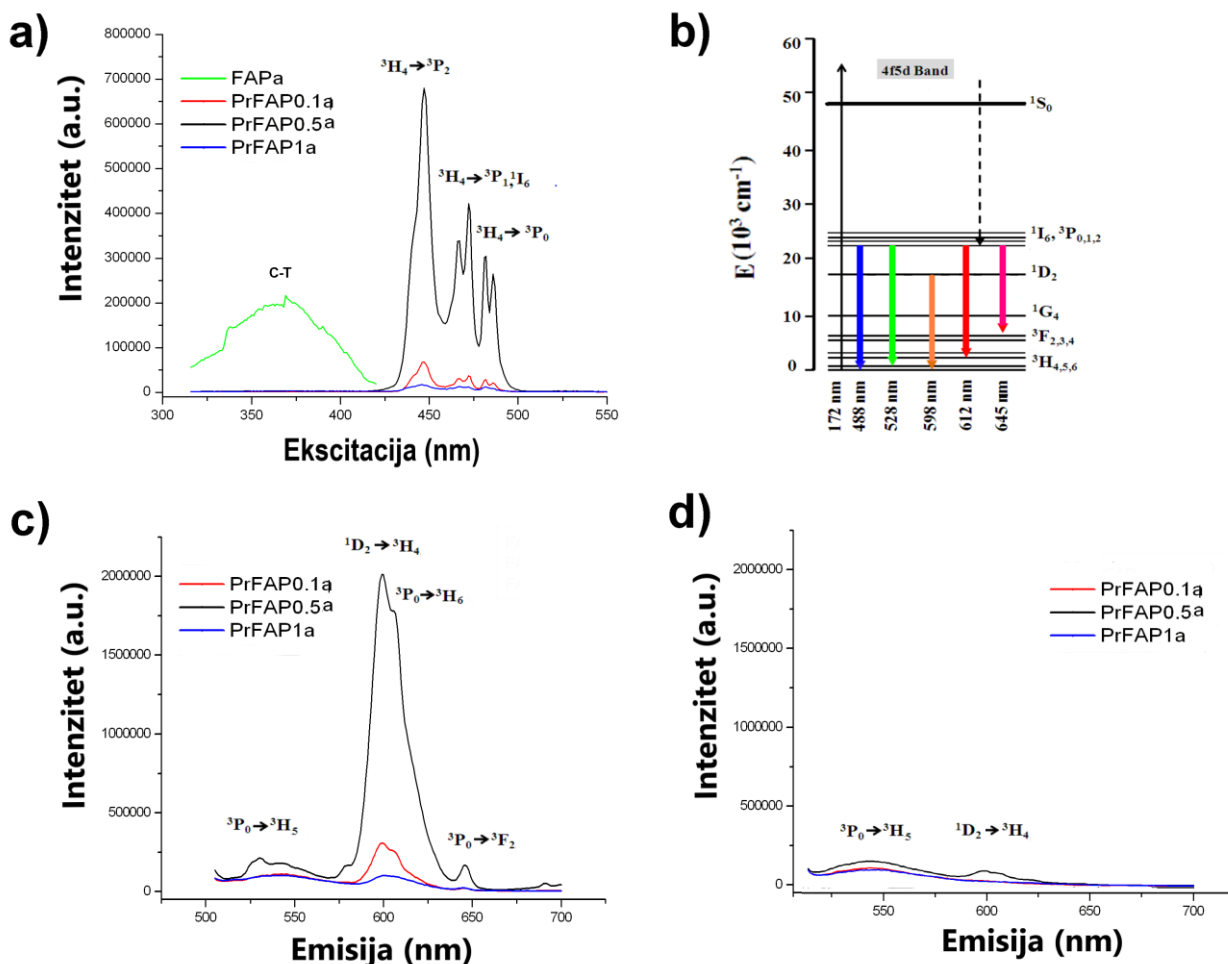
istraživanjima citotoksičnosti nanočestica FAP-a dopiranog različitim jonima retkih zemalja, sa prijavljenim preživljavanjima ćelija i do 90% [33]. Kao što je već spomenuto, Pr^{3+} spada u lake elemente grupe retkih zemalja i ranija istraživanja su pokazala njegovu dobru biokompatibilnost, a to je bilo povezano sa niskom rastvorljivošću [20].

Test hemolize eritrocita je urađen u cilju utvrđivanja hemokompatibilnosti dobijenih luminescentnih nanočestica. Niža stopa hemolize je u korelaciji sa većim stepenom kompatibilnosti nanokristala i krvi. Stepem hemolize indukovano FAPa i Pr^{3+} dopiranim FAPa nanočesticama je bio između 3,5 i 10%. Čisti uzorak FAP-a pokazao je najniži nivo hemolize. Povećanje sadržaja Pr^{3+} u FAP-u uzrokovalo je povećanje stepena hemolize, što je u korelaciji i sa smanjenjem veličine čestica. Ovo blago hemolitičko ponašanje uzoraka može biti posledica mehaničkog stresa membrana ćelije u interakciji sa nanočesticama, kao i efekta toksičnosti rastvorenih Pr^{3+} jona iz FAP rešetke. Lantanoidni joni u ljudskoj krvi mogu da stupaju u interakciju sa hemoglobinom i da utiču na vezivanje kiseonika, a takođe mogu da izazovu i reverzibilnu deformaciju ćelija krvi. Toksični efekat lantanoidnih jona zavisi od radijusa i koncentracije jona [126, 127]. U ranijim studijama ni čisti HAP ni FAP u kontaktu s krvlju nisu pokazali citotoksične efekte na eritrocite [128]. Ali u drugom izveštaju koji istražuje citotoksičnost različitih tipova kalcijum-fosfatne keramike, FAP je pokazao visoku citotoksičnost [129]. Zbog ovih rezultata ispitivana je i toksičnost FAP i FHAP keramike na ćelije leukemije [130]. Rezultati su pokazali da FAP i FHAP inhibiraju rast ćelija leukemije i izazivaju programiranu ćelijsku smrt, apoptozu putem zavisnim od mitohondrija/kaspaze-9/kaspaze-3 [130].

4.3.3. Studija usvajanja nanokristala od strane ćelija pomoću luminescentne konfokalne i mikroskopije širokog polja

Luminescentni mikroskopski sistemi za studije biosnimanja imaju lasere koji rade sa određenim opsezima ekscitaciono-emisionih talasnih dužina, pa je izvršena dodatna optička karakterizacija aktiviranih nanokristala luminescentnom spektroskopijom. Ekscitacioni profili, energetske prelazi u Pr^{3+} jonu i dobijeni emisioni spektri PrFAPa uzoraka pod rezonantnom (488 nm) i nerezonantnom (500 nm) ekscitacijom prikazani su na Slici 4.3.4. Za maksimalni nivo emisije oko 600 nm (prelaz $^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{H}_4$) dobijeni su ekscitacioni spektri Pr^{3+} u rešetki domaćina FAPa. Ekscitacija za nedopirani FAPa uzorak dobijena je za maksimum samo-luminescencije (prenos naboja (C-T)) od oko 425 nm (Slika 4.3.4a). Ekscitacioni pikovi za uzorke PrFAPa predstavljaju tipične $4f^2 \rightarrow 4f^2$ zabranjene intrakonfiguracijske prelaze Pr^{3+} jona. Prazeodimijum je veoma zanimljiv kao aktivator jon, jer njegovi energetske nivoi imaju višestruko metastabilna stanja koja

omogućavaju emisije u crvenoj, zelenoj, plavoj i ultraljubičastoj oblasti spektra [77, 131]. Ovi luminescentni prelazi prikazani su na dijagramu energetske nivoa Pr^{3+} jona na slici 4.3.4b. Može se zaključiti da pikovi na ekscitacionim spektrima između 440 i 500 nm odgovaraju $^3\text{H}_4 \rightarrow ^3\text{P}_2$, $^3\text{H}_4 \rightarrow ^3\text{P}_1$, $^1\text{I}_6$, $^3\text{H}_4 \rightarrow ^3\text{P}_0$ prelazima (Slika 4.3.4a). Najveći intenzitet ekscitacije ima uzorak PrFAP0.5a.



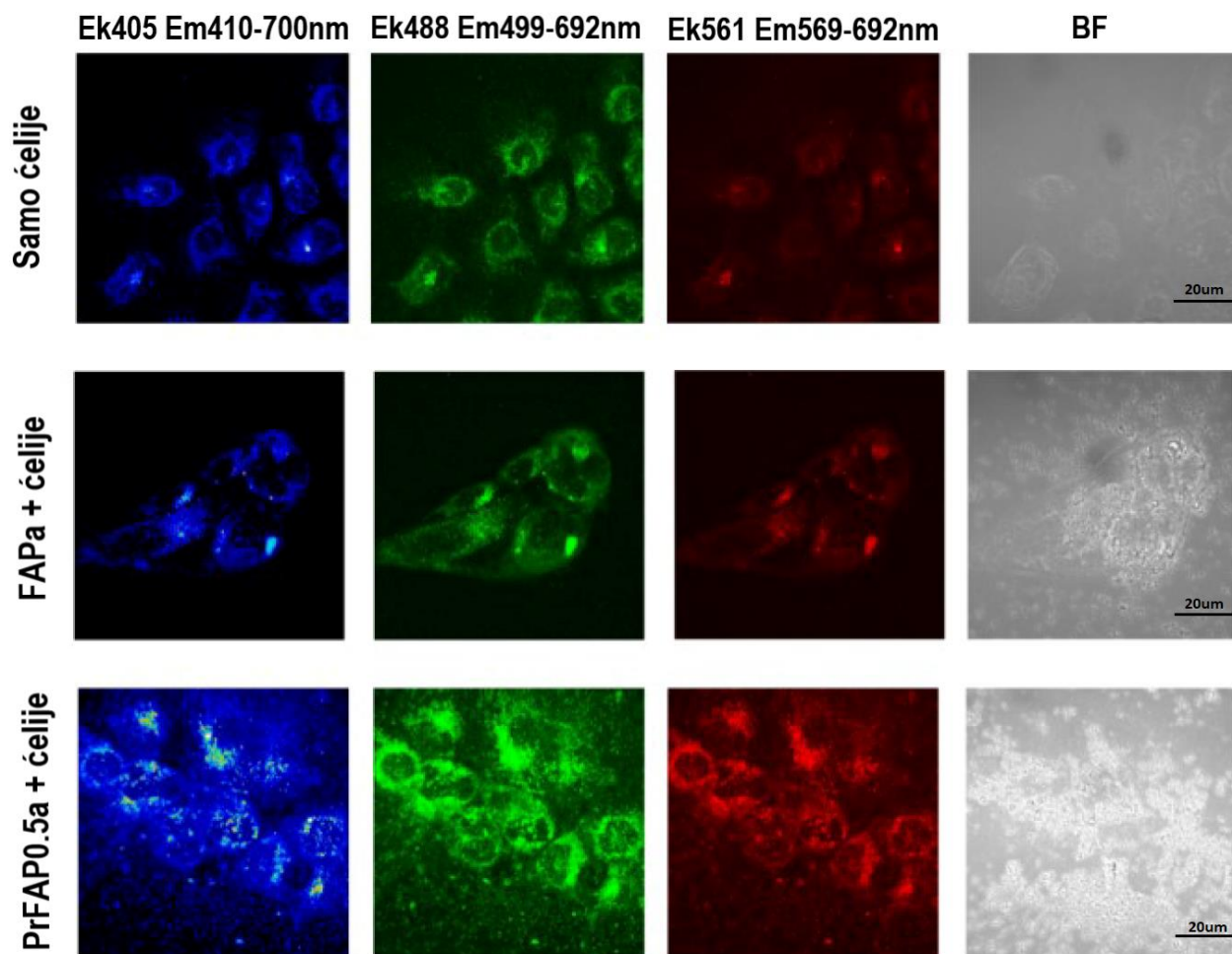
Slika 4.3.4. Optička karakterizacija aktiviranih nanokristala. (a) Spektar ekscitacije za FAPa kontrolu (detektovan na maksimalnoj emisiji od 450 nm) i za PrFAPa uzorke (detektovane kod emisije max. 600 nm). (b) Dijagram energetske nivoa Pr^{3+} jona sa karakterističnim prelazima, (c) Emisioni spektri PrFAPa uzoraka pod rezonantnom ekscitacijom na 488 nm i (d) pod nerezonantnom ekscitacijom na 500 nm. Prelazi u Pr^{3+} jonu $^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{H}_4$ i narandžaste emisijske trake na oko 600 nm su dominantne [115].

