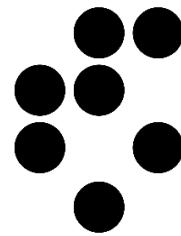




Gimnazija Novo mesto



Institut »Jožef Stefan«

VEZAVA ZWITTERIONOV NA FLUORESCENČNE NANODELCE ZA UPORABO V MEDICINSKI DIAGNOSTIKI

**(raziskovalna naloga iz interdisciplinarnega področja
kemije, fizike in materialov)**

Avtorica:

Lana Traven

Mentorica:

Janja Pust

Somentorica:

prof. dr. Darja Lisjak

Novo mesto, marec 2023

IZJAVA

Podpisana, Lana Traven, dijakinja Gimnazije Novo mesto, potrjujem, da je raziskovalna naloga z naslovom **Vezava zwitterionov na fluorescenčne nanodelce za uporabo v medicinski diagnostiki** nastala kot rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in pri pisanju niso bile kršene avtorske pravice in pravice intelektualne lastnine drugih.

POVZETEK

Nanodelci s pretvorbo navzgor so zaradi sposobnosti oddajanja ultravijolične, vidne in infrardeče svetlobe predmet številnih raziskav za uporabo v medicinski diagnostiki (npr. za biološko slikanje, biološko zaznavanje, optogenetiko itd.). Ena izmed najprimernejših matric je NaYF_4 , vendar taki nanodelci v vodnih medijih niso kemijsko stabilni, kar lahko vodi v potencialno toksičnost. Da bi preprečili njihovo raztapljanje in omogočili njihovo nadaljnjo uporabo, jih je treba prevleči z zaščitnim slojem.

Pri raziskovalni nalogi smo poskušali optimizirati pogoje za čim bolj učinkovito vezavo zaščitne prevleke na nanodelce NaYF_4 . Za prevleko smo uporabili alendronska kislino (AL), ki se s svojima dvema fosfonskim skupinama dobro veže na izhodne nanodelce. Ugotavljni smo vpliv sinteznih parametrov na učinkovitost prevleke, in sicer vpliv nominalne površinske gostote molekul AL in način dodajanja AL v reakcijsko zmes. Morfologijo prevlečenih nanodelcev smo določali z uporabo presevne elektronske mikroskopije, njihove optične lastnosti pa z metodo fluorescenčne spektroskopije. Informacije o koloidni stabilnosti posameznih vzorcev smo pridobili z meritvami zeta potenciala ter na podlagi rezultatov določili najprimernejše sintezne pogoje. Pri fiziološkem pH so bili najbolj stabilni delci z najnižjo nominalno površinsko gostoto liganda, saj so imele molekule AL manj možnosti za tvorbo asociatov. Iz enakega razloga se je postopno dodajanje AL v zmes izkazalo za učinkovitejši postopek, kot če bi dodali vse naenkrat. Zaščitna prevleka ni omejevala optičnih lastnosti delcev.

Enakomerno sintetiziran zaščitni sloj na nanodelcih s pretvorbo navzgor je ključen za zagotavljanje njihove stabilnosti v bioloških sistemih in nadaljnjo uporabo v raziskavah tako *in vitro* kot *in vivo*.

Ključne besede: lantanoidi, nanodelci s pretvorbo navzgor, alendronska kislina, zwitterioni, zaščitne prevleke, koloidna stabilnost

ABSTRACT

Due to their ability to emit ultraviolet, visible and infrared light, upconverting nanoparticles have been the subject of research for medical diagnostic applications (e.g. bio-imaging, bio-sensing, optogenetics, etc.). A suitable matrix is NaYF₄, however such nanoparticles are not chemically stable in aqueous media, which can lead to potential toxicity. They need to be coated with a protective layer to prevent them from dissolving and to allow their further use.

The aim of this research was to optimise the conditions for the most efficient binding of the protective coating to the NaYF₄ nanoparticles. Alendronic acid (AL) was used as the coating which binds well to the starting nanoparticles with its two phosphonic groups. The influence of the synthetic parameters on the coating performance was examined, in particular the influence of the nominal surface density of the AL molecules and the way AL was added to the reaction mixture. The morphology of the coated nanoparticles was determined by scanning transmission electron microscopy and their optical properties by fluorescence spectroscopy. Data on the colloidal stability of the individual samples was obtained by zeta potential measurements, and the most appropriate synthesis conditions were determined from the results. At the physiological pH, the particles with the lowest nominal ligand surface density were the most stable as the AL molecules were less likely to form associates. For the same reason, the gradual addition of AL to the mixture proved to be a more efficient procedure than adding it all at once. The protective coating did not limit the optical properties of the particles.

In conclusion, uniformly synthesised protective layer on the nanoparticles by upconversion is crucial to ensure their stability in biological systems and further use in both in vitro and in vivo studies.

Keywords: lanthanides, upconverting nanoparticles, alendronic acid, zwitterions, protective coatings, colloidal stability

ZAHVALA

Pri izdelavi in oblikovanju raziskovalne naloge sem bila deležna velike podpore in pomoči, česar preprosto ne morem spregledati.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Darji Lisjak z odseka za sintezo materialov K8 Instituta »Jožef Stefan« za pripravljenost, pomoč pri pisanju in možnost opravljanja eksperimentalnega dela v laboratoriju.

Zahvaljujem se mentorici, profesorici kemije Janji Pust, za zavzetost, strokovno pomoč, vodenje pri izdelavi naloge ter vse nasvete in spodbude, ki so olajšali snovanje naloge.

Zahvala gre tudi strokovni sodelavki Tini Černič z Instituta »Jožef Stefan« za vso pomoč pri eksperimentalnem delu.

Prav tako sem hvaležna ravnateljici Gimnazije Novo mesto Mojci Lukšič za možnost opravljanja raziskovalne naloge.

Lepo se zahvaljujem tudi vsem prijateljem, ki so mi skozi celoten proces raziskovanja stali ob strani in me spodbujali.

KAZALO VSEBINE

1	TEORETIČNI DEL.....	1
1.1	LANTANOIDI.....	1
1.1.1	Lastnosti in reaktivnost.....	1
1.1.2	Uporaba lantanoidov.....	3
1.1.3	Lantanoidni nanomateriali v medicinskih aplikacijah.....	6
1.2	LUMINISCENCA, FOTOLUMINISCENCA IN FLUORESCENCA.....	7
1.2.1	FLUORESCENCA Z ENERGIJSKO PRETVORBO NAVZGOR	8
1.3	NANODELCI Z ENERGIJSKO PRETVORBO NAVZGOR	8
1.3.1	STRUKTURA UCNP NA OSNOVI $NaYF_4$	9
1.3.2	UPORABA UCNP V MEDICINI	10
1.3.3	OMEJITVE UPORABE UCNP V MEDICINI.....	12
1.3.4	CITOTOKSIČNOST UCNP	12
1.3.5	BIOKOMPATIBILNOST UCNP IN ZAŠČITNE PREVLEKE.....	13
1.4	ZETA POTENCIAL.....	15
2	NAMEN DELA.....	17
2.1	CILJI	17
2.2	HIPOTEZE	18
3	EKSPERIMENTALNI DEL.....	19
3.1	MATERIALI	19
3.1.1	Laboratorijski pribor in oprema	19
3.1.2	Kemikalije in uporabljene snovi	19
3.1.3	Programska računalniška oprema	19
3.2	METODE DELA.....	20
3.2.1	Sinteza prevlek nanodelcev $NaYF_4$ z alendronsko kislino	20
3.2.2	Karakterizacija in analiza vzorcev nanodelcev $NaYF_4$ z alendronsko kislino	25
4	REZULTATI Z INTERPRETACIJO	28
4.1	MORFOLOGIJA IN KEMIJSKA SESTAVA PREVLEČENIH NANODELCEV	28
4.1.1	Vzorec 1 ($NaYF_4@AL3$)	28
4.1.2	Vzorec 2 ($NaYF_4@AL10$)	29
4.2	OPTIČNE LASTNOSTI PREVLEČENIH NANODELCEV	32
4.3	KOLOIDNA STABILNOST PREVLEČENIH NANODELCEV	33
5	RAZPRAVA.....	36
5.1	UČINKOVITOST VEZAVE AL NA NANODELCE $NaYF_4$	36
5.2	VPLIV PREVLEKE NA FLUORESCENČNE LASTNOSTI NANODELCEV $NaYF_4$	37
6	ZAKLJUČEK.....	38
7	VIRI.....	39
8	VIRI SLIK	43

KAZALO SLIK

Slika 1: Lantanoidi v periodnem sistemu (prirejeno po (Bünzli, 2013))	1
Slika 2: Rudnik iterbija na Švedskem (Kit Chapman, 2018)	2
Slika 3: Heksagonalni kristalni sistem (Dr. Ronald Redwing, 2023)	3
Slika 4: Fluorescencija lantanoidov (prirejeno po (The Open University, 2017))	5
Slika 5: Evropijev kompleks, ki izpoljuje zahteve za uporabo v fluoroimunoanalizah (prirejeno po (Simon A. Cotton, 2023))	5
Slika 6: Diagram Stokesovega premika med absorpcijo in izsevanjem svetlobe (prirejeno po (Wikipedia, 2023)).....	7
Slika 7: Proces pretvorbe navzgor med senzibilizatorjem Yb^{3+} in aktivatorjem Er^{3+} (Ling-Dong Sun, 2015)	9
Slika 8: Kristalna struktura kubične oblike, $\alpha\text{-NaYF}_4$ (a), in heksagonalne oblike, $\beta\text{-NaYF}_4$ (b) (Hao Dong, 2014)	10
Slika 9: Različne možnosti uporabe UCNP	11
Slika 10: Struktura molekule alendronske kisline (PubChem, 2023)	15
Slika 11: Zeta potencial (Kolman, 2021)	16
Slika 12: Shema tvorbe asociatov med ioni dvojčki	17
Slika 13: Trivratna bučka s povratnim hladilnikom na magnetnem mešalu.....	21
Slika 14: Centrifuga, ki smo jo uporabljali za spiranje.	23
Slika 15: Ločevanje zmesi po izmenjavi ligandov.....	23
Slika 16: Usedlina $\text{NaYF}_4@\text{AL}$ po 4. spiranju	24
Slika 17: Presevni elektronski mikroskop Jeol JEM-2100 (http://cemm.ijs.si/sl/oprema/)	25
Slika 18: Optični spektrofluorometer Horiba-PTI QuantaMaster 8000 (IJS, 2023)	26
Slika 19: Naprava za določanje zeta potenciala	27
Slika 20: Prevlečeni nanodelci $\text{NaYF}_4@\text{AL3}$	28
Slika 21: Prevlečeni nanodelci $\text{NaYF}_4@\text{AL3}$	29
Slika 22: Kemijska sestava nanodelcev $\text{NaYF}_4@\text{AL3}$ (metoda EDXS).....	29
Slika 23: Prevlečeni nanodelci $\text{NaYF}_4@\text{AL10}$	30
Slika 24: Prevlečeni nanodelci $\text{NaYF}_4@\text{AL10}$	30
Slika 25: Heksagonalna matrica $\text{NaYF}_4@\text{AL10}$	31
Slika 26: Kemijska sestava nanodelcev $\text{NaYF}_4@\text{AL10}$	31
Slika 27: Rezultati fluorescenčne spektroskopije za $\text{NaYF}_4@\text{AL3}$	32
Slika 28: Zeta potencial vzorca $\text{NaYF}_4@\text{AL3}$ (linije smo dodali z namenom boljše predstave)	33
Slika 29: Zeta potencial vzorca $\text{NaYF}_4@\text{AL10}$ (linije smo dodali z namenom boljše predstave)	34

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Enačba asociacije ionov dvojčkov	14
Enačba 2: Izračun mase zatehtane alendronske kisline	21

KAZALO TABEL

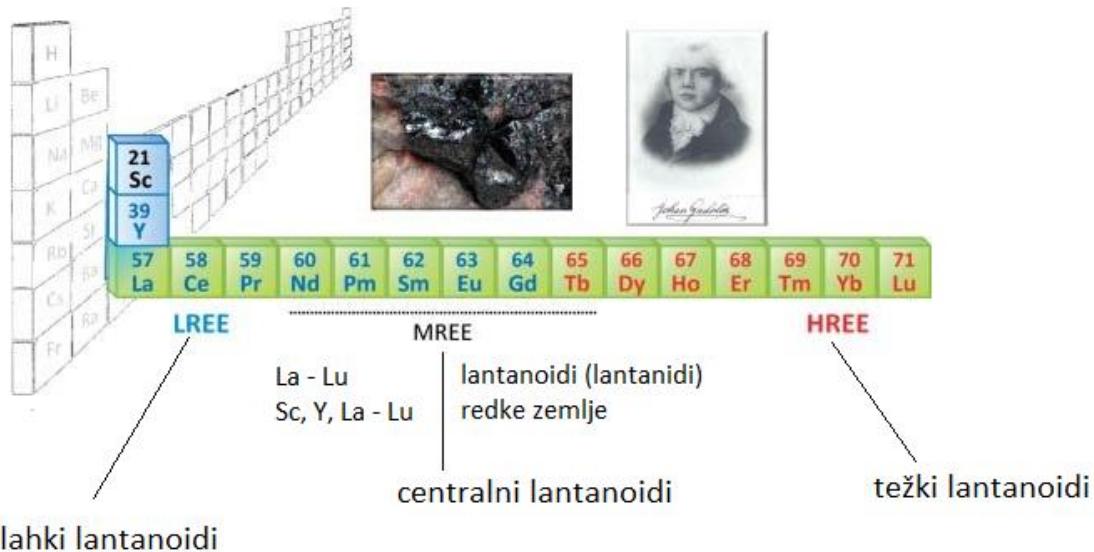
Tabela 1: Količina snovi za sintezo prevlek.....	22
Tabela 2: Načini dodajanja Al pri različnih vzorcih nanodelcev.....	35

1 TEORETIČNI DEL

1.1 LANTANOIDI

1.1.1 Lastnosti in reaktivnost

Lantanoidi so skupina 15 elementov, ki se nahajajo v 6. periodi periodnega sistema in spadajo med t. i. elemente bloka f, podlupine 4f (Slika 1), ki se pri njih polni (NICE CXone Expert knowledge management, 2022).



Slika 1: Lantanoidi v periodnem sistemu (prirejeno po (Bünzli, 2013))

Prvi elementi tega bloka so bili odkriti leta 1787 na Švedskem, v mestu Ytterby, kjer so našli črn mineral, danes poznan kot gadolinit, poimenovan po finskem kemiku Johanu Gadolinu (Bünzli, 2013). Ta je leta 1794 iz minerala izoliral prvi lantanoid, itrij. Kasneje so v njem odkrili še vse ostale lantanoide (Anne Marie Helmenstine, 2019), štirje so dobili ime po kraju odkritja minerala: itrij (Y), terbij (Tb), erbij (Er) in iterbij (Yb) (Wikipedia, 2022). S pomočjo rentgenske spektroskopske analize, tehnike, pri kateri se za analizo materialov uporablja rentgenski žarki (X) z valovno dolžino med žarki γ in UV-svetlobo (Lucas, 2018), je Moseley dokazal, da obstaja petnajst elementov lantanoidov.



Slika 2: Rudnik iterbija na Švedskem (Kit Chapman, 2018)

Elemente so sprva imenovali redke zemlje, ime se v literaturi še vedno pojavlja, izhaja pa iz dejstva, da so bili najdeni v redkem mineralu (Anne Marie Helmenstine, 2019), četudi je znano, da sploh niso redki. Cerija, ki ga je med njimi največ, je več kot svinca ali živega srebra, tulija, ki ga je najmanj, pa več kot srebra, zlata in platine (Lazarini & Brenčič, 1992). Ime lantanoidi so dobili po prvem elementu te skupine, lantanu. Zaradi podobnosti ionskega radija in zelo podobnih kemijskih lastnosti lantanoidov jih je v naravnih rudah in drugih mešanicah težko ločiti med seboj. (Wikipedia, 2023). Ločevanje rud in mešanic na posamezne lantanoide predstavlja v anorganski kemiji enega večjih problemov, večina metod ločevanja je neselektivnih (MCGILL, 2023).

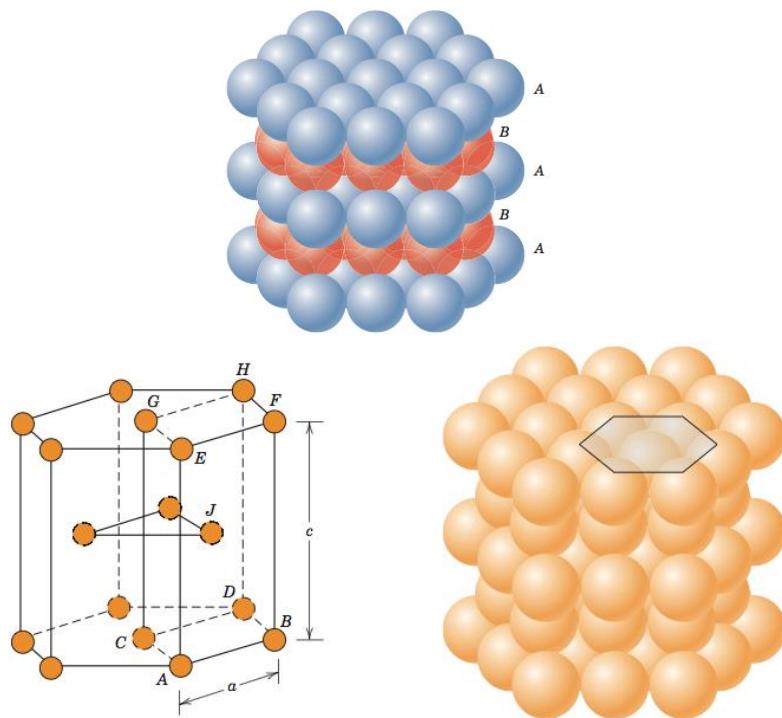
Za lantanoide je značilno, da ima vseh 15 elementov zaradi podobne elektronske konfiguracije (zasedene podlupine 4f) podobne značilnosti:

- srebrno bel kovinski lesk, na zraku zaradi oksidacije potemnijo,
- so relativno mehke kovine,
- imajo visoke temperature tališč in vrelišč,
- so dobri reducenti,
- najpogosteje tvorijo 3+ ione, nekateri tudi 2+ ali 4+,
- v spojinah je njihovo koordinacijsko število večje od 6, običajno 8 ali 9, lahko tudi 12 (Anne Marie Helmenstine, 2019).

Reagirajo z večino nekovinskih elementov in tvorijo ionske spojine (Anne Marie Helmenstine, 2019).

S hladno vodo reagirajo počasi, a reakcija poteče zelo hitro ob segrevanju. Zelo hitro oksidirajo na vlažnem zraku, reakcija s kisikom je pri sobni temperaturi počasna, a pri temperaturah med 150 in 200 °C zgorijo. Raztopljo se v razredčenih kislina, ob segrevanju reagirajo s halogeni, žveplom, vodikom, ogljikom in dušikom (NICE CXone Expert knowledge management, 2022).

Večina lantanoidov je polimorfnih. Pri sobni temperaturi elementi Sc, Y, Gd in Tm kristalizirajo v heksagonalnem kristalnem sistemu (Slika 3), elementi La, Pr in Nd v dvojnem heksagonalnem sistemu (MCGILL, 2023).



Slika 3: Heksagonalni kristalni sistem (Dr. Ronald Redwing, 2023)

1.1.2 Uporaba lantanoidov

Lantanoidi in njihove spojine se veliko uporablja na različnih področjih. Najpomembnejša področja uporabe so:

- v metalurgiji: Uporaba temelji na dobri reaktivnosti lantanoidov z vodo in vodikom, dušikom, žveplom in tako imenovanimi "ujetimi" elementi, kot so arzen, antimon in bizmut. Dodajanje lantanoidov, itrija in cerija, izboljša oksidacijsko odpornost pri segrevanju zlitin. Dodajanje lantanoidov bakrovim in aluminijevim zlitinam, ki se uporablja kot električni prevodniki, izboljša njihove mehanske lastnosti.
- kot katalizatorji: Veliko lantanoidov uporablja kot zeolitne katalizatorje za izboljšanje kakovosti bencina. Kot katalizatorji se uporablja pri alkiliranju, izomerizaciji, hidrogeniranju, dehidrogeniranju, dehidraciji, reformingu ogljikovodikov, polimerizaciji, oksidaciji CO in ogljikovodikov ter zmanjšanju koncentracije dušikovih oksidov v avtomobilskih izpušnih plinih.
- v proizvodnji stekla in keramike: V proizvodnji stekla se uporablja kot sredstva za poliranje, za kemijsko razbarvanje stekel in zmanjšanje UV-prepustnosti stekel, pri optičnih steklih izboljšajo lomni količnik. V industriji keramike se med drugim uporablja kot pigmenti.
- kot dodatki v luminiscenčnih materialih, saj izsevajo svetlobo točno določenih valovnih dolžin, če jih stimuliramo z UV-svetlobo, rentgenskimi žarki ali elektroni (McGill, 2000).

1.1.2.1 Uporaba v medicini

Lantanoidi se uporablajo pri različnih vrstah zdravljenj. Že dolgo je pri zdravljenju rakavih obolenj uveljavljen lantanoid itrij, ^{90}Y . Za zdravljenje kostnega raka je v uporabi samarij ^{153}Sm , v kompleksu je v trivalentnem stanju in se pri zdravljenju izmenjuje s kalcijevimi ioni (Simon A. Cotton, 2023).

Znan je tudi vpliv lantanoidnih(III) ionov na imunski sistem, trivalentni in štirivalentni cerij, Ce(III) in Ce(IV), so uporabljali že v 19. stoletju za preprečevanju okužb pri hudo opečenih bolnikih (Simon A. Cotton, 2023).

Uporablja se tudi lantan v obliki karbonata, in sicer pri zdravljenju hipofosfatemije, ki se pojavi pri bolnikih z boleznimi ledvic (Simon A. Cotton, 2023).

Veliko aplikacij lantanoidov je poznanih pri diagnostiki in zdravljenju rakavih obolenj. Od uporabe gadolinija(III) pri slikanju z magnetno resonanco v osemdesetih letih prejšnjega stoletja so začeli uporabljati kontrastna sredstva na osnovi drugih lantanoidov, delajo se raziskave za uporabo lantanoidov kot citotoksičnih sredstev, in sicer pri fotodinamičnem zdravljenju, radioterapiji, dostavi zdravil ali genov, biološkem zaznavanju in slikanju (Ruijie D. Teo, 2016).

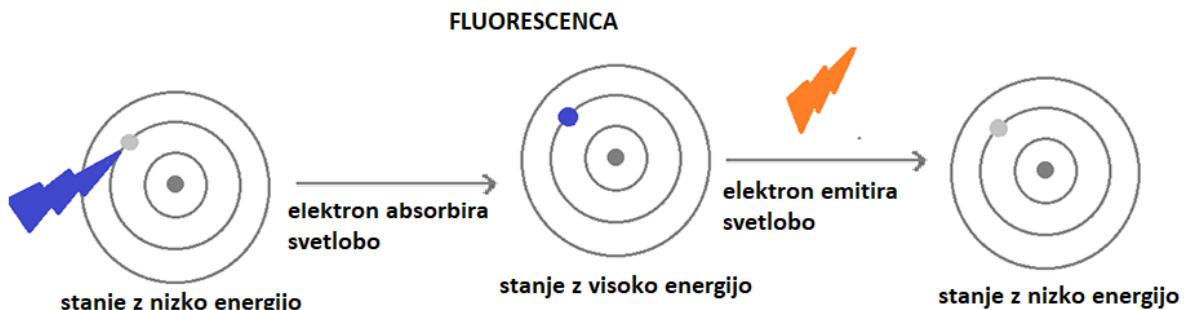
1.1.2.2 Značilne lastnosti lantanoidov in z njimi povezana uporaba

Razen lantana in lutecija imajo vsi ostali trivalentni lantanoidi nesparjene elektrone, zaradi česar so paramagnetni. Med paramagnetnimi je najpomembnejši gadolinijev ion Gd^{3+} , v katerem ima vseh 7 elektronov podlupine 4f vzporedni spin. Ta lastnost je pomembna za uporabo gadolinijevih kompleksov (npr. gadopentetna kislina (blagovna znamka Magnevist®) in gadoterna kislina (Artirem®)) (Teo, 2016) kot kontrastnega sredstva pri slikanju z magnetno resonanco (MRI) pri rakavih obolenjih (Wikipedia, 2023).

Zelo uporabne so luminiscenčne lastnosti lantanoidov, saj zaradi posebne elektronske konfiguracije močno fluorescirajo, od ultravijolične (UV) do infrardeče (IR) svetlobe (Slika 4). Razlog so delno zasedene podlupine 4f (kot posledica nižje energije od podlupine 5d) vseh ionov lantanoidnih elementov za lantanom. Po pravilu Laporta so prehodi elektronov med f-orbitalami prepovedani, zato je po vzbujanju elektrona prehod v osnovno stanje počasen, živiljenjske dobe luminisceence pa so dolge (Bünzli, 2013). Za fluorescenco ne uporabljam samih lantanoidnih ionov, saj je njihova absorpcija svetlobe prešibka. Dodajajo jim organske ligande z močnejšo sposobnostjo absorpcije svetlobe, ki jo prenašajo na lantanoidne ione, kar poveča intenzivnost fluorescence (Chen, 2020).

Močnejšo fluorescenco dosežejo, če v kristalne matrice vgrajujejo lantanoidne ione v zelo nizkih koncentracijah (nekaj atomskih odstotkov), saj ob večji količini lantanoidnih ionov skupaj drug od drugega absorbirajo sevano svetlobo in intenziteta je navzven manjša, kot če so ioni dovolj daleč narazen. Primer so kristali NaYF_4 , kjer se uporabljajo ioni iterbija, Y^{3+} , nekaj atomskih odstotkov pa je zamenjanih z erbijevimi ioni, Er^{3+} , zaradi česar je intenziteta fluorescence bolj intenzivna (Chen, 2020).