Luminescencija dopiranih Pr^{3+} jona zavisi od kristalne rešetke domaćina, koncentracije jona i talasne dužine ekscitacija, zbog čega su i korišćene rezonantne ekscitacije na 488 nm i nerezonantne na 500 nm. Kada su ekscitovani talasnom dužinom od 488 nm, dopirani PrFAPa kristali pokazuju jedan dominantan maksimum fluorescentne emisije na oko 600 nm (vidi Sliku

4.3.4 c), povezan sa prelazom $^1D_2 \rightarrow ^3H_4$ Pr^{3+} jona i praćenim drugim prelazima $^3P_0 \rightarrow ^3H_5$, $^3P_0 \rightarrow ^3H_6$ i $^3P_0 \rightarrow ^3F_2$ [132-134]. Rezonantna ekscitacija od 488 nm pobudila je samo elektrone od 3H_4 do 3P_0 i praćena je brzim neradijativnim relaksacijama do metastabilnih stanja 1D_2 . S obzirom na to da prelaz ($^3P_0 \rightarrow ^3H_4$) leži isto na 488 nm kao i ekscitacija (vidi sliku 4.3.4.b), emisija može da se opusti samo od 1D_2 do 3H_4 . Kao posledica toga, emisija pri 600 nm ($^1D_2 \rightarrow ^3H_4$) je najvećeg inteziteta. U prethodnom istraživanju optičkih svojstava Pr^{3+} u prirodnim mineralima fluorapatita iz španskih depozita i sintetskih fosfatnih stakala, nađen je najintenzivniji opseg emisije od oko 599 i 605 nm (prelaz $^1D_2 \rightarrow ^3H_4$) za ekscitaciju na 446 nm [132]. Štaviše, u istraživanjima spektroskopskih svojstava Pr^{3+} dopiranih u LaF_3 nanokristali/staklo kompozitima dobijena su ista dva vrha koja predstavljaju dva moguća prelaza $^1D_2 \rightarrow ^3H_4 + ^3P_0 \rightarrow ^3H_6$ koja se preklapaju [134]. Tranzicija $^1D_2 \rightarrow ^3H_4$ dominira u staklenom okruženju kao rezultat jakih neradijativnih procesa relaksacije stanja 3P_0 . Moguće je da emisijom $^1D_2 \rightarrow ^3H_4$ (Slika 4.3.4.c) dominira snažno deformisana Ca_2 lokacija nastala supstitucijom Pr^{3+} u kristalnoj rešetki. Ova dominantna emisija narandžaste svetlosti od 600 nm najintenzivnija je za uzorak PrFAP0.5a i najmanja za PrFAP1a. Ranija istraživanja pokazala su da je emisija iz stanja 1D_2 u stanje 3H_4 veoma osetljiva na koncentraciju dopiranih jona, njihov raspored u strukturi, kao i na fononsku energiju kristalne rešetke [133, 135]. Intenzitet emisije naglo opada kako se povećava koncentracija Pr^{3+} , a ova pojava se pripisuje unakrsnim relaksacijama između susednih Pr^{3+} jona [134, 135]. To je u korelaciji sa najmanjim intenzitetom emisije za uzorak PrFAP1a sa najvišom koncentracijom dopanta. Udaljenost između Pr^{3+} jona opada kako njihova koncentracija raste, tako da unakrsna relaksacija postaje učestalija. Da bi se povećao intenzitet luminescencije materijala, potrebno je dodati drugi dopantni jon i kreirati prenos naelektrisanja između njih [1-4, 33]. Ranija istraživanja pokazala su da pojavljivanje OH^- jona u kristalnoj rešetki FAP-a dovodi do smanjenja intenziteta luminescencije, što je jedan od razloga zašto uzorak FAP sa 0,5% Pr ima najveću luminescenciju [135, 106]. Sveukupno, rezultati optičke karakterizacije aktiviranih nanokristala pokazuju da emisija zavisi od koncentracije dopanta, a efikasnost luminescencije je maksimalna za uzorak PrFAP0.5a.

Na osnovu urađenih biokompatibilnih i optičkih svojstava PrFAPa nanokristala, vršene su studije biosnimanja ćelija kako bi se procenio njihov potencijal za bio-medicinske primene. Nanokristali su inkubirani 48 h sa ćelijama kancera, a potom je ispitivan njihov unos u ćelije, kao i luminescencija nanokristala unutar ćelija pomoću fluorescentne konfokalne mikroskopija i mikroskopije širokog polja. Korišćenjem konfokalnog mikroskopa i izvora laserske ekscitacije pri 405, 488 i 561 nm napravljene su fluorescentne slike ćelija inkubiranih sa nanokristalima, kao i samih ćelija bez nanokristala (Slika 4.3.5.). Emisije plave, zelene i crvene luminescencije sakupljane su u rasponima počevši od manjih talasnih dužina od 410, 499, 569 nm do većih talasnih

dužina od 700, 692 i 692 nm (vidi sliku 4.3.5.).

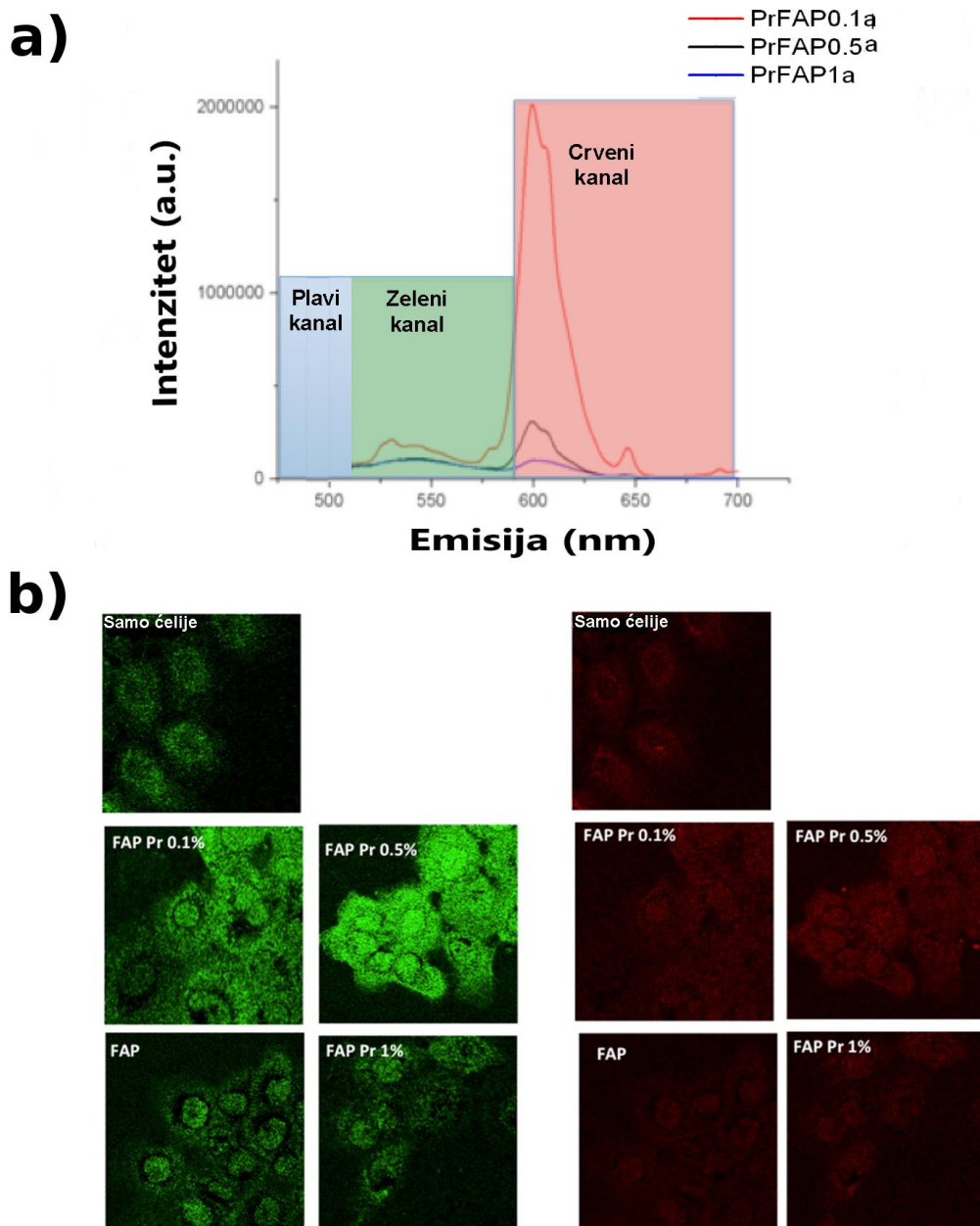


Slika 4.3.5. Konfokalne slike luminescencije ćelija A431 sa i bez dodatih FAPa nanokristala, merene u identičnim eksperimentalnim uslovima sa ekscitacijama na 405, 488 i 561 nm; (prvi red) samo ćelije (autofluorescencija), (drugi red) ćelije A431 inkubirane 48h sa 240 $\mu\text{g/ml}$ FAPa i (treći red) ćelije inkubirane 48h na 37 °C sa 240 $\mu\text{g/ml}$ PrFAP0.5a kristala.