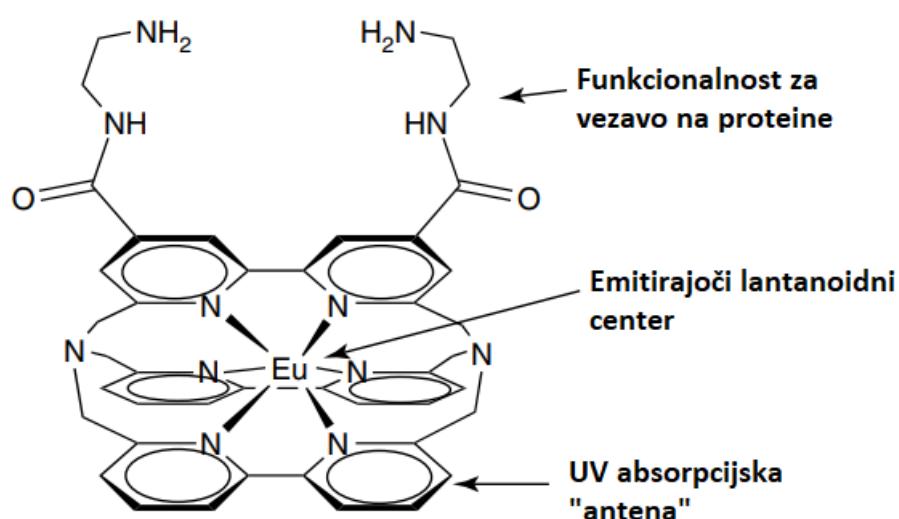
Njihove optične lastnosti so različne. Kakovost fluorescence je odvisna od vrste uporabljenih sinteznih metod, njihova intenziteta pa od vrste matrice, v katero vgrajujejo lantanoide. Različni lantanoidni ioni sevajo fluorescenco različnih valovnih dolžin, in sicer zaradi različne elektronske konfiguracije in zasedenosti podlupine 4f. Lantanoidi so zaradi svojih fluorescenčnih lastnosti uporabni za biomedicinsko slikanje, za analize kot optični (kolorimetrični in fluorometrični) senzorji, pri razsvetljavi in pretvorbi sončne energije (Chen, 2020).



Slika 4: Fluorescencija lantanoidov (prirejeno po (The Open University, 2017))

1.1.2.3 Uporaba v bioloških analizah in medicinski diagnostiki

V bioloških analizah, kot je fluoroimunoanaliza, so kot prvi lantanoid uporabili kompleks trivalentnega evropija (Slika 5). Zahteva za imunoanalizo je, da je mogoče protitelo ali antigen označiti s stabilno oznako, ki jo je mogoče takoj zaznati pod pogoji analize. Za takšno uporabo je lantanoidni ion koordinativno vezan z različnimi ligandi, ki spodbujajo luminiscenco lantanoidnega iona, in ligandi, ki se vežejo s proteini, ki jih zasledujemo v analizi (Simon A. Cotton, 2023).



Slika 5: Evropijev kompleks, ki izpoljuje zahteve za uporabo v fluoroimunoanalizah (prirejeno po (Simon A. Cotton, 2023))

Znani so tudi drugi kompleksi, ki ustrezajo različnim biološkim substratom in se z luminiscenčno mikroskopijo uporabljajo v kvalitativnih in kvantitativnih bioloških analizah (Simon A. Cotton, 2023).

Za medicinsko diagnostiko se izkoriščajo tudi magnetne lastnosti lantanoidov, zlasti gadolinija (Simon A. Cotton, 2023).

1.1.3 Lantanoidni nanomateriali v medicinskih aplikacijah

Dvajseto stoletje je prineslo razvoj nove, moderne nanotehnologije, ki je spodbudila nesluten razvoj na vseh področjih človekovega življenja, saj so snovi velikosti med 1 in 100 nm s svojimi edinstvenimi lastnostmi odprle številne možnosti njihove uporabe. Za začetnika velja Richard Feynman, ki je leta 1965 dobil Nobelovo nagrado za fiziko (JE Hull, 2015).

Zlata doba nanotehnologije se je začela v osemdesetih letih prejšnjega stoletja z odkritjem fulerenov. Odkritelji teh znamenitih struktur ogljika, molekul C₆₀, so bili sir Harry Kroto, Robert Curl in Richard Smalley, svoje znanstveno delo so objavili leta 1985 v reviji Nature (H. W. Kroto, 1985). Za to odkritje so leta 1996 dobili tudi Nobelovo nagrado za kemijo (ACS Chemistry for Life, 2010).

Zanimanje za področje nanoznanosti in nanotehnologije je v začetku enaindvajsetega stoletja samo še naraščalo. Približno pol stoletja od prvih začetkov je postala temelj izjemnih industrijskih aplikacij in doživelja eksponentno rast. Močan vpliv ima na področju farmacije in medicine, saj se je začel razvoj drugačnih medicinskih pripomočkov, diagnostičnih biosenzorjev, zdravil s sistemi za dostavo na mesto obolenja in podobno (JE Hull, 2015).

Velik napredok nanotehnologije je prinesel novo upanje za odkrivanje, preprečevanje in zdravljenje raka. Nanomedicina uporablja nanodelce za vse več aplikacij, kot so slikanje, diagnostika, ciljno zdravljenje raka, dostava zdravil in genov, tkivno inženirstvo, in pomeni nov koncept zdravljenja, prilagojenega posameznemu bolniku (teranostika) (Martha Sahylí Ortega Pijeira, 2022).

Z razvojem različnih nanomaterialov v biomedicinski znanosti močno napreduje tudi uporaba lantanoidnih nanodelcev. Glede na njihovo zelo pomembno vlogo v sodobnem življenju, zlasti v materialih in elektroniki, ter glede nanjihove edinstvene lastnosti se zdi razširitev na področje biomedicine, še posebej diagnostike, logična in nujna.

Zmožnost priprave izjemno majhnih nanomaterialov povečuje uporabo *in vivo*, nastaja vse več aplikacij lantanoidnih nanodelcev na področju medicinskega slikanja in diagnosticiranja bolezni. Zaradi uporabe različnih površinsko aktivnih snovi in polimerov se izboljšuje tudi njihova biokompatibilnost. Hkrati na te nanodelce konjugirajo specifična protitelesa in proteine in tako povečujejo učinkovitost ciljnega delovanja na specifične tumorje. Z odkritjem izjemno svetle emisije lantanoidnih nanodelcev v bližnjem infrardečem območju (NIR) se je še povečal njihov razvoj za uporabo v slikovno vodenih kirurgijih (Qize Zhang, 2022).

Za predklinične študije je izjemno pomembno, da so nanodelci biokompatibilni, saj se mnogi, posebej anorganski materiali obnašajo kot tukti in jih telo zavrne. Da so delci ustrezeni za uporabo *in vivo*, ne smejo biti toksični, imeti morajo čim daljši čas kroženja in biti biološko razgradljivi ali dovolj majhni, da se lahko izločijo iz ledvičnega glomerula.

V ta namen znanstveniki sintetizirajo snovi različnih funkcionalnosti na površini nanodelcev in povečujejo njihovo biokompatibilnost (Qize Zhang, 2022).

1.2 LUMINISCENCA, FOTOLUMINISCENCA IN FLUORESCENCA

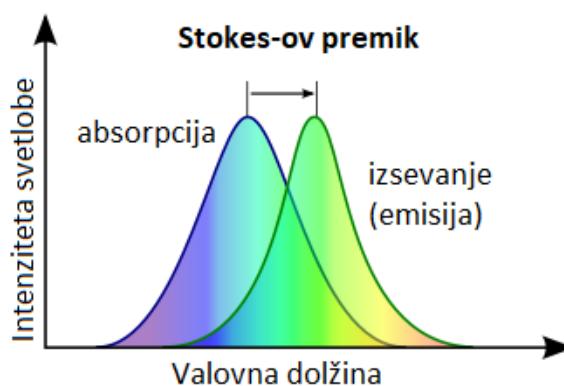
Svetloba (elektromagnetno valovanje) je oblika energije. Za nastanek svetlobe vedno potrebujemo drugo obliko energije. Če svetloba nastane kot posledica segrevanja (sonce), govorimo o inkadescenci, kadar pa gre za nastanek t. i. »hladne« svetlobe, ki jo snov odda pri običajnih nizkih temperaturah, govorimo o luminiscenci (The Fluorescent Mineral Society, Inc., 2023).

Izraz luminiscenca izhaja iz latinskega korena (lumen pomeni svetloba). Prvi ga je vpeljal nemški fizik in znanstvenik Eilhard Wiedemann leta 1888 in z njim označil vse pojave svetlobe, ki ne nastanejo kot posledica segrevanja (Valeur, 2011).

Fotoluminiscenca nastane kot posledica obsevanja snovi s kratkovalovno svetobo, ultravijoličnimi (UV), rentgenskimi ali gama (γ) žarki. Snov pri obsevanju absorbira fotone, preide v višje energetsko stanje (vzbujeno stanje) in pri prehodu nazaj v osnovno stanje odda fotone. Proses omogočajo luminiscenčni oz. optični centri (aktivatorji). Ti povzročijo ločena energijska stanja, ki se z absorpcijo energije vzbudijo, pri vrnitvi v osnovna energijska stanja pa izsevajo (emitirajo) svetobo. Aktivatorji so lahko kemične snovi, električno polje, foton in drugo (Valeur, 2011).

V zgodovini se je najprej pojavil izraz fosforencanca. Odkritelj je bil, povsem po naključju, čevljar in ljubiteljski alkimist Vincenzo Casciariolo, ki je med letoma 1592 in 1604 zmešal zmleti barit in oglje, dobljena zmes pa je oddajala modro svetobo. Poimenovali so jo »bolonjski fosfor«, pojav pa po jutranji zvezdi Veneri kot fosforencanca.

Pojav fluorescence pa je prvi opisal britanski znanstvenik George Gabriel Stokes pri opazovanju fluoritov, po katerih je tudi dobil ime, in ugotovil strnil v Stokesov zakon: »Frekvenca fluorescenčne svetlobe je vedno manjša od frekvence svetlobe, ki je fluorescenco povzročila.« Ta zamik se po njem tudi imenuje Stokesov premik (Slika 6). Pri fizikalnem pojavu fluorescence snov seva fotone z daljšo valovno dolžino, kot je valovna dolžina absorbirane energije, energija izsevanih fotonov je tako manjša od absorbiranih. Razlog je v tem, da foton prehaja iz vzbujenega nazaj v osnovno stanje prek dveh ali več vzbujenih stanj (Valeur, 2011).



Slika 6: Diagram Stokesovega premika med absorpcijo in izsevanjem svetlobe (prirejeno po (Wikipedia, 2023))

1.2.1 FLUORESCENCA Z ENERGIJSKO PRETVORBO NAVZGOR

Fluorescenza s pretvorbo navzgor (ang. photon upconversion) je proces, pri katerem absorpciji dveh ali več fotonov sledi sevanje svetlobe s krajšo valovno dolžino od valovne dolžine vzbujanja, kar pomeni večjo energijo izsevanih fotonov. Za razliko od prve opisane fluorescence je dobila ime anti-Stokesov tip sevanja svetlobe (Wikipedia, 2023).

1.3 NANODELCI Z ENERGIJSKO PRETVORBO NAVZGOR

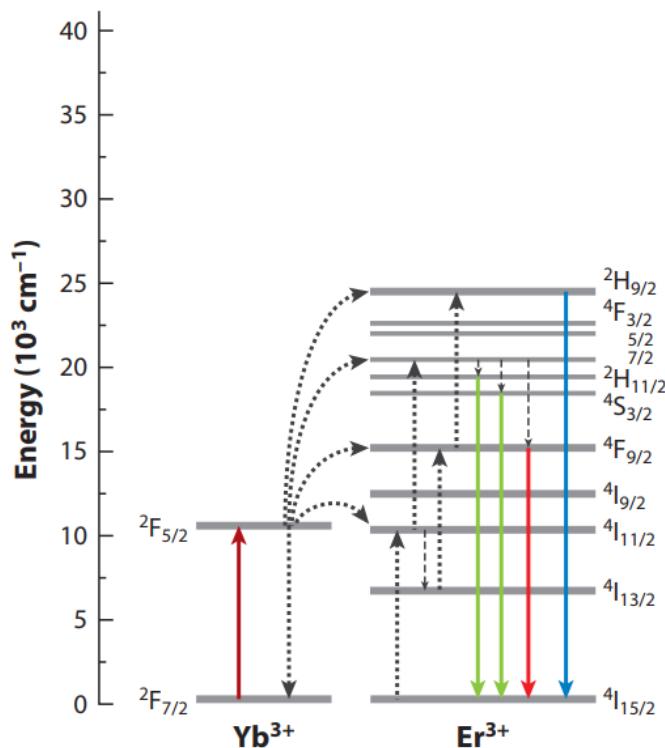
Pri večini organskih fluorescenčnih barvil je energija izhodnih, izsevanih fotonov manjša od energije vpadnih, vzbuditi pa jih je treba s svetlogo kratkih valovnih dolžin (npr. UV-ali vidna svetloba). UV-svetloba je lahko škodljiva, saj lahko pri bioloških molekulah s fluorescenčnimi lastnostmi (npr. DNK, beljakovine) pride do avtofluorescence, ki lahko zaradi fotokemičnih reakcij povzroči poškodbe celičnih biomolekul, celic ali tkiv (Oliveira, 2019). Zato so toliko bolj uporabni nanodelci z energijsko pretvorbo navzgor (*angl. upconverting nanoparticles – UCNPs*) (Mandl, 2019). Pretvorba navzgor je poseben pojav luminiscence, pri katerem fotoni vzbudijo sevanje svetlobe krajše valovne dolžine, kot jo ima vzbujevalna svetloba. Ta pojav je leta 1959 napovedal Bloembergen, sredi šestdesetih let pa so ga neodvisno opazili Auzel, Ovsjankin in Feofilov (Azuel, 2004). Pri UCNP je vzbujevalna svetloba v bližnjem infrardečem (ang. near infrared – NIR) spektralnem območju, izsevana ali oddana pa v NIR, vidnem ali celo UV-območju. Valovna dolžina med 650 in 1000 nm, daljša od vidne svetlobe, ima manjšo energijo, sipanje svetlobe je močno zmanjšano, kar omogoča globinsko slikanje tkiva brez ozadja ter potencialne biomedicinske aplikacije (Mandl, 2019).