Kao što je prikazano na Slici 4.3.5. (prvi red) ćelije A431 su pokazale jarko plavu i zelenu auto-fluorescenciju, dok ćelije nisu imale očiglednu crvenu auto-fluorescenciju. U vezi s tim, bilo je teško otkriti i odvojiti luminescenciju koja potiče od nanokristala. Studije dobijenih slika su otkrile da nanokristali mogu da prepoznaju ćelijsku površinu i da se lepe za nju, ali nisu potvrdile ulazak nanokristala u ćelije.

Da bi se uporedila i odvojila fluorescencija nanokristala od auto-fluorescentne ćelije, snimanje fluorescencije je sprovedeno korišćenjem konfokalnog mikroskopa pri ekscitacijama od 405 i 488 nm za iste opsege detekcije emisije od 410-505 nm (plavi kanal), 516-586 nm (zeleni kanal) i 588-730 nm (crveni kanal). Izabrani rasponi talasnih dužina odgovaraju maksimumima

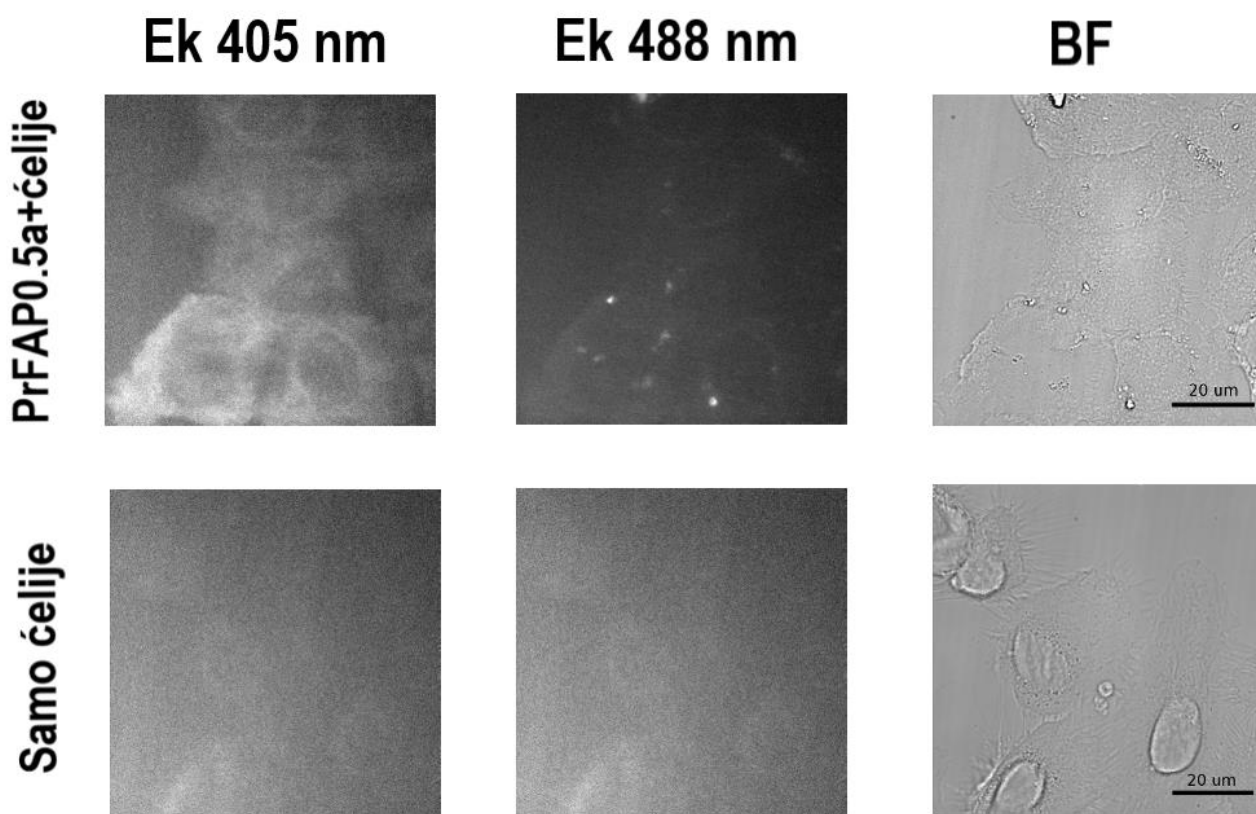
emisije PrFAPa nanokristala dobijenih spektroskopijom (vidi sliku 4.3.6 a). Konačno, slike dobijene u zelenom i crvenom kanalu pod ekscitacijom od 488 nm oduzete su od slika dobijenih za ekscitaciju na 405 nm kako bi se dobile slike delimično korigovane fluorescencije (slika 4.3.6. b). Autofluorescencija je najintenzivnija pod ekscitacijom od 405 nm, a ekscitacija pri 488 nm efikasno ekscituje energetske nivoe Pr^{3+} u FAP nanokristalima.



Slika 4.3.6. a) Opsezi detekcije korišćeni za studiju konfokalnog biosnimanja. Aktivirani nanokristali FAPa sa različitim koncentracijama Pr^{3+} dopanta imaju karakteristični odnos pikova u zelenoj i crvenoj oblasti. b) Konfokalne slike luminescencije nanokristala sa uklonjenom autofluorescencijom ćelija. Pregled svih razlika slika dobijenih ekscitacijama (405 nm minus 488 nm) u talasnom opsegu 516-586 nm (zeleno) i 588-730 nm (crveno) (skala 20 μm).

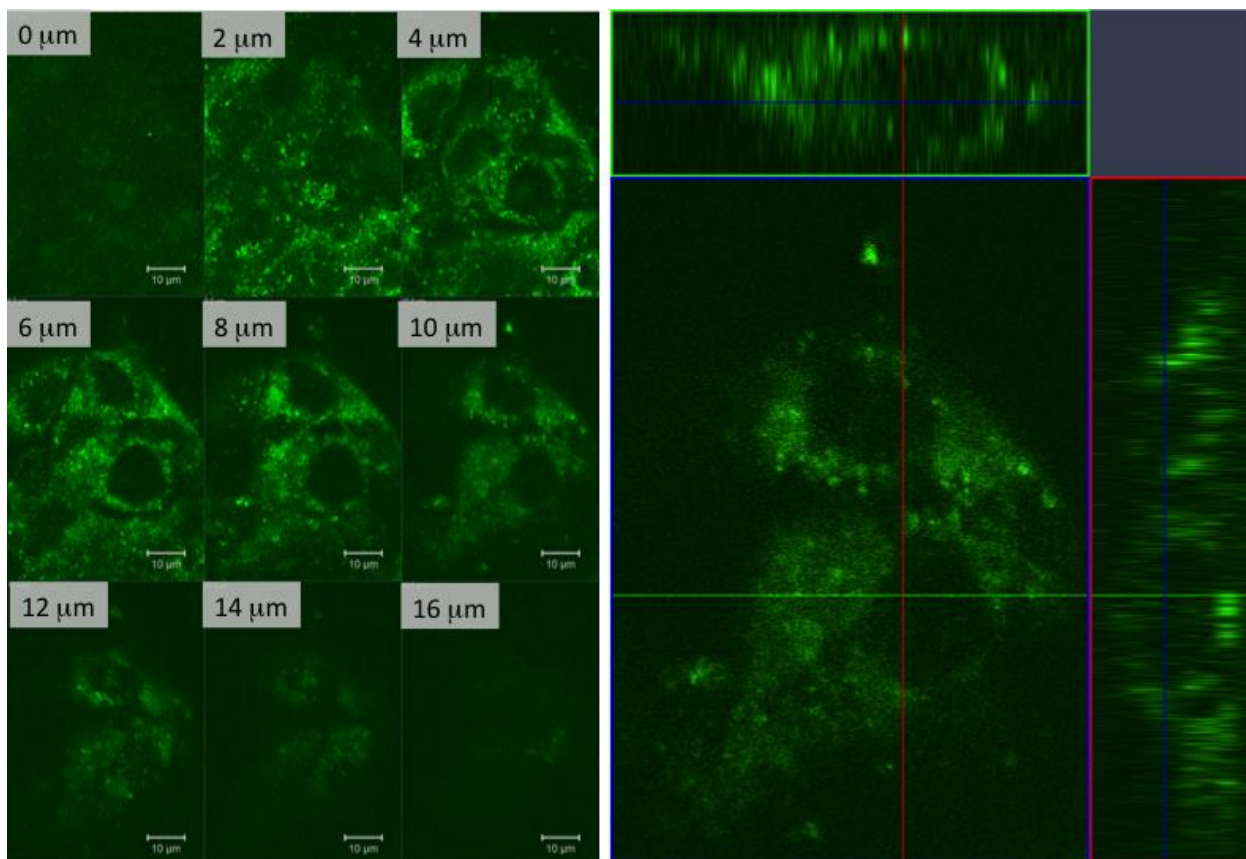
Kvalitativno poređenje razlika slika (Slika 4.3.6. b) pokazuje povećani signal luminescencije za aktivirane uzorke PrFA0.5a i PrFAP0.1a. U poređenju sa podacima fluorescentne spektroskopije nanokristala (vidi sliku 4.3.6 a) najveći intenzitet fluorescencije ima aktivirani uzorak PrFAP0.5a, zatim PrFAP0.1a, a potom slede FAPa i PrFAP1a. Izvršena je kvantitativna analiza poređenjem relativnog intenziteta fluorescencije u zelenom i crvenom kanalu. Upoređujući trend relativnih intenziteta ($^3P_0 \rightarrow ^3H_5$) u zelenom kanalu u odnosu na crveni kanal ($^1D_2 \rightarrow ^3H_4$ tranzicija Pr^{3+} jona), postoji slično ponašanje u poređenju sa spektrom.

Za potpuno uklanjanje autofluorescencije i potvrdu luminescencije koja potiče od nanokristala iz ćelije, vršeno je biosnimanje pomoću fluorescentne mikroskopije širokog polja. Na Slici 4.3.7. prikazane su slike fluorescencije širokog polja za ćelije A431 inkubirane sa PrFAP0.5a nanokristalima, u poređenju sa kontrolnim ćelijama bez dodatih nanočestica. Promatrane tačke intenziteta fluorescencije nakon ekscitacije od 405 i 488 nm ukazuju na to da se nanokristali PrFAP0.5a nalaze u ćelijama. Dobijena luminescencija na 488 nm bila je stabilna nekoliko sati, što je omogućavalo celodnevne studije biosnimanja.



Slika 4.3.7. Slike fluorescentne mikroskopije širokog polja A431 ćelija dobijene pod 405 i 488 nm laserskom ekscitacijom (prvi i drugi red) i odgovarajućim transmisionim slikama (treći red) nakon 48h inkubacije sa 240 $\mu\text{g/ml}$ PrFAP0.5a (gore) i kontrolnim ćelijama bez nanokristala (dole) [115].

Na osnovu rezultata dobijenih konfokalnom i mikroskopijom širokog polja može se zaključiti da značajan deo fluorescentnog signala detektovanog u ćelijama inkubiranim sa PrFAP0.5a nanokristalima potiče iz nanočestica. Internalizacija nanočestica je detaljnije ispitivana korišćenjem konfokalnih optičkih preseka. Da bi se potvrdilo da li je fluorescentni PrFAP0.5a nanomaterijal zaista internalizovan od strane ćelija, prikupljeni su i analizirani konfokalni preseki na z-visinama kroz ćelije. Na Slici 4.3.8 (levo) prikazani su pojedinačni preseki kroz ćelije sa separacijom od 2 μm u aksijalnom smeru zajedno sa ortogonalnom projekcijom (desno).



Slika 4.3.8. Analiza internalizacije nanokristala od strane ćelija bazirana na konfokalnim optičkim presecima na odabranim z-visinama (levo) i ortogonalne projekcije na visini od 6 μm (desno) za A431 ćelije inkubirane 48h sa PrFAP0.5a [115].

Optičko sekcionisanje na konfokalnom mikroskopu omogućava detektovanje elipsoidnih zapreminskih elemenata (eng. voxels) veličine oko $500 \text{ nm} \times 500 \text{ nm} \times 1 \mu\text{m}$, zapremine koja je mnogo manja u odnosu na ćelijske ekstenzije i omogućava detektovanje ćelijske unutrašnjosti bez signala sa ćelijskog zida ili ćelijske spoljašnjosti. Rez od 2 μm uzima se od površine μ -slajdove pločice i na slikama se vidi da su nanokristali dispergovani na površini (Slika 4.3.8. levo). Pomerajući fokus prema rezu od 4/6/8/10/12 i 14 μm iznad pločice μ -slajda, posmatrani signal potiče od nanokristala koji su ušli u ćeliju i koji su smešteni unutar citoplazme. Ovo je potvrđeno

odgovarajućim ortogonalnim prikazima poprečnog preseka (predstavljani na slici 4.3.8 desno), gde se može videti da se signal od nanokristala distribuira duž z -aksijalnog smera u ćelijskoj citoplazmi. Nanokristali imaju tendenciju koncentrisanja oko ćelijskog jedra.

Podaci dobijeni ovim *ex vivo* biosnimanjima prate prethodne nalaze usvajanja i internalizacije različitih tipova nanočestica od strane ćelija, koji takođe pokazuju pretežno dostavu nanočestica sfernog oblika u ćelijsku citoplazmu [136]. Dominantni mehanizmi za usvajanje nanočestica od strane ćelije uključuju mehanizme zavisne od endocitoze posredovane receptorima, makropinocitoze i fagocitoze [137].

Sve u svemu, dobijeni rezultati pokazuju da nanokristali PrFAP0.5a mogu da se internalizuju od strane ćelija i da budu detektovani biosnimanjima, iako je intenzitet luminescentnog signala nizak. Ipak, materijal je obećavajući za obeležavanje i praćenje ćelija u *in vitro* i *ex vivo* biosnimanjima tkiva. Talasne dužine ekscitacije i emisije PrFAP0.5a nanokristala široko su dostupne na većini mikroskopskih sistema. Pored toga, emisija od 600 nm predstavlja prednost, jer je izvan zelenog prozora autofluorescencije tkiva, što omogućava niže nivoe signala pozadine. Takođe, imajući u vidu da je Pr poznat po paramagnetnim osobinama, dobijeni PrFAP nanokristali mogu biti potencijalni kontrasti za MRI slikanja [138]. U poređenju sa agentima na bazi Gd, koji se trenutno koriste, visoka biokompatibilnost PrFAP nanokristala je velika prednost [139]. Multimodalna biosnimanja u kombinaciji fluorescentnih i magnetnih modaliteta mogu obezbediti sinergetske prednosti neinvazivne medicinske dijagnostike.

5. Zaključci

U okviru ove doktorske teze sintetisani su novi monofazni luminescentni nanokristali FAP-a dopirani Pr^{3+} jonima metodom ko-precipitacije na sobnoj temperaturi praćene kalcinacijom. Za ova istraživanja pripremljeni su nanoprahovi FAP-a sa 0,1, 0,5 i 1 % atomskih procenata Pr^{3+} jona u baznoj sredini. Nakon sinteze izvršen je termički tretman pripremljenih nanomaterijala na temperaturama od 700 i 1000 °C u cilju pronalaženja optimalnih uslova za dobijanje željenih faza nanokristala sa pogodnim luminescentnim osobinama za bio-medicinske primene u fluorescentnim biosnimanjima. Razvijena je pojednostavljena metoda sinteze za dobijanje novih multifotonskih nanofosfora heksagonalne strukture precipitacijom na sobnoj temperaturi uz kratko vreme termičke aktivacije. Pored temperature, pH vrednosti i čistoće polaznih reaktanata, proces hemijske precipitacije je kontrolisan brzinom mešanja i ukapavanja rastvora, kao i vremenom starenja precipitata.

Karakterizacija dobijenih nanomaterijala izvršena je klasičnim fizičko-hemijskim metodama, u cilju proučavanja strukture, veličine čestica, njihove morfologije i sastava. Rendgenostrukturalna karakterizacija uzoraka je pokazala da su sintetisani materijali čiste heksagonalne faze FAP-a prostorne grupe $P6_3/m$. Porastom koncentracije Pr^{3+} jona kod sintetisanih i aktiviranih uzoraka dolazi do smanjenja veličine kristalita, dok kod kalciniranih dolazi do porasta veličine. Odnos c/a kod svih uzoraka bio je 0,73, osim kod kalciniranog uzorka PrFAP1k kod koga je odnos iznosio 0,74, što govori da je heksagonalna struktura očuvana, ali da u strukturi postoje deformacije usled zamene Ca^{2+} jona Pr^{3+} jonom. FTIR analiza detektovala je frekvencije svih molekularnih vrsta karakterističnih za fluorapatitnu strukturu, kao i nečistoća u vidu karbonatnih i hidroksilnih jona koji se javljaju sa porastom koncentracije Pr^{3+} jona. Takođe, sa porastom

temperature kalcinacije ove nečistoće napuštaju kristalnu rešetku preko procesa dekarbonacije i dehidroksilacije koji su potvrđeni termičkom analizom uzoraka. Odlaskom H₂O i CO₂ iz rešetke FAP-a ostaju O²⁻ joni i vakanse u strukturi. FAR spektri su potvrdili prisustvo Pr³⁺ jona u uzorcima preko formiranja Pr-O interakcija u oblasti između 400-300 cm⁻¹. Joni Pr³⁺ dovode do stabilizacije strukture FAP-a putem formiranja jačih privlačnih sila sa O²⁻ jonima i stvaranja faze oksifluoroapatita.

Morfološke karakteristike, sastav i homogenost distribucije elemenata u dobijenim nanomaterijalima detektovani su metodama elektronske mikroskopije (SEM, FE-SEM) i energetsko-disperzionom spektroskopijom X-zraka (EDX) zajedno sa tehnikom elementarnih mapa. Pokazano je da su sintetisani uzorci sastavljeni od aglomerata nanočestica sfernog oblika i da se joni Pr³⁺ relativno ravnomerno raspoređuju po uzorku. Termičkim tretmanom uzoraka na 1000 °C dolazi do koalescencije čestica i formiranja većih aglomerata, dok su mape elemenata pokazale da dolazi do većeg koncentrisanja Pr³⁺ jona u pojedinim zonama. Tretmanom uzoraka na temperaturi od 700 °C su dobijene čestice dobre disperzije, relativno ujednačene, sferične i visoko aglomerisane. Ispitivanja morfologije i strukture aktiviranih nanokristala na nanometarskom nivou transmisionom elektronskom mikroskopijom (TEM) potvrdila su sferni oblik čestice veličine od oko 20 nm, što je u saglasnosti sa veličinom kristalita koja je dobijena XRD analizom. Mapiranje elemenata sa prostornom raspodelom urađeno EDX metodom pokazalo je da su joni Pr³⁺ raspoređeni uniformno po kristalima. Rezultati DLS analize aktiviranih čestica potvrdili su hidrodinamičku veličinu kristala na nanometarskom nivou između 58 i 106 nm, ali i prisustvo agregata. Određeni stepen agregacije ukazuje na nisku stabilnost suspenzija, što su i potvrdile blago negativne vrednosti zeta-potencijala u rasponu od -5 do -10 mV. Na osnovu dobijenih eksperimentalnih vrednosti za zeta-potencijal i veličinu čestica aktiviranih nanokristala, utvrđeno je da su pogodni za *in vitro* studije i da će ih ćelije internalizovati.

Luminescentne karakteristike dobijenih uzoraka su proučavane fluorescentnom spektroskopijom u kombinaciji sa multivarijacionom analizom spektara. Luminescentne osobine dopiranih nanočestica, ali i krajnje funkcionalne karakteristike suštinski zavise od kristaličnosti, koncentracije jona aktivatora, kao i od stehiometrije jedinjenja i eventualnog prisustva drugih jonskih vrsta. Kada su u pitanju nanočestice ne treba zanemariti ni efekat koji imaju veličina i oblik na luminescenciju.

Sintetisane slabokristalne aglomerisane nanočestice nepravilnog sfernog oblika pokazuju jaku samo-luminescenciju kristalne rešetkene širokog opsega od 390-500 nm sa dodatnim re-

apsorpcionim prelazima od strane Pr^{3+} jona ($^3\text{P}_2\text{--}^3\text{H}_4$, $^3\text{P}_1\text{--}^3\text{H}_4$, $^1\text{I}_6$ i $^3\text{P}_0\text{--}^3\text{H}_4$). U ovom slučaju joni Pr^{3+} se ponašaju kao apsorberi luminescencije domaćina, što bi trebalo da dovede do re-emisije apsorbovane luminescencije. Odsustvo dodatnih emisivnih Pr^{3+} prelaza je posledica prisustva nečistoća u kristalnoj rešetki u vidu CO_3^{2-} jona i zaostale vode. Joni CO_3^{2-} i molekuli H_2O povećavaju fononsku energiju kristalne rešetke i zadržavaju energetske prelaze u Pr^{3+} jonima.