UCNP so sestavljeni iz treh ključnih elementov:

- kristalne matrice in
- dveh vrst dopantov:
 - senzibilizatorja in
 - aktivatorja (Del Rosal, 2019).

Anorganske matrice so lahko kovinski fluoridi, vanadati, oksidi in fosfati ter se med seboj razlikujejo tudi po obliki.

Običajno jih dopiramo z lantanoidnimi ioni, saj imajo zaradi interakcije svetlobe z elektroni v orbitalah 4f primerne fluorescenčne lastnosti. Najpogosteje je senzibilizator iterbijev $^{3+}$ ion, Yb^{3+} , ki ga vzbujamo s svetlogo valovne dolžine 980 nm, po absorpciji se presežna energija prenese na aktivatorje, kot so erbijev, Er^{3+} , tulijev, Tm^{3+} , ali holmijev ion, Ho^{3+} (Slika 6) (Del Rosal, 2019). Ti med relaksacijo sprostijo energijo v obliki svetlobe določene valovne dolžine (Azuel, 2004).



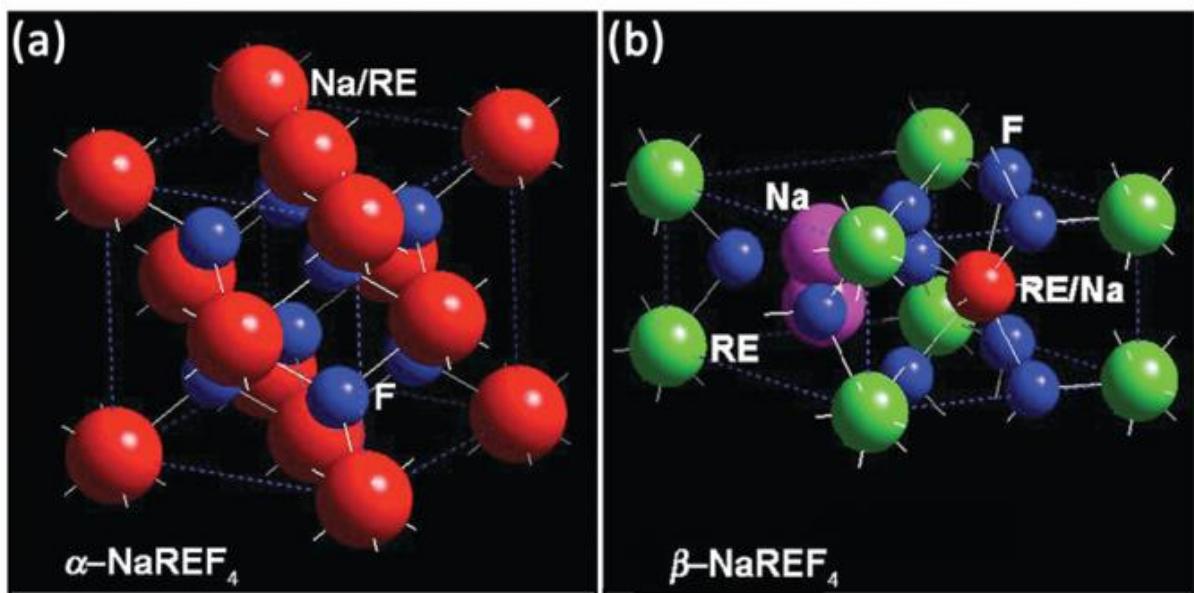
Slika 7: Proces pretvorbe navzgor med senzibilizatorjem Yb^{3+} in aktivatorjem Er^{3+} (Ling-Dong Sun, 2015)

1.3.1 STRUKTURA UCNP NA OSNOVI NaYF_4

Nanodelce NaYF_4 sestavlja osnovna fluoridna kristalna matrica, ki je najpogosteje uporabljena zaradi majhnih topotnih izgub. Pri relaksaciji vzbujeni lantanoidi pretežno oddajajo elektromagnetno valovanje oziroma svetlobo, to je fluorescenco. Topoto, ki predstavlja izgubo energije, oddajajo v manjši meri kot npr. oksidi. Kovinski fluoridi niso higroskopni, kar omogoča natančno in zanesljivo sintezo, s katero dobimo dobro definirano kristalno fazo (Mandl, 2019). Poznamo dve različni kristalni obliki NaYF_4 :

- kubično ($\alpha\text{-NaYF}_4$) in
- heksagonalno ($\beta\text{-NaYF}_4$) (Slika 8).

Pri heksagonalni Yb^{3+} in Na^+ ioni selektivno zasedajo kationska mesta, zato matrica $\beta\text{-NaYF}_4$ proizvaja močnejšo fluorescenco kot matrica $\alpha\text{-NaYF}_4$, kjer sta kationa naključno porazdeljena (Wang & Liu, 2009).

Slika 8: Kristalna struktura kubične oblike, $\alpha\text{-NaREF}_4$ (a), in heksagonalne oblike, $\beta\text{-NaREF}_4$ (b) (Hao Dong, 2014)

1.3.2 UPORABA UCNP V MEDICINI

UCNP v predkliničnih raziskavah imajo zelo širok spekter uporabe (Slika 9), od kontrastnih sredstev za biološko slikanje do luminiscenčnih indikatorjev temperature ali za aktiviranje sproščanja zdravil.

Področja uporabe UCNP v medicini razdelimo na dve glavni skupini:

- kot kontrastna sredstva za biološko slikanje in biološko zaznavanje ter
- kot aktivatorje za zdravljenje raka in optogenetiko (Del Rosal, 2019).

1.3.2.1 Biološko slikanje

Zaradi možnosti vzbujanja UCNP z NIR-svetlobo, ki se v tkivih manj absorbira in s tem zmanjša možnost poškodbe tkiv, fluorescensa pa je zaradi manjšega sisanja manj nagnjena k bledenju, so taki delci zelo primerni za uporabo v študijah *in vivo*. Pri slikanju z UCNP se je poleg tega mogoče skoraj v celoti izogniti avtofluorescenci ozadja (Del Rosal, 2019), ki ima zato manjši vpliv pri detekciji (Gnach A. B., 2012). Podatki, pridobljeni z luminiscenco s pretvorbo navzgor, se lahko dopolnijo z informacijami, ki jih zagotavljajo druge tehnike slikanja, vključno z magnetno resonanco (MRI), računalniško tomografijo (CT), pozitronsko emisijsko tomografijo (PET) in enofotonsko emisijsko tomografijo (SPECT). V vseh teh tehnikah lantanoidi, vključno z UCNPs, predstavljajo kontrastna sredstva. Uporaba nanodelcev s pretvorbo navzgor je zelo pomembna na področju zgodnje diagnostike tumorjev. S spremenjanjem njihove sestave in strukture vplivamo na valovno dolžino in trajanje luminiscecene. S tem se razširjajo možnosti uporabe za različne biološke preiskave, pri katerih potrebujemo kontrastna sredstva z različnimi trajanjimi luminiscecene enake valovne dolžine (barvno multipleksiranje) (Del Rosal, 2019).

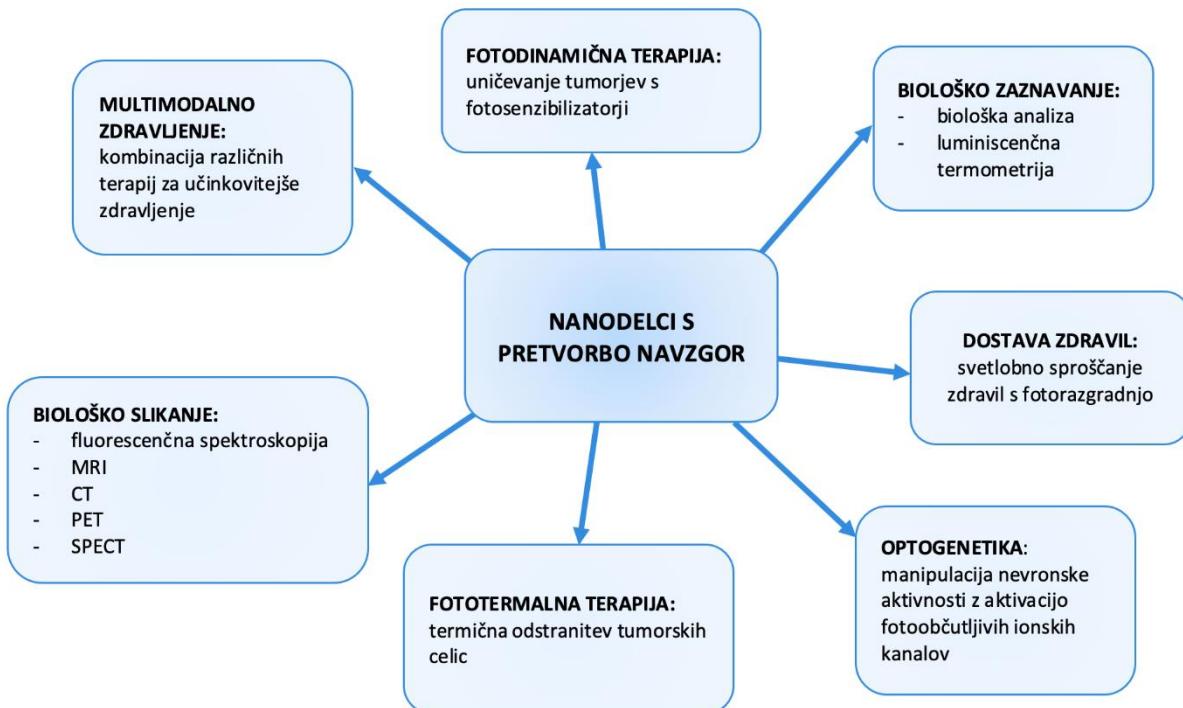
1.3.2.2 Biološko zaznavanje

UCNP lahko zaznavajo različne ione in molekule (npr. sledi biomolekul, ionov težkih kovin), a jih je za to treba konjugirati s specifičnimi indikatorji. Nanodelce lahko uporabljamo tudi za luminiscenčno termometrijo, ki temelji na majhni energijski razlike med toplotno povezanimi energijskimi nivoji (Del Rosal, 2019).

1.3.2.3 Zdravljenje raka in optogenetika

Nekatere raziskave uporabnosti UCNP v biomedicini se osredotočajo tudi na njihovo potencialno uporabo v onkologiji. Prednost UCNP je, da lahko delujejo kot pretvorniki visoko prodorne svetlobe NIR v UV/vidno svetobo in tako zagotavljajo potrebno vzbujevalno svetlobo tudi globlje v tkivih. Ta lastnost je ključna pri fotodinamični terapiji za zdravljenje raka (FDT). UCNP v vlogi fotosenzibilizatorjev vzpodbudijo nastanek radikalov različnih kisikovih zvrsti, ki uničijo rakave celice. UCNP se uporabljajo tudi za multimodalno zdravljenje tumorjev (npr. kombinacija fotodinamične in fotermalne terapije), ki je učinkovit način zdravljenja. Jedro UCNP deluje kot fototermično sredstvo, hkrati pa se aktivira fotosenzibilizator. Uporabni so tudi za svetlobno aktivirano sproščanje zdravilnih učinkovin v telesu. Obsevanje z NIR namreč sproži kemično spremembo, zaradi katere nanodelec sprosti zdravilo (Del Rosal, 2019).

UCNP pa niso primerni le za zdravljenje raka, pomembno vlogo imajo tudi v optogenetiki. S to novo tehniko lahko strokovnjaki z aktivacijo fotoobčutljivih ionskih kanalov manipulirajo nevronske aktivnosti in na ta način preučujejo različne nevrološke bolezni (npr. Parkinsonova bolezen, epilepsija). Prednost uporabe UCNP je, da lahko ionske kanale ob vzbujanju z NIR aktivirajo tudi globlje v možganih (Del Rosal, 2019).



Slika 9: Različne možnosti uporabe UCNP

1.3.3 OMEJITVE UPORABE UCNP V MEDICINI

Kljud številnim možnostim so bile doslej vse študije izvedene le na celični ravni. Razlogi so v prekrivanju vzbujevalne valovne dolžin UCNP z absorpcijskim pasom vode (~980 nm), kar vodi v segrevanje izpostavljenega tkiva. To težavo lahko rešimo z vzbujevalno svetlobo manjše valovne dolžine (~915 nm) ali uporabo drugih ionov kot senzibilizatorjev (npr. neodijev ion, Nd³⁺). Omejitve pri pogostejši uporabi UCNP so tudi zaradi njihove razmeroma majhne svetlosti, kar rešujejo z uvedbo dodatnih dopantnih ionov ter z manipulacijo površine nanodelcev (Del Rosal, 2019).