Aktivacijom sintetisanih nanoprahova na $700\text{ }^\circ\text{C}$ dobijene su nanočestice sfernog oblika i dobre disperzije, kod kojih je veličina kristalita bliska veličini nanočestice kristala. Ovakav profil kristalne matrice podržava emisivne $4f^2 \rightarrow 4f^2$ prelaze u Pr^{3+} jonu. Kod aktiviranih nanokristala na $700\text{ }^\circ\text{C}$ pokazano je istovremeno prisustvo pored fluoridnih i hidroksilnih jona unutar kristalne rešetke, što dovodi do smanjene difuzije i na taj način do smanjenog zgušnjavanja i rasta zrna tokom kalcinacije. Porast koncentracija OH^- jona u kristalnoj rešetki, dovodi do smanjenja intenziteta luminescencije kristalnog matriksa, ali i do gašenja luminescencije Pr^{3+} jona. Ukoliko su OH^- joni na površini kristala, onda se mogu ponašati i kao akceptori ekscitacije i da tako gase luminescenciju potpuno. Tokom kalcinacije na $700\text{ }^\circ\text{C}$ ne dolazi do fazne transformacije, osim što molekuli H_2O i CO_2 napuštaju strukturu.

Kalcinacijom uzoraka do $1000\text{ }^\circ\text{C}$ dolazi do procesa dekarbonacije i dehidroksilacije bez razgradnje osnovne kristalne strukture, što je praćeno koalescencijom čestica i stvaranjem većih aglomerata. U kristalnoj strukturi nastaju vakanse na mesto OH^- i CO_3^{2-} jona i formiraju se O^{2-} joni, radi očuvanja neutralnosti rešetke. Prisustvo vakansi u kristalnoj rešetki nestehiometrijskog materijala, zadržava emisiju dopanta i smanjuje intenzitet emisije domaćina. Elektronski prelaz u Pr^{3+} jonu može biti ometen bilo jonom nečistoće kao što je O^{2-} ili strukturnim deformacijama, što može rezultirati suzbijanjem emisije. Potpuno gašenje luminescencije u dopiranom FAP sistemu nastaje zbog postojanja centra za hvatanje ekscitacije na površini čestica (OH^- akceptori) ili zbog narušene simetrije luminescentnog centra u kristalnoj rešetki FAP-a.

Kako bi se razjasnile strukturne promene nastale dopiranjem Pr^{3+} jona u FAP strukturu, i povezale sa luminescentnim karakteristikama, urađeni su kvantno-hemijski proračuni i izvedena teorijska objašnjenja. Na osnovu teorijske analize, predviđanje strukturnih promena kvantno-hemijskim proračunima, zamena Ca^{2+} jona Pr^{3+} jonima dovodi do deformacije u strukturi dopiranog fluorapatita. Ove promene su praćene povećanjem rastojanja M-O i odstupanjem F^- jona od ravni koju formiraju joni metala. Povećavanjem koncentracije jona Pr^{3+} povećava se količina OH^- jona, što je praćeno prenošenjem protona iz OH^- grupa u PO_4^{2-} grupu (stvaraju se HPO_4^{2-} joni). Na ovaj način se povećava negativan naboj (OH^- grupa je naelektrisana -1, a O jon -2), a samim tim i

elektrostatička sila između Pr i O atoma, što dodatno stabilizuje strukturu. Sveukupno, na osnovu izvršene strukturne analize, pretpostavljeni mehanizam supstitucije je jedan Pr^{3+} jon za jedan Ca^{2+} , s delimičnom supstitucijom anjona F^- sa O^{2-} i OH^- i stvaranjem vakansi usled postizanja neutralnosti sistema. Povećanje koncentracije Pr^{3+} u FAP-u, praćeno pojavom OH^- , O^{2-} i vakansi, dovodi do gašenja luminescence.

Proliferacija dve ćelijske linije kancera A549 i A431, inkubirane različitim koncentracijama aktiviranih nanokristala FAPa i PrFAPa tokom 72 h, procenjena je korišćenjem *Resazurin* testa vijabilnosti (preživljavanja) ćelija. Sve eksperimentalne grupe ćelija sa nanokristalima pokazale su preživljavanje uporedivo sa kontrolnom grupom samo sa ćelijama. Ovaj rezultat ukazuje na očiglednu necitotoksičnost PrFAPa nanokristala u testiranim uslovima, što omogućava dalje studije biosnimanja živih ćelija. Posmatranje morfologije ćelija izvršeno je na optičkom mikroskopu pre i posle inkubacije od 72 h sa nanokristalima. U oba slučaja se vidi da su sve ćelije zadržale normalnu morfologiju. Analiza biokompatibilnosti i rezultati ispitivanja morfologije ćelija ukazuju na to da su nanokristali PrFAPa sa različitim količinama dopiranih Pr^{3+} jona biokompatibilni i netoksični za žive ćelije, stoga su obećavajući kandidati za biološku upotrebu. Test hemolize eritrocita je urađen u cilju utvrđivanja hemokompatibilnosti dobijenih luminescentnih nanočestica. Stepem hemolize indukovano nanočesticama FAPa i Pr^{3+} dopiranim FAPa je bio između 3,5 i 10%. Čisti uzorak FAPa pokazao je najniži nivo hemolize. Povećanje sadržaja Pr^{3+} u aktiviranim PrFAPa uzorcima uzrokovao je povećanje stepena hemolize, što je u korelaciji i sa smanjenjem veličine čestica. Ovo blago hemolitičko ponašanje uzoraka može biti posledica mehaničkog stresa membrana ćelija krvi u interakciji sa nanočesticama, kao i efekta toksičnosti rastvorenih Pr^{3+} jona iz FAP rešetke.

Pomoću fluorescentne konfokalne mikroskopija i mikroskopije širokog polja, nakon inkubacije nanokristala sa ćelijama kancera od 48 h, ispitan je njihov unos u ćelije, kao i luminescencija nanokristala unutar ćelija. Kada su ekscitovani talasnom dužinom od 488 nm, dopirani PrFAPa kristali pokazuju jedan dominantan maksimum fluorescentne emisije na oko 600 nm, povezan sa prelazom $^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{H}_4$ Pr^{3+} jona i praćenim drugim prelazima $^3\text{P}_0 \rightarrow ^3\text{H}_5$, $^3\text{P}_0 \rightarrow ^3\text{H}_6$ i $^3\text{P}_0 \rightarrow ^3\text{F}_2$. Studije dobijenih slika konfokalnom mikroskopijom u plavom, zelenom i crvenom kanalu su otkrile da nanokristali mogu da prepoznaju ćelijsku površinu i da se lepe za nju, ali nisu potvrdile ulazak nanokristala u ćelije. Delimičnim uklanjanjem autofluorescencije izvršena je separacija luminescencije kvalitativno i kvantitativno u zelenom i crvenom kanalu. Potpuno uklanjanje autofluorescencije je izvršeno mikroskopijom širokog polja, i potvrđeno da luminescentni signal od nanokristala dopire iz unutrašnjosti ćelija.

Rezonantna ekscitacija od 488 nm pobuđuje samo elektrone od $^3\text{H}_4$ do $^3\text{P}_0$ i praćena je brzim neradijativnim relaksacijama do metastabilnih stanja $^1\text{D}_2$. S obzirom na to da prelaz ($^3\text{P}_0 \rightarrow ^3\text{H}_4$) leži isto na 488 nm kao i ekscitacija, emisija mođe da se opusti samo od $^1\text{D}_2$ do $^3\text{H}_4$. Kao posledica toga, emisija pri 600 nm ($^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{H}_4$) je najvećeg inteziteta. Zahvaljujući rezonantnoj ekscitaciji od 488 nm, izolovana je luminescencija od 600 nm koja potiče od nanokristala u konfokalnim ravnima kroz unitrašnjost ćelije.

Sveukupno, rezultati snimanja fluorescentnom mikroskopijom širokog polja i konfokalnom detektuju signal luminescencije iz ćelija, potvrđujući da su nanokristali ušli u ćelije i da su raspoređeni u citoplazmi. Kao kontrastno sredstvo u biosnimanjima, intenzitet nanokristala treba povećati da bi se postigla laka detekcija pogodna za ulazak u translacijska bio-medicinska istraživanja i/ili kliničke primene. Kako je sintetisani materijal obećavajući, moglo bi se pojaviti nekoliko potencijalnih upotreba ovih nanoćestica, uključujući detekcije, praćenje, isporuku lekova i terapije povezane sa kancerom i bolestima mišićno-koštanog sistema.

6. Literatura

- [1] M. Gaft, R. Reisfeld, G. Panczer (Ed.), *Modern Luminescence Spectroscopy of Minerals and Materials*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005.
- [2] S. S. Syamchand, G. Sony, Fluorescein-labeled fluoroapatite nanocrystals codoped with Yb(III) and Ho(III) for trimodal (downconversion, upconversion and magnetic resonance) imaging of cancer cells, *Microchim. Acta.* 183(12) (2016) 3209–3219.
- [3] X. Li, J. Zhu, Z. Man, Y. Ao, H. Chen, Investigation on the structure and upconversion fluorescence of Yb³⁺/Ho³⁺ co-doped fluorapatite crystals for potential biomedical applications *Sci. Rep.* 4(1) (2015).
- [4] X. Hu, J. Zhu, X. Li, X. Zhang, Q. Meng, L. Yuan, J. Zhang, X. Fu, X. Duan, H. Chen, Y. Ao, Dextran-coated fluorapatite crystals doped with Yb³⁺/Ho³⁺ for labeling and tracking chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo, *Biomaterials.* 52 (2015) 441–451.
- [5] Y. Xie, Y. Xie, W. He, F. Li, T. S. H. Perera, L. Gan, Y. Han, X. Wang, S. Li, H. Dai, Luminescence Enhanced Eu³⁺/Gd³⁺ Co-Doped Hydroxyapatite Nanocrystals as Imaging Agents In Vitro and In Vivo, *ACS App. Mater. Inter.* 8(16) (2016) 10212–10219.
- [6] J. Liu, T. Jin, S. Chang, A. Czajka-Jakubowska, Z. Zhang, J. E. Nö, B. H. Clarkson, The Effect

of Novel Fluorapatite Surfaces on Osteoblast-Like Cell Adhesion, Growth, and Mineralization, *Tissue. Eng.: Part A.* 16(9) (2010) 2977.

[7] K. Tanimoto, T. Le, L. Zhu, J. Chen, J.D.B. Featherstone, W. Li, P. D. Besten, Effects of Fluoride on the Interactions between Amelogenin and Apatite Crystals, *J. Dent. Res.* 87(1) (2008) 39–44.

[8] B. Basu, S. Ghosh, *Biomaterials for Musculoskeletal Regeneration*; Springer: Bangalore, India, 2017; ISBN 9789811030581.

[9] J. Xu, X. Shen, L. Jia, Z. Xu, T. Zhou, X. Li, T. Ma, H. Li, Y. Wang, T. Zhu, Facile synthesis of folic acid-conjugated fluorapatite nanocrystals for targeted cancer cell fluorescence imaging, *Mater. Lett.* 203 (2017) 37–41.

[10] H. F. Zeng, M. Y. Sun, S. F. Wu, H. F. Chen, Synthesis of Europium-doped Fluorapatite Nanorods and Their Multifunctional Biomedical Applications, *Molecules.* 22 (2017) 753.

[11] D. K. Chatterjee, A. J. Rufaihah, Y. Zhang, Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals, *Biomaterials* 29 (2008) 937–943.

[12] H. Peng, C. Lin, *Nanomaterials for Cancer Diagnosis and Therapy*, *Journal of Nanomaterials*, Volume 2010, Article ID 592901, 1 page.

[13] T. Zako, H. Hyodo, K. Tsuji, K. Tokuzen, H. Kishimoto, M. Ito, K. Kaneko, M. Maeda, K. Soga, Development of Near Infrared-Fluorescent Nanophosphors and Applications for Cancer Diagnosis and Therapy, *Journal of Nanomaterials*, Volume 2010, Article ID 491471, 7 pages.

[14] S. Parvanian, S. M. Mostafavi, M. Aghashiri, Multifunctional nanoparticle developments in cancer diagnosis and treatment, *Sensing and Bio-Sensing Research* 13 (2017) 81–87.

[15] P.-H. Wu, A. E. Opadele, Y. Onodera, J.-M. Nam, Targeting Integrins in Cancer Nanomedicine: Applications in Cancer Diagnosis and Therapy, *Cancers* 11 (2019) 1783.

[16] C. Martinelli, C. Pucci, G. Ciofani, Nanostructured carriers as innovative tools for cancer diagnosis and therapy, *APL Bioeng.* 3 (2019) 011502.

[17] S. Karthi, G. S. Kumar, G. A. Kumar, D. K. Sardar, S. Chidangil, E. K. Girija, Microwave

assisted synthesis and characterizations of near infrared emitting Yb/Er doped fluorapatite nanoparticles, *J. Alloys Compd.* 689 (2016) 525-532.

[18] D. K. Sardar, F. S. Salinas, R. M. Yow, Stark effects on the spectra of trivalent praseodymium ions in strontium fluorapatite laser host, *J. Appl. Phys.* 88(8) (2000) 4688.

[19] S. Singh, O. Pandey, S. Sengupta, Microwave assisted synthesis, spectroscopy and biochemical aspects of lanthanum (III) and praseodymium (III) complexes with oxadiazole functionalised dithiocarbazates, *J. Rare Earth.* 27(5) (2009) 698–704.

[20] F. Feyerabend, J. Fischer, J. Holtz, F. Witte, R. Willumeit, H. Drücker, C. Vogt, N. Hort, Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines, *Acta. Biomater.* 6(5) (2010) 1834–1842.

[21] Y. Liu, S. Tian, S. Liu, E. Wang, In vitro inhibitory effect of polyoxometalates on human tumor cells, *Transit. Metal. Chem.* 30(1) (2005) 113–117.

[22] Y. J. Ji, B. Xiao, Z. H. Wang, M. Z. Cui, Y. Y. Lu, The suppression effect of light rare earth elements on proliferation of two cancer cell lines, *Biomed Environ Sci.* 13 (2000) 287–92.

[23] M. Theiszova, S. Jantova, S. Letasiova, M. Palou, L. Cipak, Cytotoxicity of hydroxyapatite, fluorapatite and fluor–hydroxyapatite: a comparative in vitro study, *Neoplasma.* 55(4) (2008) 312–316.

[24] M. Gaft, R. Reisfeld, G. Panczer, E. Uspensky, B. Varrel, G. Boulon, Luminescence of Pr³⁺ in minerals, *Opt. Mater.* 13 (1999) 71–79.

[25] J. Yang, L. Shen, E.Y. Bun Pun, H. Lin, Superiority of shortwave transparent glasses with moderate phonon energy in achieving effective radiations from ¹D₂ level of Pr³⁺, *J. Lumin.* 213 (2019) 51–60.

[26] D. K. Sardara, C. C. Russell, Optical transitions, absorption intensities, and intermanifold emission cross sections of Pr³⁺(4f²) in Ca₅(PO₄)₃F crystal host, *J. Appl. Phys.*, 95(10) (2004) 5334–5339.

[27] C. S. Ciobanu, S. L. Iconaru, F. Massuyeau, L. V. Constantin, A. Costescu, D. Predoi,

Synthesis, Structure, and Luminescent Properties of Europium-Doped Hydroxyapatite Nanocrystalline Powders, *Journal of Nanomaterials*, *J. Nanomater.* Vol. 2012, Article ID 942801, page 9.

[28] C. Zhang, J. Lin, Defect-related luminescent materials: synthesis, emission properties and applications, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 7938–7961.

[29] Y. Sun, H. Yang, D. Tao, Preparation and characterization of Eu^{3+} -doped fluorapatite nanoparticles by a hydrothermal method, *Ceram. Int.* 38 (2012) 6937–6941.

[30] L. Zhang, Z. Fu, Z. Wu, Y. Wang, X. Fu, T. Cui, Investigation of structural and luminescent properties of $\text{Ce}^{3+}/\text{Mn}^{2+}$ ions-doped $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, *Mater. Res. Bull.* 56 (2014) 65–70.

[31] X. Yan, Z. Fu, X. Wang, J. H. Jeong, Hydrothermal synthesis and luminescence properties of $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}:\text{Eu}^{3+}$ microrods, *J. Lumin.* 152 (2014) 226–229.

[32] A. Doat, F. Pellé, N. Gardant, A. Lebugle, Synthesis of luminescent bioapatite nanoparticles for utilization as a biological probe, *J. Solid State Chem.* 177 (2004) 1179–1187.

[33] S. Karthi, G. A. Kumar, D. K. Sardar, C. Santhosh, E. K. Girija, Synthesis and characterization of $\text{Nd}^{3+}:\text{Yb}^{3+}$ co-doped near infrared sensitive fluorapatite nanoparticles as a bioimaging probe, *Opt. Mater.* 77 (2018) 39–47.

[34] X. Zheng, M. Liu, J. Hui, D. Fan, H. Ma, X. Zhang, Y. Wang, Y. Wei, Ln^{3+} -doped hydroxyapatite nanocrystals: controllable synthesis and cell imaging, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 20301.

[35] P. Sobierajska, K. Zawisza, R. M. Kowalski, G. Renaudin, J.-M. Nedelec, J. Zienkiewicz, R. J. Wiglusz, Preparation of up-converting nano-biphasic calcium phosphate, *RSC Adv.* 7 (2017) 30086–30095.

[36] J. Hui, X. Zhang, Z. Zhang, S. Wang, L. Tao, Y. Wei, X. Wang, Fluoridated $\text{HAp}:\text{Ln}^{3+}$ (Ln 1/4 Eu or Tb) nanoparticles for cell-imaging, *Nanoscale.* 4 (2012) 6967.

[37] A. R. Kitai (Ed.), *Solid State Luminescence Theory, materials and devices*, Springer Science, 1993.

- [38] A. R. Kitai (Ed.), *Luminescent Materials and Applications*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- [39] L. Bergman, J. L. McHale (Ed.), *Handbook of Luminescent Semiconductor Materials*, Taylor & Francis Group, LLC, 2012.
- [40] M. E. Fleet, Y. Pan, Site preference of rare earth elements in fluorapatite, *American Mineralogist*, 80 (1995) 329-335.
- [41] M. Xie, R. Pan, Photoluminescence and $Ce^{3+} \rightarrow Tb^{3+}$ energy transfer in fluoro-apatite host $Ca_6La_2Na_2(PO_4)_6F_2$, *Opt. Mater.* 35 (2013) 1162–1166
- [42] P. D. Bhojar, S. J. Dhoble, Analysis of electron–vibrational interaction in interconfigurational $5d \rightarrow 4f$ transition of Eu^{2+} ions in $Na_5Ca_4(PO_4)_4F$, *Luminescence*, 31 (2016) 1414–1418.
- [43] Y. Liu, C. Yu, W. Zhang, J. Li, B. Peng, W. Wei, Synthesis and properties of Eu^{3+} -doped strontium fluoroapatite nanocrystals by low-temperature hydrothermal method, *Optoelectronics and advanced materials – Rapid Communications V*, 4 (2010) 445 – 448.
- [44] V. Stanić, S. Dimitrijević, D. G. Antonović, B. M. Jokić, S. P. Zec, S. T. Tanasković, S. Raičević, Synthesis of fluorine substituted hydroxyapatite nanopowders and application of the central composite design for determination of its antimicrobial effects, *Appl. Surf. Sci.* 290 (2014) 346–352.
- [45] V. Stanić, A. S. Radosavljević-Mihajlović, V. Zivković-Radovanović, B. Nastasijević, M. Marinović-Cincović, J. P. Marković, M. D. Budimir, Synthesis, structural characterisation and antibacterial activity of Ag^+ -doped fluorapatite nanomaterials prepared by neutralization method, *Appl. Surf. Sci.* 337 (2015) 72–80.
- [46] I. Z. Dinić, *Sinteza i karakterizacija biokompatibilnih optički aktivnih fluorida retkih zemalja*, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, 2018.
- [47] F. Vetrone, R. Naccache, V. Mahalingam, C.G. Morgan, J.A. Capobianco, The Active-Core/Active-Shell Approach: A Strategy to Enhance the Upconversion Luminescence in Lanthanide-Doped Nanoparticles, *Adv. Funct. Mater.* 19 (18) (2009) 2924-2929.
- [48] X. Li, Rare-earth doped apatite nanocrystals for cell and implanted biomaterial tracking,

Doctoral dissertation, Peking University, 2016.

[49] J.M. Hughes, J. Rakovan, The crystal structure of apatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F},\text{OH},\text{Cl})$. *Phosphates: Geochemical, Geobiological, and Materials Importance*, 48 (2002) 1–12.

[50] Lj. Veselinović, Redgenska analiza nanostrukturnih prahova kalcijum fosfata dobijenih novim postupcima sinteze, Magistarska teza, Univerzitet u Beogradu, Rudarsko-geološki fakultet, 2010.

[51] L. Calderi, M. J. Stot, A. Rubio, Electronic and crystallographic structure of apatites, *Phys. Rev. B* 67 (2003) 134106.

[52] J.M. Hughes, M. Cameron, K.D. Crowley, Crystal structures of ternary apatites: Solid solution in the $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$ (X= F, OH, Cl) system. *Am. Miner.* 75 (1990) 295-304.

[53] J.M. Hughes, M. Cameron, K.D. Crowley, Structural variations in natural F, OH, and Cl apatites. *Am. Miner.* 74 (1989) 870-876.