Poleg tega sta ključni njihova biokompatibilnost in potencialna citotoksičnost, saj raziskave potrjujejo, da so nekateri nanodelci topni v vodnih medijih. Testi raztopljanja so pokazali, da se v suspenzijah nanodelcev pojavi največ raztopljenih fluoridnih ionov, F⁻, in sicer med 0,2 in 1,1 mol %, medtem ko je delež raztopljenih lantanoidnih ionov, Ln³⁺, manjši, med 0,2 in 0,8 mol %. Pri tem je stopnja raztopljanja znatno večja pri UCNP s kubično (α -NaYF₄), termodinamsko manj stabilno matrico. Zaradi velikega potenciala uporabe UCNP na osnovi NaYF₄ v biomedicinskih aplikacijah so nujne nadaljnje podrobnejše raziskave raztopljanja v vodi in potencialne citotoksičnosti (Lisjak, Dissolution of upconverting fluoride nanoparticles, 2015).

Precej majhno število nanodelcev je bilo doslej v celoti rutinsko preizkušanih v kliničnih študijah, zato je še vedno premalo podatkov o razmerju med koristjo in tveganjem (ang. benefit-risk ratio), da bi zadostili strogim regulatornim zahtevam za klinično uporabo (Oliveira, 2019).

Pri sistematičnem pregledu je bilo ugotovljeno, da je med objavami raziskav za uporabo UCNP v biomedicinskih aplikacijah le 18 odstotkov takih, ki vsebujejo preizkuse toksičnosti in varnosti. Večina vsebuje le študije toksičnosti *in vitro*, na celičnih kulturah in tkivih. Mnoge so bile izvedene le v omejenem območju koncentracij in času izpostavljenosti, zato ne upoštevajo razgradnje in možnih transformacij UCNP v bioloških okoljih (Oliveira, 2019).

1.3.4 CITOTOKSIČNOST UCNP

Nanodelci lahko zaradi svoje majhnosti vstopajo v celice in povzročijo poškodbe. Majhna velikost vpliva tudi na kinetiko raztopljanja, ki je pri manjših nanodelci hitrejša kot pri večjih, kar lahko povzroči povečano sproščanje potencialno toksičnih ionov (Lisjak, 2016).

Čeprav z lantanoidi dopirane UCNP prištevamo med kemijsko nestrupene, še vedno obstaja nevarnost agregacije in nalaganja UCNP v celicah in tkivih, kemijske razgradnje UCNP, sproščanja lantanoidnih ionov ali interakcije med UCNP in drugimi spojinami *in vivo* (Gnach A. L., 2015).

Neželeni učinki so lahko posledica sproščanja toksičnih ionov (fluoridnih, lantanoidnih) ob raztopljanju nanodelcev. Njihovo raztopljanje je najobsežnejše v raztopinah fosfatov zaradi hkratnegaobarjanja netopnih fosfatov lantanoidov, raztopljam pa se tudi v čisti vodi. Zaradi tega lahko pride do citotoksičnosti zaradi kopiranja lantanoidnih in fluoridnih ionov v določenih celicah in/ali zaradi interakcije lantanoidnih ionov s celičnimi fosfati in fluoridnimi ioni (Gnach A. B., 2012).

1.3.4.1 Fluoridni ioni

Dokazano je, da v majhnih količinah fluoridni ioni zmanjšujejo nastanek kariesa in delno obnavljajo minerale v zobeh ter imajo ključno vlogo pri ohranjanju plodnosti, aktivaciji encimov in proizvodnji krvnih celic (Kabir, 2020). Po drugi strani ima prekomeren vnos lahko negativne posledice. Natančen mehanizem toksičnosti fluoridnih ionov sicer ni znan, je pa povezana z njihovo visoko biološko in kemijsko reaktivnostjo. Splošni učinki fluoridnih ionov na zdravje ljudi vključujejo prizadeta ali poškodovana mehka tkiva, mišice, eritrocite, sluznico prebavil, vezi, semenčice, ščitnico in drugo. Številne študije so pokazale, da so ti učinki lahko povezani s prostimi radikali in oksidativnim stresom, vendar mehanizem ni povsem pojasnjen (Kabir, 2020).

Citotoksični učinek je močno odvisen od ravni, pogostosti in trajanja izpostavljenosti. Na celični ravni lahko presežek fluoridnih ionov povzroči kromosomske anomalije in genetske mutacije, vpliva na biosintezo DNK in beljakovin, povzroči spremembe v celični morfologiji, spreminja pH in poruši elektrolitsko ravnovesje, škoduje celični površini, mitohondrijem, endoplazemskemu retikulumu, jedru itd. (Johnston, 2020) (Kabir, 2020). Fluoridni ioni lahko zamenjujejo OH-skupine, kar lahko povzroči zobno ali skeletno fluorozo. Prekomerna izpostavljenost vpliva tudi na delovanje ledvičnih, jetrnih in nevronskeh sistemov (Kabir, 2020).

1.3.4.2 Ioni redkih zemelj (lantanoidov)

V nanodelcih, dopiranih z lantanoidi, so lantanoidni ioni vgrajeni v kristalno matrico in zato ne morejo prosto difundirati v celice. Težava nastane pri raztapljanju nanodelcev (Gnach A. L., 2015) .

Znano je, da lantanoidni ioni niso zelo strupeni, kljub temu pa lahko vplivajo na beljakovine in biološke molekule v organizmu, saj z interakcijami motijo aktivnost prenosa elektronov oz. ionov v celični membrani, kar povzroči oksidativne poškodbe ali peroksidacijo lipidov (Gnach A. L., 2015).

Na ta način lahko poškodujejo membrane mitohondrijev in celične membrane, poškodujejo mRNK in genski zapis DNK, vplivajo na delovanje proteinov, škodujejo lizosomom in posledično sprožijo vnetni odziv (Elsaesser, 2012).

Kronična izpostavljenost lantanoidom lahko povzroči pljučnico in akutno vnetje. Intravensko dajanje kloridov lahko poveča prepustnost žil za snovi z nizko molekulsko maso ter povzroči nekrozo v jetrih in vranici (Gnach A. L., 2015).

Ugotovljen je bil vpliv lantanoidov na zmanjšanje vsebnosti holesterola, kolagena, elastina in aktivnosti nekaterih encimov (Gnach A. L., 2015).

Znana je toksičnost lantanoidnih $3+$ ionov (Ln^{3+}) v kombinaciji s fosfati, saj se z njimi obarjajo in tvorijo igličaste strukture. Tudi pogosto uporabljen dopand gadolinij Gd^{3+} povezujejo z nefrotoksičnostjo (Oliveira, 2019).

1.3.5 BIOKOMPATIBILNOST UCNP IN ZAŠČITNE PREVLEKE

Toksične lastnosti UCNPs se lahko zmanjšajo z ustrezno izbrano površinsko prevleko, ki omogoča boljšo koloidno stabilnost in biokompatibilnost (Oliveira, 2019).

Raziskave UCNPs morajo vsebovati študije:

- fizično-kemijskih lastnosti,
- možnih interakcij z biološkim okoljem in
- *in vitro* ter *in vivo* toksičnosti (Oliveira, 2019).

Najpomembnejše tehnike, ki so potrebne za preučevanje fizično-kemijskih lastnosti in stabilnosti UCNP, so:

- merjenje zeta potenciala,
- presevna elektronska mikroskopija (TEM) v kombinaciji z energijsko disperzijsko rentgensko spektroskopijo (EDXS)
- rentgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS) (Oliveira, 2019).

Za biomedicinske aplikacije je treba nanodelce uporabljati v vodnih medijih. Številni nanodelci, zlasti dopirani z lantanoidi, so po sintezi hidrofobni. Zato so nujni postopki za izboljšanje njihove koloidne in kemične stabilnosti v vodnih medijih (Labrador-Páez, 2022).

S koloidno stabilnostjo se preprečuje vsakršna agregacija UCNP v bioloških sistemih, ki bi lahko toksično vplivala na organizem. S kemijsko stabilnostjo se ohranjata sestava in struktura UCNP pri ustreznih (bio)pogojih (Labrador-Páez, 2022).

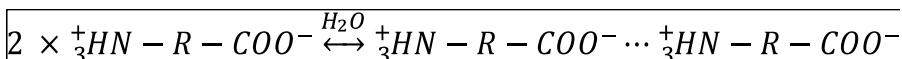
UCNP na osnovi NaYF₄ se delno razapljuje v vodnem okolju, zato je nujna sinteza različnih tipov prevlek, ki bi nanodelce učinkovito zaščitile pred razapljanjem (Vozlič & Černič, 2021).

Za nanodelce, dopirane z lantanoidi, so bili razviti številni postopki spremnjanja površine:

- odstranjevanje ligandov,
- izmenjava ligandov,
- prevleka iz silicijevega dioksida,
- sestavljanje polielektrolitskih plasti in
- prevleke iz amfibilnih polimerov (Labrador-Páez, 2022).

Kot primerni za funkcionalizacijo površine so se izkazali ioni dvojčki ali zwitterioni, ki vsebujejo nasprotno nabite funkcionalne skupine. Ioni dvojčki imajo dve različni funkcionalni skupini, kislinsko in bazično. Ena od skupin se s koordinativnimi vezmi prek kondenzacije veže na površino nanodelca, medtem ko druga zagotovi reaktivnost površine za nadaljnjo reakcijo z biološkimi molekulami (Mahmoudi, 2016).

Primer so aminokisline s kislinsko karboksilno skupino ($-COOH$) in bazično aminoskupino ($-NH_2$). Pri fizioloških pogojih, kar pomeni v nevtralnem pH, so kislinske skupine disociirane (v obliko $-COO^-$) in imajo negativen naboj, bazične skupine so protonirane (npr., $-NH_3^+$) in imajo pozitiven naboj. Zaradi nasprotnega naboja se ioni dvojčki elektrostatsko privlačijo, tvorijo asociate, npr.:



Enačba 1: Enačba asociacije ionov dvojčkov

1.3.5.1 Alendronska kislina

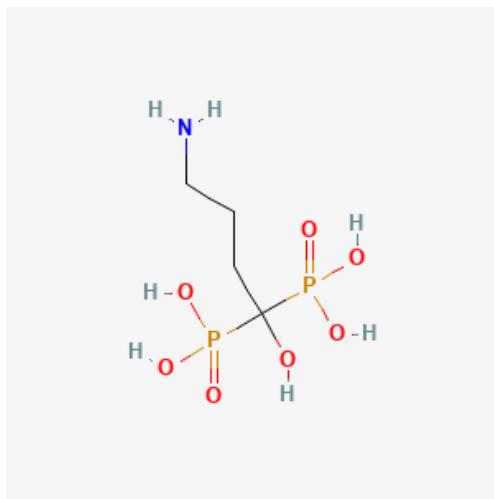
Med zwitterione ali ione dvojčke spada tudi alendronska kislina, z molekulsko formulo C₄H₁₃NO₇P₂ in IUPAC imenom (4- amino-1-hidroksi-1- fosfonobutil)fosfonska kislina (Slika 10) (PubChem, 2023) .

V nevtralnem pH vsebuje dve negativno nabiti fosfonski skupini in eno pozitivno nabito aminoskupino. Z eno ali dvema fosfonskima skupinama se veže na površino nanodelcev (Pujari, 2014), reaktivni primarni amini pa zagotovijo reaktivnost površine za nadaljnjo reakcijo z biološkimi molekulami.

Alendronska kislina uvrščamo med bisfosfonate, kemično stabilne derivate anorganskega pirofosfata (PubChem, 2023), v katerih sta dve fosfatni skupini vezani na osrednji ogljikov atom.

Uporablja se za zdravljenje nekaterih oblik osteoporoze in Pagetove bolezni. Zaradi svoje hidrofilnosti in kislih centrov na fosfonskih skupinah ima večjo afiniteto do kostnega minerala (vežejo se na kristale hidroksiapatita) kot za privzem skozi celično membrano v mehkih tkivih. Preprečuje delovanje encima, ki je bistven za nastanek osteoklastov, in na ta način preprečuje resorpcijo kosti in povečuje kostno gostoto (Bigi, 2018).

Kot zdravilno učinkovino jo najdemo v več zdravilih za preprečevanje in zdravljenje osteoporoze (npr. Alenax®, Fosavance®) (Nguyen, 2016).