[54] N. Leroy, E. Bres, Structure and substitutions in fluorapatite, *Eur. Cell. Mater.* 2 (2001) 36-48

[55] J. M. Hughes, Hanna Nekvasil, Gokce Ustunisik, Donald H. Lindsley, Aron E. Coraor, John Vaughn, Brian L. Phillips, Francis M. McCubbin, William R. Woerner, Solid solution in the fluorapatite-chlorapatite binary system: High-precision crystal structure refinements of synthetic F-Cl apatite, *Am. Miner.* 99 (2014) 369–376.

[56] Y. Pan, M. E. Fleet, Compositions of the Apatite-Group Minerals: Substitution Mechanisms and Controlling Factors, *Rev. Mineral. Geochem.* 48 (1) (2002) 13-49.

[57] A. E. W. Miles, *Structural and Chemical Organization of Teeth*, Academic press New York and London, 1967.

[58] E.R. Kreidler, F.A. Hummel, The crystal chemistry of apatite: structure fields of fluor- and chlorapatite. *Am. Miner.* 55 (1970) 170-184.

[59] J. C. Elliott, *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, Elsevire Science B.V., AE Amsterdam, 1994.

[60] J.M. Hughes, M. Cameron, K.D. Crowley, Ordering of divalent cations in the apatite structure : Crystal structure refinements of natural Mn- and Sr-bearing apatite. *Am. Miner.* 76 (1991) 1857-

1862.

- [61] M. Miyake, K. Ishigaki, T. Suzuki, Structure refinements of Pb^{2+} ion-exchanged apatites by X-ray powder pattern-fitting, *J. Solid State Chem.* 61 (1986) 230-235.
- [62] A. Nounah, J.L. Lacout, Localization of cadmium containing hydroxy- and fluorapatites. *J Al Com.* 188 (1992) 141-146.
- [63] B.G. DeBoer, A. Sakthivel, J.R. Cagle, R.A. Young, Determination of the Antimony Substitution Site in Calcium Fluorapatite from Powder X-ray Diffraction Data, *Acta. Cryst. B* 47 (1991) 683-692.
- [64] P.E. Mackie, R.A. Young, Location of Nd dopant in Fluorapatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}:\text{Nd}$, *J. Appl. Cryst.* 6 (1973) 26-31.
- [65] M. E. Fleet, Y. Pan, Site preference of rare earth elements in fluorapatite, *Am. Miner.* 80 (1995) 329-335.
- [66] R. Shaoo, S.K. Bhattacharya, R. Debnath, A new type of charge compensating mechanism in $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}:\text{Eu}^{3+}$ phosphor, *J. Solid State Chem.* 175 (2003) 218-225.
- [67] M. Karbowskiak, S. Hubert, Site-selective emission spectra of $\text{Eu}^{3+}:\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, *J. Alloys Compd.* 302 (2000) 87-93.
- [68] H. Madupalli, B. Pavan, M.M.J. Tecklenburg, Carbonate substitution in the mineral component of bone: Discriminating the structural changes, simultaneously imposed by carbonate in A and B sites of apatite, *J. Solid State Chem.* 255 (2017) 27-35.
- [69] D. R. Mutavdžić, Primena multivarijacione analize u spektroskopskim podacima, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Veće za studije pri Univerzitetu, Beograd 2016.
- [70] V. R. Đorđević, Sinteza i optička karakterizacija sistema $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Y}_2\text{O}_3$ dopiranog jonima europijuma i samarijuma, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd 2014.
- [71] P. D. Rack, P. H. Holloway, The structure, device, physics, and material properties of thin film electroluminescent displays, *Mater. Sci. Eng.* R21 (1998) 171-219

- [72] <http://en.wikipedia.org/wiki/Praseodymium>
- [73] D. R. Lide (ed.) CRC Handbook of Chemistry and Physics (86th), Boca Raton (FL) CRC Press, 2005.
- [74] A. Jha, M Naftaly, S. Jordery, B.N. Samson, Design and Fabrication of Pr³⁺ doped fluoride glass optical fibres for efficient 1.3 μ m amplifiers, Pure Appl. Optic 4(4) (1995) 417.
- [75] H.-H. Wang, Y.-F. Fan, R. Wang, L. Wang, D.-M. Du, Z.-H. Kang, Y. Jiang, J.-H. Wu, J.-Y. Gao, Slowing and storage of double light pulses in a Pr³⁺:Y₂SiO₅ crystal, Opt. Lett. 34 (2009) 2596
- [76] B.D. Cullity, C.D. Graham, Introduction to Magnetic Material, John Wiley Sons, 2011.
- [77] Y. Chen, J. Wang, C. Liu, J. Tang, X. Kuang, M. Wu, Q. Su, UV-Vis-NIR luminescence properties and energy transfer mechanism of LiSrPO₄:Eu²⁺, Pr³⁺ suitable for solar spectral convertor, Opt. Express. 21 (2013) 3161–9.
- [78] D.A. Wanskey, W.G.Moulton, Energy levels of Pr³⁺ in various crystal host, J. Chem.Phys. 53 (1970) 3957.
- [79] A. Pol, T. R. M. Barends, A. Dietl, A. F. Khadem, J. Eygensteyn, M. S. M. Jetten, O. D. Camp, J. M. Huub, Rare earth metals are essential for methanotrophic life in volcanic mudpots, Environ. Microbiol. 16 (1) (2013) 255–64.
- [80] C. Bouzigues, T. Gacoin, A. Alexandrou, Biological Applications of Rare Earth Based Nanoparticles, ASC Nano, 5(11) (2011) 8488-8505.
- [81] V.V. Srdić, Procesiranje novih keramičkih materijala, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki Fakultet, Novi Sad, 2004.
- [82] www.en.wikipedia.org/Czochralski method
- [83] V. Stanić, Ispitivanje antimikrobnih aktivnosti materijala na bazi kalcijum hidroksiapatita, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd 2011.
- [84] M. Sadat-Shojai, M.-T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite in diverse structures, Acta Biomater. 9 (2013)7591-7621.
- [85] Miodrag J. Lukić, Dvostepeno sinterovanje, fazne transformacije, električne i mehaničke

osobine nanostrukturnih biokeramičkih materijala na bazi hidroksiapatita, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd 2014.

[86] A.D. Becke, A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 1372.

[87] S. Armaković, Modelovanje i analiza fundamentalnih svojstava sumanema, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, 2014.

[88] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, Peralta Jr., J.E.F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N.J. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

[89] S.F. Boys, F. Bernardi, The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors, *Mol. Phys.* 9 (4) (1970) 1553–1566.

[90] G. Janjić, D. Milojkov, V. Stanić, Model systems for fluorescence of fluorapatite based on crystallographic and quantum-chemical data, 23rd Conference of the Serbian Crystallographic Society, Book of Abstracts, (2016) 96-97.

[91] Y. Zhang, Q.S. Yin, H.F. Zhao, J. Li, Y.T. Wei, F.Z. Cui, H.Y. Huang, Antibacterial and biological properties of silver-loaded coralline hydroxyapatite, *Front. Mater. Sci. China* 4 (2010) 359–365.

[92] M.J. Parnham, H. Wetzig, Toxicity screening of liposomes, *Chem. Phys. Lipids*, 64 (1993) 263-274.

[93] V. Stanić, Dj. Janačković, S. Dimitrijević, S. B. Tanasković, M. Mitrić, M. S. Pavlović, A. Krstić, D. Jovanović, S. Raičević, Synthesis of antimicrobial monophase silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering, *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 4510–4518.

[94] S.N. Rampersad, Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays, *Sensors* 12 (12) (2012) 12347–12360.

[95] www.2.irb.hr/korisnici/iweber/fluovis/konfokalna.htm (12.18.2019.)

[96] <https://ibidi.com/chambered-coverslips/13--slide-8-well-ibitreat.html>

- [97] https://www.nikon.com/news/2013/1111_tilapp_01.htm
- [98] <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/confocal-microscopes.html>
- [99] A. T. Saenger, W. F. Kuhs, Structural disorder in hydroxyapatite, *Zeitschrift fuer Kristallographie* 199 (1992) 123–148.
- [100] R. D. Shannon, Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides, *Acta Cryst. A* 32 (1976) 751–767.
- [101] C. S. Ciobanu, C. L. Popa, D. Predoi, Cerium-doped hydroxyapatite nanoparticles synthesized by the co-precipitation method, *J. Serb. Chem. Soc.* 81 (4) (2016) 433–446.
- [102] J. Zhaoa, X. Donga, M. Biana, J. Zhaoa, Y. Zhanga, Y. Suna, J. Chena, X. Wang, Solution combustion method for synthesis of nanostructured hydroxyapatite, fluorapatite and chlorapatite, *Appl. Surf. Sci.* 314 (2014) 1026–1033
- [103] P. Rrcxrm, A. C. Lasaga R. A. Berner, O. H. Han, K. W. Zilm, Mechanism of CO₃-substitution in carbonate-fluorapatite: Evidence from FTIR spectroscopy, ¹³C NMR, and quantum mechanical calculations, *Am. Mineral.* 79 (1994) 809–818.
- [104] I. R. Gibson, W. Bonfield, Novel Synthesis and characterization of an AB-type carbonate-supstituted hydroxyapatite, *J. Biomed. Mater. Res.* 59 (2002) 697–708
- [105] M. Prekrajski, M. Mirkovic, B. Todorovic, A Matkovic, M. Marinovic-Cinovic, J. Lukovic, B. Matovic, Ouzo effect–New simple nanoemulsion method for synthesis of strontium hydroxyapatite nanospheres, *J. Eur. Ceram. Soc.* 36 (2016) 1293–1298.
- [106] P. Sobieraj, R. Pazik, K. Zawisza, G. Renaudin, J.-M. Nedelec, R. J. Wiglusz, Effect of lithium substitution on the charge compensation, structural and luminescence properties of nanocrystalline Ca₁₀(PO₄)₆F₂ activated with Eu³⁺ ions, *CrystEngComm.* 18 (2016) 3447–3455.
- [107] Z. Stojanović, S. Marković, D. Uskoković, Merenje raspodele velicina čestica metodom difrakcije laserske svetlosti, *Novi Materijali* 19 (2010) 5.
- [108] P. Arenas-Guerrero, Á. V. Delgado, K. J. Donovan, K. Scott, T. Bellini, F. Mantegazza, M. L. Jiménez, Determination of the size distribution of non-spherical nanoparticles by electric birefringence-based methods, *Sci. Rep.* 8 (2018) 9502.
- [109] Y. Li, Y. Chang, Y. Lin, Y. Chang, Y. Lin, Luminescent properties of trivalent praseodymium-doped lanthanum aluminum germanate LaAlGe₂O₇, *J. Phys. Chem. Solids*, 68 (2007) 1940–1945.
- [110] M. Gaft, R. G. Panczer, S. Shoval, C. Garapon, G. Boulon, W. Streck, Luminescence of Eu(III), Pr(III) and Sm(III) in carbonate-fluor-apatite, *Acta Phys. Pol. A* 90 (1996) 267–274.
- [111] R. Reisfeld, Spectra and energy transfer of rare earths in inorganic glasses, *Struct. Bond.* 13 (1973) 53–98.
- [112] K. Tonsuaadu, K. Agris Gross, L. Pluduma, M. Veiderma, A review on the thermal stability of calcium apatites, *J. Therm. Anal. Calorim.* 110 (2012) 647–659.

- [113] J. P. Lafon, E. Champion, D. Bernache-Assollant, R. Gibert, A.M. Danna, Thermal decomposition of carbonated calcium phosphate apatites, *J. Therm. Anal. Calorim.* 72(3) (2003) 1127–1134.
- [114] A. Serret, M. V. Cabañas, M. Vallet-Regí, Stabilization of Calcium Oxyapatites with Lanthanum(III)-Created Anionic Vacancies, *Chem. Mater.* 12 (2000) 3836–3841.
- [115] D. V. Milojkov, O. F. Silvestre, V. Dj. Stanić, G. V. Janjić, D. R. Mutavdžić, M. Milanović, J. B. Nieder, Fabrication and characterization of luminescent Pr³⁺ doped fluorapatite nanocrystals as bioimaging contrast agents, *J. Lumin.* 217 (2020) 116757.
- [116] I. S. El-Jallad, A.-Z. M. Abouzeid, H. A. El-Sinbawi, Calcination of phosphates Reactivity of calcined phosphate, *Powder Technology*, 26 (1980) 187-197.
- [117] M. Veiderma, R. Knubovets, K. Tonsuaadu, Structural properties of apatites from Finland studied by FTIR spectroscopy, *Bulletin of the Geological Society of Finland*, 70 (1998) 69-75.
- [118] Y. Huang, G. Song, X. Chang, Z. Wang, X. Zhang, S. Han, Z. Su, H. Yang, D. Yang, X. Zhang, Nanostructured Ag⁺-substituted fluorhydroxyapatite-TiO₂ coatings for enhanced bactericidal effects and osteoinductivity of Ti for biomedical applications, *Int. J. Nanomed.* 13 (2018) 2665–2684.
- [119] E. M. Zahrani, M. H. Fathi, The effect of high-energy ball milling parameters on the preparation and characterization of fluorapatite nanocrystalline powder, *Ceram. Int.* 35 (2009) 2311–2323. doi:10.1016/j.ceramint.2009.01.012
- [120] G. A. Waychunas, Apatite Luminescence, *Rev. Mineral Geochem.* 48 (2002) 701-742.
- [121] N. L. Ignjatović, L. Mančić, M. Vuković, Z. Stojanović, M. G. Nikolić, S. Škapin, S. Jovanović, Lj. Veselinović, V. Uskoković, S. Lazić, S. Marković, M. M. Lazarević, D. P. Uskoković, Rare-earth (Gd³⁺, Yb³⁺/Tm³⁺, Eu³⁺) co-doped hydroxyapatite as magnetic, up-conversion and down-conversion materials for multimodal imaging, *Sci. Rep.* 9 (2019) 16305.
- [122] M. E. Fleet, Y. Pan, Site preference of rare earth elements in fluorapatite: Binary (LREE+HREE)-substituted crystals, *Am. Mineral.* 82 (1997) 870–877.
- [123] J. M. Hughes, M. Cameron, K. D. Crowley, Structural variations in natural F, OH, and Cl apatites Locality: Durango Mexico, *Am. Mineral.* 74 (1989) 870-876.
- [124] T. Guo, Y. Li, G. Cao, Z. Zhang, S. Chang, A. Czajka-Jakubowska, J.E. Nör, B.H. Clarkson and J. Liu, Fluorapatite-modified scaffold on Dental pulp stem cell Mineralization, *J. Dent. Res.* 93 (2014) 1290–1295.
- [125] K. Cheng, W. Weng, H. Wang, S. Zhang, In vitro behavior of osteoblast-like cells on fluoridated hydroxyapatite coatings, *Biomaterials.* 26 (2005) 6288–6295.
- [126] A. Kumar, M. Ali, R. S. Ningthoujam, P. Gaikwad, M. Kumar, B. B. Nath, B. N. Pandey, The interaction of actinide and lanthanide ions with hemoglobin and its relevance to human and

- environmental toxicology, *J. Hazard. Mater.* 307 (2016) 281–293.
- [127] T. Alexy, O. K. Baskurt, N. Nemeth, M. Uyklu, R. B. Wenby, H. J. Meiselman, Effect of lanthanides on red blood cell deformability and response to mechanical stress: Role of lanthanide ionic radius, *Biorheology* 48 (2011) 173–183.
- [128] E. Lugscheider, M. Knepper, B. Heimberg, A. Dekker, C. J. Kirkpatrick, Cytotoxicity investigations of plasma sprayed calcium phosphate coatings, *J. Mater. Sci–Mater. M.* 5 (1994) 371–375.
- [129] M. Tamai, R. Nakaoka, T. Tsuchiya, Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics, *Key Eng. Mater.* 309–311 (2006) 263–266.
- [130] M. Theiszova, S. Jantova, S. Letasiova, M. Palou, L. Cipak, Cytotoxicity of hydroxyapatite, fluorapatite and fluor– hydroxyapatite: a comparative in vitro study, *Neoplasma.* 55(4) (2008) 312–316.
- [131] P. P. Mokoena, Narrowband Ultraviolet B emission from gadolinium and praseodymium co-activated calcium phosphate phosphors for phototherapy lamps, Master thesis, University of the Free State South Africa, 2014.
- [132] S. Bodyl, Optical properties of Pr^{3+} , Sm^{3+} and Er^{3+} ions in apatite, fluorite and phosphate glasses, *Phys. Procedia.* 2 (2009) 515-525.
- [133] Y.-C. Li, Y.-H. Chang, Y.-F. Lin, Y.-S. Chang, Y.-J. Lin, Luminescent properties of trivalent praseodymium-doped lanthanum aluminum germanate $\text{LaAlGe}_2\text{O}_7$, *J. Phys. Chem. Solids.* 68 (2007)1940-1945.
- [134] X.-j. Wang, S. H. Huang, R. Reeves, W. Wells, M.J. Dejneka, R.S. Meltzer, W.M. Yen, Studies of the spectroscopic properties of Pr^{3+} doped LaF_3 nanocrystals/glass, *J. Lumin.* 94–95 (2001) 229–233.
- [135] V. Naresh, B. S. Ham, Influence of multiphonon and cross relaxations on 3P_0 and 1D_2 emission levels of Pr^{3+} doped borosilicate glasses for broad band signal amplification, *J. Alloys Compd.* 664 (2016) 321-330.
- [136] D. S. Spencer, A. S. Puranik, N. A. Peppas, Intelligent nanoparticles for advanced drug delivery in cancer treatment, *Curr. Opin. Chem. Eng.* 7 (2015) 84–92.
- [137] K. T. Thurn, E. M. B. Brown, A. Wu, S. Vogt, B. Lai, J. Maser, T. Paunesku, G. E. Woloschak, Nanoparticles for Applications in Cellular Imaging, *Nanoscale Res. Lett.* 2 (2007) 430.
- [138] C. Leycuras, H. L. Gall, and J. M. Desvignes, Magneto-optic and magnetic properties of praseodymium substituted garnets, *J. App.Phys.* 53 (1982) 8181.
- [139] J. Kong, Z. Liu, D. Cai, Y. Fan, P. Zhao, X. Liu, P. Pu, L. Song, C. He, A gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agent for nucleotides sensing, *Sensor Actuat. B: Chem.* 256 (2018) 913–920.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Добијање нанофосфора на бази флуорапатита допирани Pr^{3+} јонима за био-медицинске примене
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Институт за нуклеарне науке Винча, Универзитет у Београду б) <i>International Iberian Nanotechnology Laboratory (INL) in Portugal</i> в) Институт за мултидисциплинарна истраживања, Универзитет у Београду г) Институт за хемију, технологију и металургију, Универзитет у Београду д) Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду ђ) Хемијски факултет, Универзитет у Београду е) Физички факултет, Универзитет у Београду ж) Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду з) Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду и) Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске студије
1. Опис података
<i>1.1 Врста студије</i> <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> _____ Докторска дисертација _____ _____

1.2 Врсте података

- а) квантитативни ✓
- б) квалитативни ✓

1.3. Начин прикупљања података

- а) анкете, упитници, тестови
- б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи
- в) генотипови: навести врсту _____
- г) административни подаци: навести врсту _____
- д) узорци ткива: навести врсту _____
- ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____ фотографије из експерименталног рада _____
- е) текст, навести врсту _____ литература _
- ж) мапа, навести врсту _____
- з) остало: описати _____ експериментални подаци _____

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- а) Excel фајл, датотека _____
- б) SPSS фајл, датотека _____
- в) PDF фајл, датотека __✓_____
- г) Текст фајл, датотека _✓_____
- д) JPG фајл, датотека _____
- е) Остало, датотека __tif_✓_____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли _____
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) _____

1.3.3. Поновљена мерења

- а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је _____
- б) варијабле које се више пута мере односе се на _____
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

- а) Да
- б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- а) експеримент, навести тип __ синтезе нанофосфора, физичко-хемијска карактеризација, флуоресцентна биоснимања, испитивања биокомпатибилности и хемокомпатибилности _____
- б) корелационо истраживање, навести тип _____
- ц) анализа текста, навести тип ____ прикупљање података из литературе _____
- д) остало, навести шта __ квантно-хемијски прорачуни _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Дифрактометар, ИЦ спектрофотометар, скенирајући електронски микроскоп, скенирајући електронски микроскоп са емисијом поља, трансмисиони електронски микроскоп, калориметар, УВ-ВИС спектрофотометар, флуоресцентни спектрофотометар, *Microplate* читач, оптички микроскоп, флуоресцентни конфокални микроскоп и микроскоп широког поља, уређај за мерење расподеле величине честица _____

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података
- _____

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

_____Квалитет података је контролисан применом стандардних процедура већ развијених у лабораторијама у којима су вршена мерења _____

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

_____Контрола уноса података у матрицу је изведена поређењем добијених података са литературним подацима _____

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у ___Репозиторијум докторских дисертација на Универзитету у Новом Саду _____.

3.1.2. URL адреса _____

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) Да ✓
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
- в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? _____

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

- а) јавно доступни ✓
- б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
- ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

_____ Ауторство – некомерцијално – без прераде _____

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

_____ Душан Милојков d.v.milojkov@gmail.com _____

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима