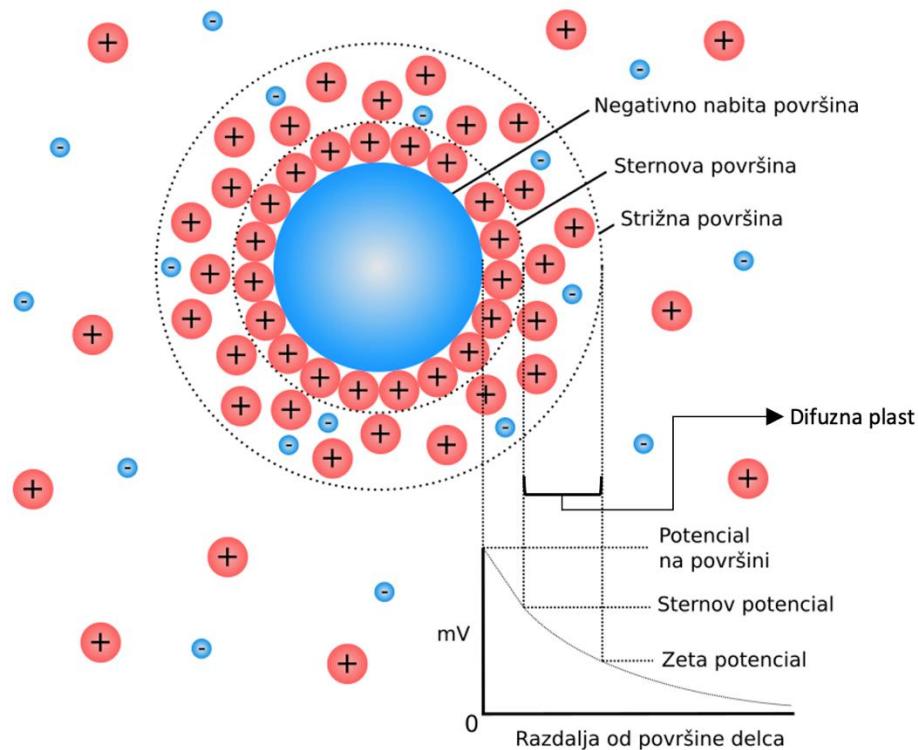
Slika 10: Struktura molekule alendronske kisline (PubChem, 2023)

1.4 ZETA POTENCIAL

Zeta potencial ali elektrokinetični potencial je merilo za gostoto površinskega naboja delcev v suspenziji v polarnem topilu. Na podlagi zeta potenciala lahko napovemo stabilnost delca v koloidnem sistemu.

Nabita površina nanodelcev v polarnem topilu privlači nasprotno nabite ione. Na ta način okoli delca nastane ionski dvojni sloj nasprotne nabitih ionov (Rieger, 1994). Nanodelec in z njim premikajoči se ioni tvorijo elektrokinetično enoto, ki se giblje v topilu v električnem polju. Otto Stern je ugotovil, da elektrokinetična plast ni homogena. Plast nasprotnih ionov tik ob površini delca je gosta (Sternova ravnina, Slika 9), se pa redči z oddaljenostjo od površine. V tej bolj redki, difuzni plasti so tudi ioni z nabojem enakega predznaka kot nabolj površine (ko-ioni). Meja med okoliško mirujočo raztopino in elektrokinetično enoto se imenuje strižna površina. Električni potencial na njej se imenuje zeta potencial (ζ) (Slika 11). Večja kot je absolutna vrednost zeta

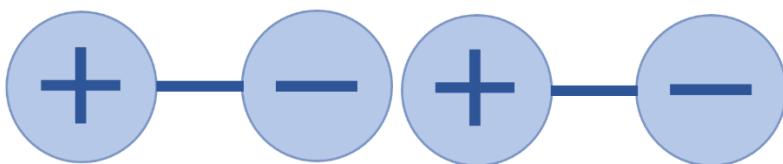
potenciala, večja je gostota površinskega naboja, katere posledica je močan elektrostatski odboj med delci in s tem tudi večja koloidna stabilnost (Rieger, 1994). Kot stabilne suspenzije navadno obravnavamo tiste, pri katerih je vrednost absolutnega zeta potenciala nad 30 mV (instruments, 2012). Točko, kjer je zeta potencial enak 0, definiramo kot izoelektrično točko. V njej suspenzija ni stabilna, saj je elektrostatska stabilizacija delcev zaradi pomanjkanja površinskega naboja onemogočena (Salgin, 2012).



Slika 11: Zeta potencial (Kolman, 2021)

2 NAMEN DELA

Nanodelci NaYF_4 so v vodnih medijih, bogatih s fosfati, nagnjeni k raztpljanju, kar lahko vodi v prisotnost fluoridnih ionov v telesu, do poškodb celičnih membran, genetskih napak ter številnih drugih neželenih učinkov. Primerno funkcionalizirane površine so zato ključne pri zagotavljanju boljše biokompatibilnosti nanodelcev. Za zaščito smo preučili zwitterione ali ione dvojčke, ki naj bi tudi sicer zagotavljali biokompatibilnost nanodelcem. Zwitterioni se z negativno nabito kislinsko skupino vežejo na nanodelce NaYF_4 , s čimer jih zavarujejo pred raztpljanjem in omogočijo njihovo potencialno uporabo v biomedicini. Vendar so zaradi nasprotnega naboja ioni dvojčki nagnjeni k tvorjenju asociatov (tj. parov dveh disociiranih molekul), kar lahko prepreči nastanek želenih prevlek. V našem primeru smo kot ion dvojček uporabljali alendronska kislina z eno aminoskupino $-\text{NH}_2$ in dvema fosfonskima skupinama $-\text{PO}(\text{OH})_2$ (Slika 12).



Slika 12: Shema tvorbe asociatov med ioni dvojčki

Namen naše raziskovalne naloge je bil poiskati čim boljše pogoje za uspešno aminofunkcionalizacijo nanodelcev NaYF_4 z alendronska kislino, ki bodo v vodnih medijih koloidno in kemijsko stabilni. Pri tem smo ciljali na vezavo alendronske kisline na površino nanodelcev prek fosfonske skupine. Prosta aminoskupina pa naj bi zagotavljala pozitiven površinski nabolj in elektrostatsko koloidno stabilizacijo. Obenem bi v nadaljevanju lahko nanodelce biokonjugirali prek proste aminoskupine, s čimer bi omogočili njihovo uporabo *in vivo*.

2.1 CILJI

- Na vnaprej sintetizirane nanodelce NaYF_4 , dopirane z Yb^{3+} in Er^{3+} , nanesti zaščitno prevleko alendronske kisline in s tem funkcionalizirati njihovo površino z aminoskupinami.
- S presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) preučiti morfologijo nanodelcev s prevleko iz alendronske kisline.
- S fluorescenčno spektroskopijo preveriti luminiscenco vgrajenih dopantov Yb^{3+} in Er^{3+} .
- Z meritvijo elektronske mobilnosti nabitih nanodelcev v koloidni suspenziji oceniti zeta potencial in pridobiti informacijo o koloidni stabilnosti sintetiziranih prevlečenih nanodelcev.

2.2 HIPOTEZE

- Manjša nominalna površinska gostota molekul AL, vezanih na nanodelce NaYF_4 , bo preprečila nastanek asociatov in s tem zagotovila večjo gostoto prostih aminoskupin v zaščitni prevleki ter večjo koloidno stabilnost nanodelcev v fiziološkem pH.
- Alendronska kislina se bo pri počasnem dodajanju bolje vezala na površino nanodelcev. Nastanke asociatov bomo preprečili s počasnim dodajanjem alendronske kisline.
- Nanodelci bodo pri fluorescenčni spektroskopiji kljub sintetiziranim prevlekam izkazovali luminiscenčne lastnosti.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijski pribor in oprema

- analitska tehcnica AG 104 (Mettler Toledo, ZDA)
- centrifugi Eppendorf Centrifuge 5430 in 5804 (Eppendorf, Nemčija)
- pH-meter pH Lab 827 (Metrohm, Švica)
- presevni elektronski mikroskop JEOL 2100 (JEOL, Japonska)
- spektrofluorometer QuantaMaster 8000 (Horiba PTI, Japonska) s fotopomnoževalnikom Hamamatsu R2658 (Hamamatsu, Japonska)
- spektrofotometer UV-VIS Hewlett-Packard 8453 (Hewlett-Packard, ZDA)
- sušilniki SP-45 (Kambič, Slovenija)
- ultrazvočna kopel Sonis 4 GT (Iskra PIO, Slovenija)
- naprava za določanje zeta potenciala Anton Paar Litesizer 500

3.1.2 Kemikalije in uporabljene snovi

- Aceton, Ph. Eur. (Carlo Erba Reagents, Francija)
- Cikloheksan, Ph. Eur. (Sigma Aldrich, ZDA)
- Dietileter, p.a. (Merck, ZDA)
- Dušikova kislina (HNO_3), 68 % (VWR, ZDA)
- Klorovodikova kislina (HCl), 37 % (Carlo Erba Reagents, Francija)
- Natrijev hidroksid (NaOH), 98–100,5 % (Sigma Aldrich, ZDA)
- Natrijev alendronat trihidrat, 97 % (Alfa Aesar, Nemčija)
- Suspenzija nanodelcev NaYF_4 , sočasno dopiranih z Yb^{3+} in Er^{3+} (sintetizirani na Češki akademiji znanosti, Praga, 2021) v cikloheksanu (10 mg/ml) (Uliana Kostiva, 2021)
- Deionizirana voda

3.1.3 Programska računalniška oprema

- Program za analizo TEM-slik Digital Micrograph (Gatan Inc., ZDA)
- Program za urejanje podatkovnih tabel Microsoft Excel, Office 365 (Microsoft, ZDA)

3.2 METODE DELA

3.2.1 Sinteza prevlek nanodelcev NaYF₄ z alendronsko kislino

Za prevleko nanodelcev NaYF₄ smo uporabili molekule alendronske kisline, ki je dandanes pogosto uporabljeni v medicini. Gre za učinkovino, ki spada med bifosfonate in je uveljavljena v medicini kot nehormonsko zdravilo za zdravljenje osteoporoze (Rogers, 2008).

Za naš eksperiment je primerna predvsem zaradi dveh fosfonskih skupin, ki omogočata močnejšo vezavo zwitteriona na površino delca (Pujari, 2014). Zunanji sloj pozitivno nabitih aminoskupin omogoča nadaljnjo reakcijo nanodelcev z biološkimi molekulami v telesu.

3.2.1.1 Sinteza nanodelcev, dopiranih z erbijem (Er^{3+}) in iterbijem (Yb^{3+})

V naši raziskavi smo kot senzibilizator uporabljali Yb³⁺, kot aktivator pa Er³⁺, za katerega sta značilni rdeča in zelena svetloba, valovne dolžine med 650 in 545 nm (Azuel, 2004). Heksagonalne nanodelce, dopirane z Yb³⁺/Er³⁺ ($\beta\text{-NaYF}_4(\text{Yb},\text{Er})$), smo za namen raziskave pridobili z Akademije znanosti v Pragi na Češkem (Uliana Kostiva, 2021). Sintetizirali so jih po metodi visokotemperaturnega preobarjanja in so po končani sintezi obdani z molekulami oleinske kisline in dispergirani v cikloheksanu. Za nadaljnje delo, ko smo potrebovali hidrofilne nanodelce, smo oleinsko kislino s površine nanodelcev odstranili med sintezo zaščitnih prevlek.

3.2.1.2 Sinteza zaščitne prevleke

Izmed postopkov sinteze zaščitne prevleke smo za prevleko z alendronsko kislino uporabili metodo izmenjave ligandov, kemijske reakcije, pri kateri se en ligand zamenja z drugim. Pri raziskovalni nalogi smo oleinsko kislino na izhodnih nanodelcih substituirali z alendronsko kislino. Do izmenjave pride, ker ima fosfonska skupina večjo afiniteto do ionov lantanoidov.

Alternativna metoda izmenjave ligandov je odstranitev oleinske kisline v koncentrirani klorovodikovi kislini (Bogdan, 2011), vendar se nanodelci v tem primeru delno razapljujo. Iz tega razloga smo se pri našem delu tej metodi izognili.

3.2.1.3 Izračun količine alendronske kisline

Glede na želeno nominalno površinsko gostoto, izraženo kot število molekul alendronske kisline na nm² površine nanodelca, smo zatehtali ustrezeno količino alendronske kisline.

$$m_{AL} = \frac{N_{AL} \times M_{AL} \times 4 \times \pi \times r^2}{N_A}$$

Enačba 2: Izračun mase zatehtane alendronske kisline

m_{AL} = masa zatehtane alendronske kisline, N_{AL} = nominalna gostota alendronske kisline na površini nanodelca, M_{AL} = molska masa alendronske kisline, r = povprečni ekvivalentni premer nanodelcev, N_A = Avogadrova konstanta ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$).

Za raziskave smo pripravili z alendronsko kislino prevlečene nanodelce z nominalno gostoto 3 molekule/nm ($\text{NaYF}_4@\text{AL3}$) oziroma 10 molekul/nm ($\text{NaYF}_4@\text{AL10}$). Izračunali smo (Enačba 2), da potrebujemo 3,2 mg $\text{NaYF}_4@\text{AL3}$ in 12 mg $\text{NaYF}_4@\text{AL10}$ (Tabela 1).

3.2.1.4 Postopek sinteze zaščitne prevleke

- Najprej smo pH vode z 1 M HNO_3 uravnali na 2,0 V, nato smo v bučko dali vodo in cikloheksan v razmerju 3 : 1.
- Mešanico smo med mešanjem na magnetnem mešalu segrevali v oljni kopeli do 80 °C, s čimer smo zagotovili močnejšo vezavo alendronske kisline na nanodelce.
- Za sintezo smo uporabili trivratno bučko s povratnim hladilnikom.



Slika 13: Trivratna bučka s povratnim hladilnikom na magnetnem mešalu

- Med mešanjem smo s pipeto dodajali sintetizirane nanodelce NaYF₄ suspendirane v cikloheksanu, toliko časa, da smo dosegli reakcijsko koncentracijo 0,5 mg/ml.
- Postopoma smo v okvirno 10-minutnih časovnih intervalih v bučko dodajali izračunano količino prahu alendronske kislina (Tabela 1).

Postopno dodajanje AL je ena od ključnih razlik naše raziskovalne naloge v primerjavi z magistrsko nalogo Maše Vozlič (Vozlič M., 2021), v kateri so celotno maso alendronske kislino v bučko dodali naenkrat. Vseeno smo za primerjavo tudi mi en vzorec NaYF₄@AL3 pripravili z enkratnim dodatkom alendronske kislino.

Tabela 1: Količina snovi za sintezo prevlek.

SESTAVINE	NaYF ₄ @AL3	NaYF ₄ @AL10
suspenzija nanodelcev NaYF ₄ (Yb,Er) v cikloheksanu (10 mg/ml)	4 mL	4 mL
deionizirana voda	60 mL	60 mL
cikloheksan	20 mL	20 mL
alendronska kislina	3,2 mg	12 mg

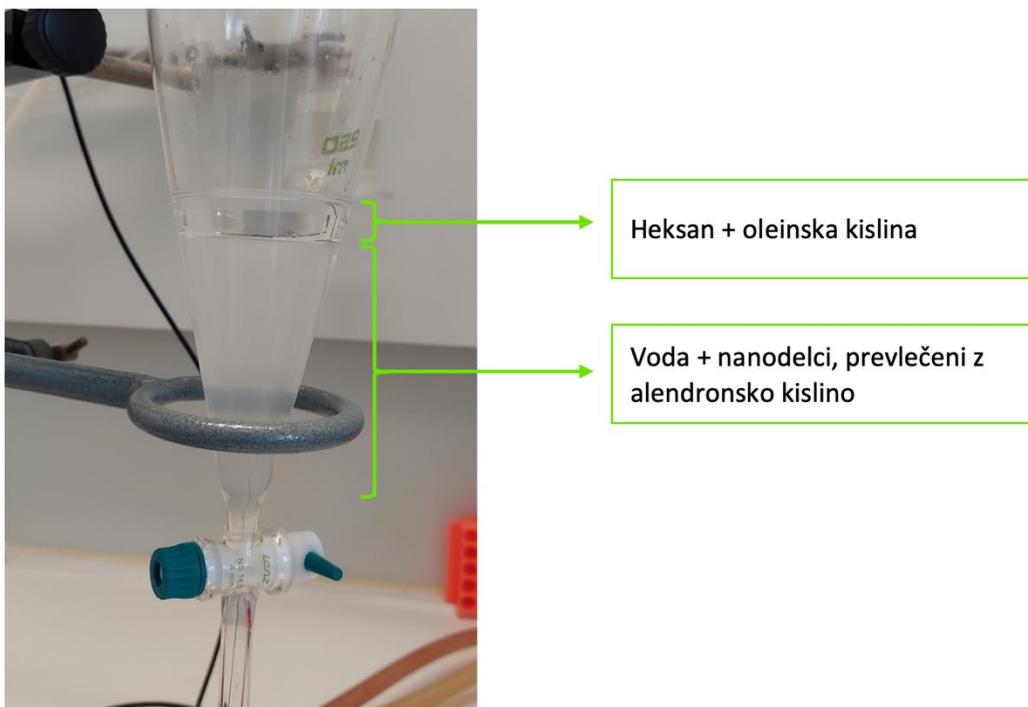
3.2.1.5 Ločevanje in čiščenje nanodelcev NaYF₄ z alendronsko kislino

- Po končani reakciji se je zmes ločila na dve fazi. V zgornji sta bila cikloheksan in odstranjena oleinska kislina, v spodnji vodni fazi pa hidrofilni nanodelci z alendronsko kislino na površini.
- Vodno fazo s prevlečenimi nanodelci smo s pomočjo lija ločnika ločili od cikloheksana (Slika 14) in jo pretočili v centrifugirko.
- Prevlečene nanodelce smo večkrat sprali z vmesnim centrifugiranjem. Posamezen postopek centrifugiranja je trajal 5 minut pri 7830 obratih/min, pri tem so se prevlečeni nanodelci ločili od preostale raztopine (Slika 15).



Slika 14: Centrifuga, ki smo jo uporabljali za spiranje.

- Pred začetkom spiranja smo v centrifugirko dodali približno 10 ml acetona in s pomočjo ultrazvočne kopeli premešali vsebino, da smo odstranili morebitno preostalo oleinsko kislino in cikloheksan.
- Sledilo je še štirikratno spiranje z deionizirano vodo. Končnemu ostanku nanodelcev z zaščitno prevleko smo dodali približno 20 mL deionizirane vode in vsebino dispergirali v ultrazvočni kopeli (Slika 16).



Slika 15: Ločevanje zmesi po izmenjavi ligandov.



Slika 16: Usedlina $\text{NaYF}_4@\text{AL}$ po 4. spiranju

3.2.2 Karakterizacija in analiza vzorcev nanodelcev NaYF₄ z alendronsko kislino

3.2.2.1 Presevna elektronska mikroskopija in energijska disperzijska spektroskopija rentgenskih žarkov

3.2.2.1.1 Opis metode presevne elektronske mikroskopije in energijske disperzijske spektroskopije rentgenskih žarkov



Slika 17: Presevni elektronski mikroskop Jeol JEM-2100 (<http://cemm.ijz.si/sl/oprema/>)

Presevna elektronska mikroskopija (ang. *Transmission Electron Microscopy – TEM*) je pomembna analitična metoda, ki se uporablja v nanotehnologiji, znanosti o materialih itd. (Wikipedia, 2023). V presevnih elektronskih mikroskopih namesto vidne svetlobe uporabljamo elektrone, saj je njihova valovna dolžina precej krajša od velikosti atoma (manj kot 50 pm) (Wikipedia, 2023). Tako lahko na posebej pripravljenem vzorcu opazujemo obliko in določimo velikost nanodelcev. Določimo lahko tudi kristalno strukturo, v kombinaciji z različnimi mikroanalitskimi tehnikami pa kemijsko sestavo in valenčno stanje ionov.

Presevni elektronski mikroskop TEM je običajno sklopljen z aparaturo za energijsko disperzijsko spektroskopijo rentgenskih žarkov (ang. *Energy Dispersion X-Ray Spectroscopy – EDXS*). Metoda EDXS temelji na vzbujanju atomov z elektroni, pri čemer pri relaksaciji atom izseva karakteristične rentgenske žarke, ki jih nato detektiramo (Oxford Instruments, 2023).

3.2.2.1.2 Opis postopka dela

- Za vsak vzorec smo na bakreno nosilno mrežico z amorfno ogljikovo prevleko nanesli nekaj kapljic razredčene suspenzije prevlečenih nanodelcev.

- Vzorec smo posušili in analizirali s presevnim elektronskim mikroskopom JEOL 2100.
- Izmerili smo povprečni premer nanodelcev ter z energijsko disperzijsko spektroskopijo rentgenskih žarkov (EXDS) potrdili njihovo kemijsko sestavo.

3.2.2.2 Fluorescenčna spektroskopija

3.2.2.2.1 Opis metode

Optične lastnosti prevlečenih nanodelcev in s tem njihovo mogočo uporabnost v biomedicini smo ugotavljali s pomočjo fluorescenčne spektroskopije, oblike elektromagnetne spektroskopije, ki analizira fluorescenco vzorca. Pri tej metodi uporabljamo snop svetlobe, običajno ultravijolične, ki vzbudi elektrone v določeni snovi in povzroči njihovo izsevanje svetlobe (Wikipedia, 2023). Uporabljali smo svetlobo valovne dolžine 980 nm, ki jo absorbirajo Yb^{3+} . S primerjavo golih nanodelcev in nanodelcev, prevlečenih z molekulami alendronske kisline, smo ugotavljali vpliv prevlek na intenziteto fluorescence ter preverjali, kako zaščitna prevleka vpliva na intenziteto fluorescence.

3.2.2.2.2 Opis postopka dela

Vzorec nanodelcev z znano koncentracijo v vodi oziroma cikloheksanu prenesemo v kvarčno kiveto. Optične meritve vzorcev smo izvedli pri sobni temperaturi na spektrofluorometru QuantaMaster 8000, opremljenem s fotopomnoževalnikom Hamamatsu R2658. Pri merjenju smo uporabili emisijsko mrežico z gradacijo 1200 gr/mm ter širino odprtine 2 nm. Dobljene fluorescenčne spekture smo normirali glede na izhodno koncentracijo vzorca, tako da so bili končni rezultati med seboj primerljivi.



Slika 18: Optični spektrofluorometer Horiba-PTI QuantaMaster 8000 (IJS, 2023)

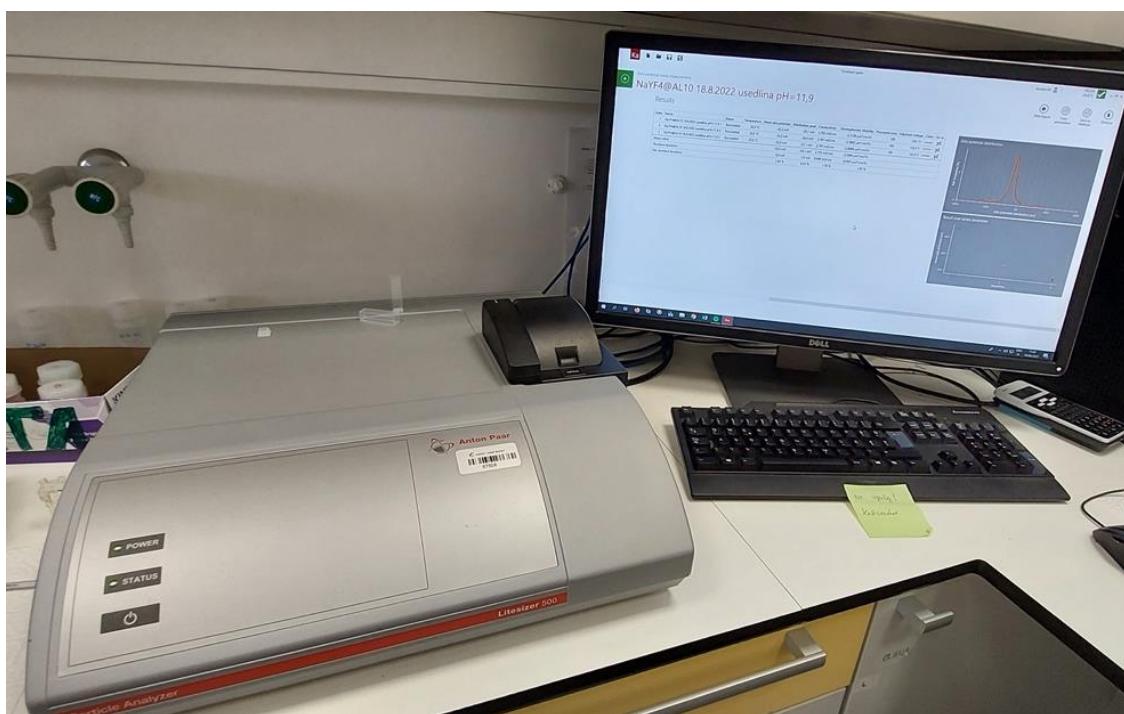
3.2.2.3 Zeta potencial

3.2.2.3.1 Opis metode

Zeta potencial določimo iz meritve elektroforetske mobilnosti nabitih delcev v polarnem topilu. Delci se v električnem polju gibljejo proti nasprotno nabitim elektrodam in to premikanje delcev instrument zazna. Večji kot imajo naboja, hitreje se gibljejo in večji je njihov zeta potencial.

3.2.2.3.2 Opis postopka dela

Delce v vodni fazi smo razredčili do koncentracije 0,1 mg/ml. Kislost oziroma bazičnost suspenzij smo uravnavali z dodajanjem 0,1 M in 0,01 M HCl oziroma NaOH, pH smo merili s pH-metrom. Za merjenje zeta potenciala nanodelcev smo uporabljali napravo za določanje zeta potenciala Anton Paar Litesizer 500 (Slika 19). Zeta potencial smo merili v pH-območju med 3 in 12, z okvirnimi vmesnimi pH-intervalli 1,0. Pri vsakem vzorcu smo izvedli 10 meritev pri različnih pH, zapisali povprečno vrednost izmerjenega zeta potenciala ter standardno napako. Spremljali smo, pri kateri vrednosti pH bo izmerjeni zeta potencial enak nič, ki sovpada z izoelektrično točko suspenzije.



Slika 19: Naprava za določanje zeta potenciala

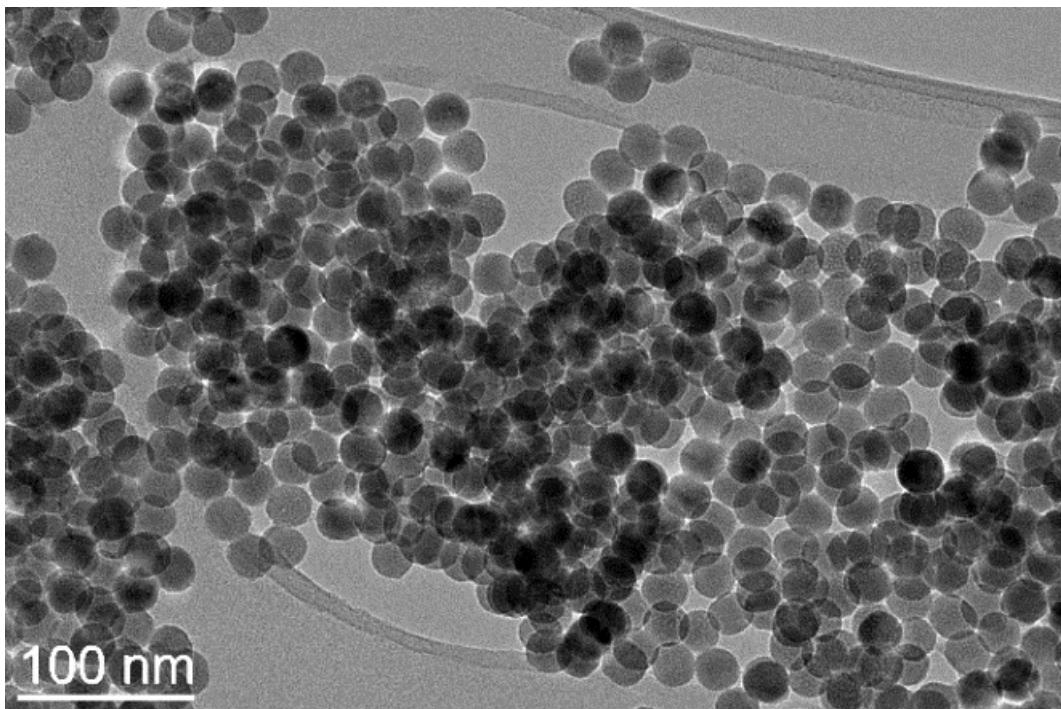
4 REZULTATI Z INTERPRETACIJO

4.1 MORFOLOGIJA IN KEMIJSKA SESTAVA PREVLEČENIH NANODELCEV

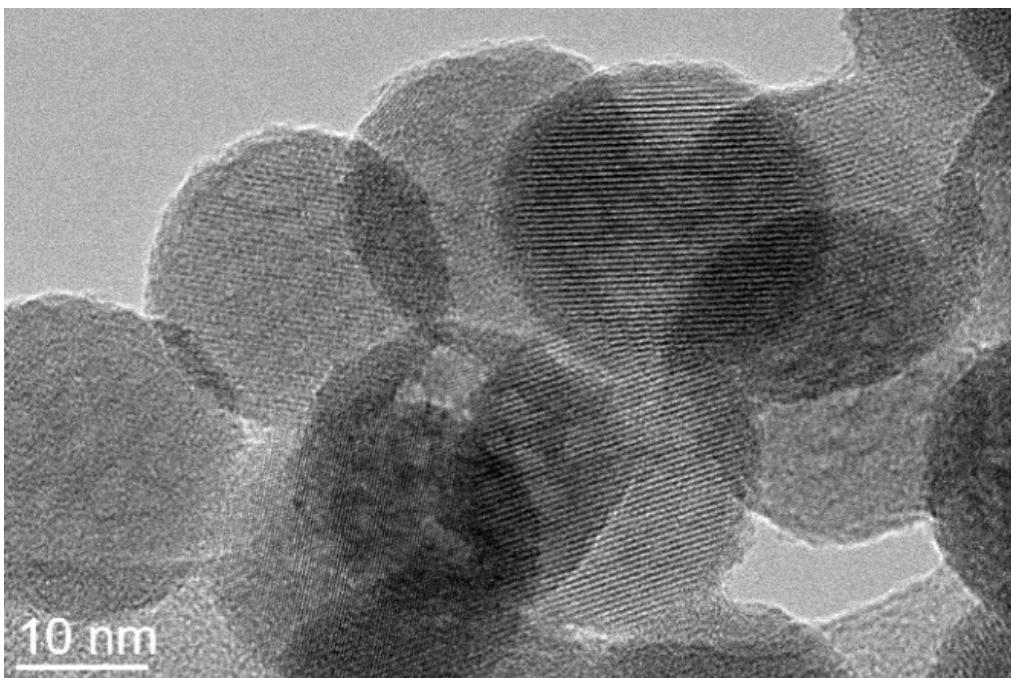
4.1.1 Vzorec 1 ($\text{NaYF}_4@\text{AL3}$)

Prevlečeni nanodelci so okrogle oblike in njihov premer je okvirno 25 nm (Slika 20). Približno 1 nm debela amorfna plast je opazna na površini nekaterih nanodelcev (Slika 21), vendar ne moremo takoj sklepati, da gre za vezano AL. Amorfna plast je lahko tudi zgolj posledica amorfizirane površine zaradi interakcije nanodelcev z elektronskim snopom.

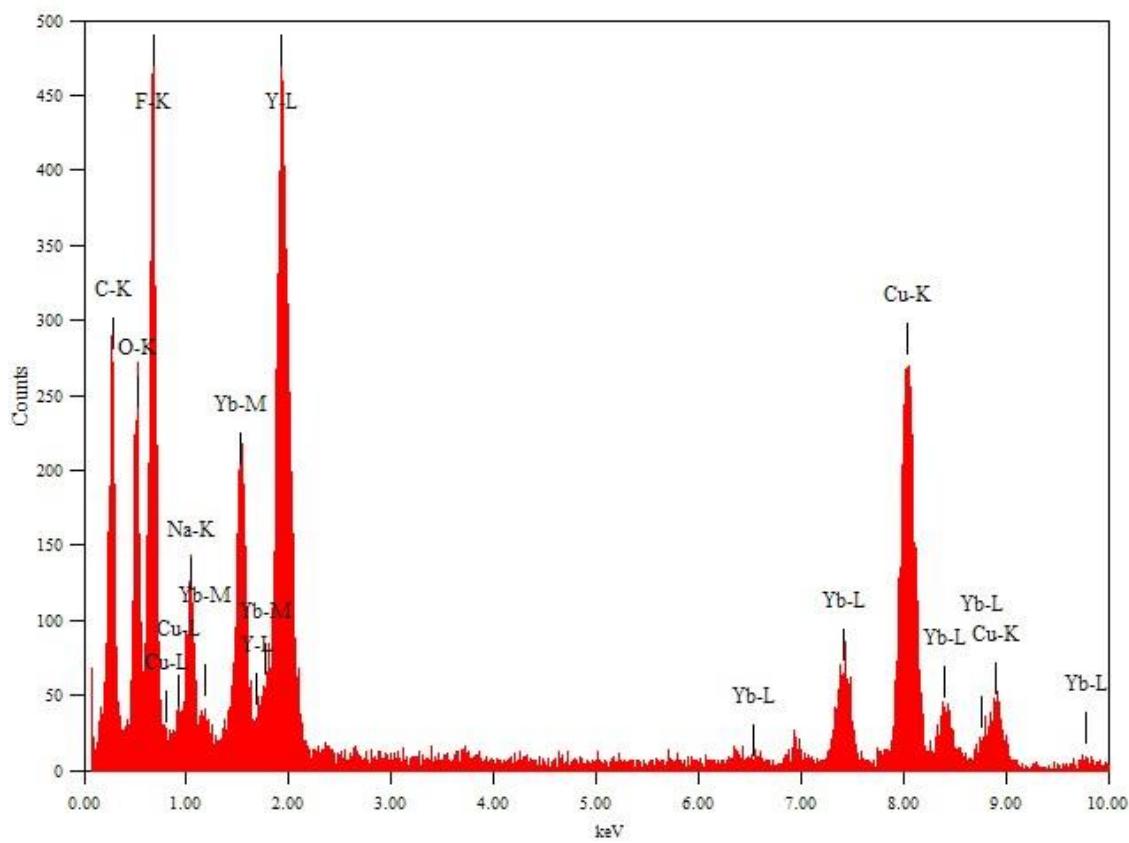
Z energijsko disperzijsko spektroskopijo rentgenskih žarkov (EDXS) smo potrdili predvideno kemijsko sestavo nanodelcev iz elementov Na, Y, F, Yb (Slika 22). Er je v vzorcu premalo, zato nam ga z EDXS ni uspelo potrditi. Dokazali smo ga s fluorescenčno spektroskopijo, pri kateri smo zaznali fluorescenčni spekter z emisijskimi vrhovi, značilnimi za Er^{3+} (Slika 23). Tudi fosforja (prisoten v alendronski kislini) z EDXS nismo zaznali, saj je nominalna površinska gostota alendronske kisline 3 molekule/ nm^2 pod mejo detekcije. Vendar lahko uspešno vezavo prevleke dokažemo s prenosom nanodelcev iz cikloheksana v vodno fazo, ki brez prisotnosti alendronske kisline ne bi bil mogoč.



Slika 20: Prevlečeni nanodelci $\text{NaYF}_4@\text{AL3}$



Slika 21: Prevlečeni nanodelci $\text{NaYF}_4@\text{AL3}$

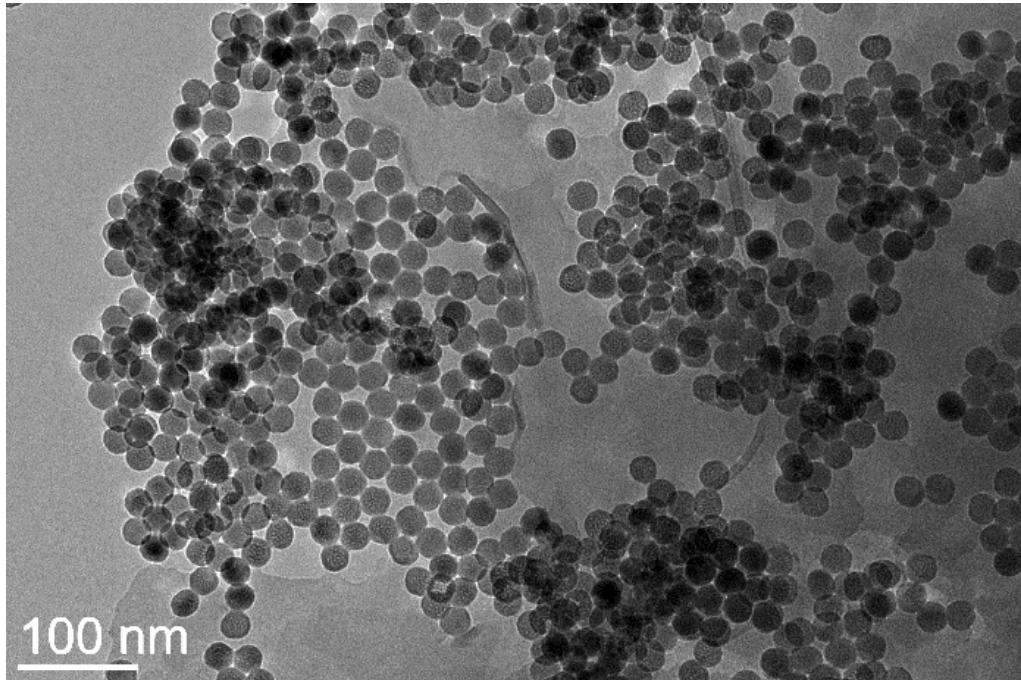


Slika 22: Kemijska sestava nanodelcev $\text{NaYF}_4@\text{AL3}$ (metoda EDXS)

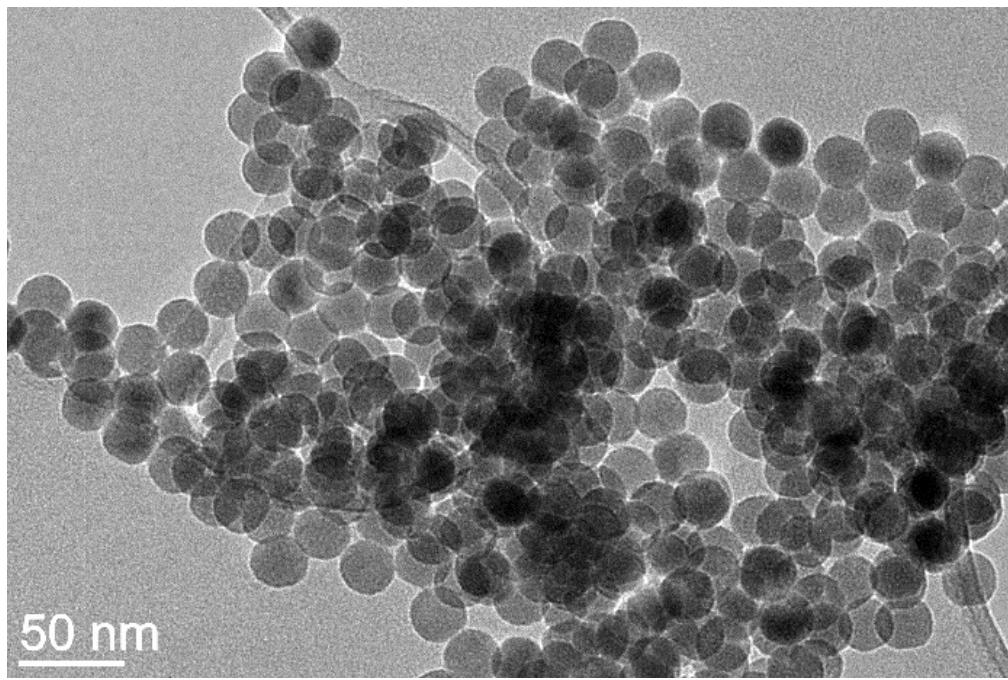
4.1.2 Vzorec 2 ($\text{NaYF}_4@\text{AL10}$)

Vzorec 2 se od vzorca 1 razlikuje po nominalni površinski gostoti, ki znaša 10 molekul/ nm^2 . V morfologiji in strukturi delcev po pričakovanjih nismo opazili razlike. Premer delcev je namreč

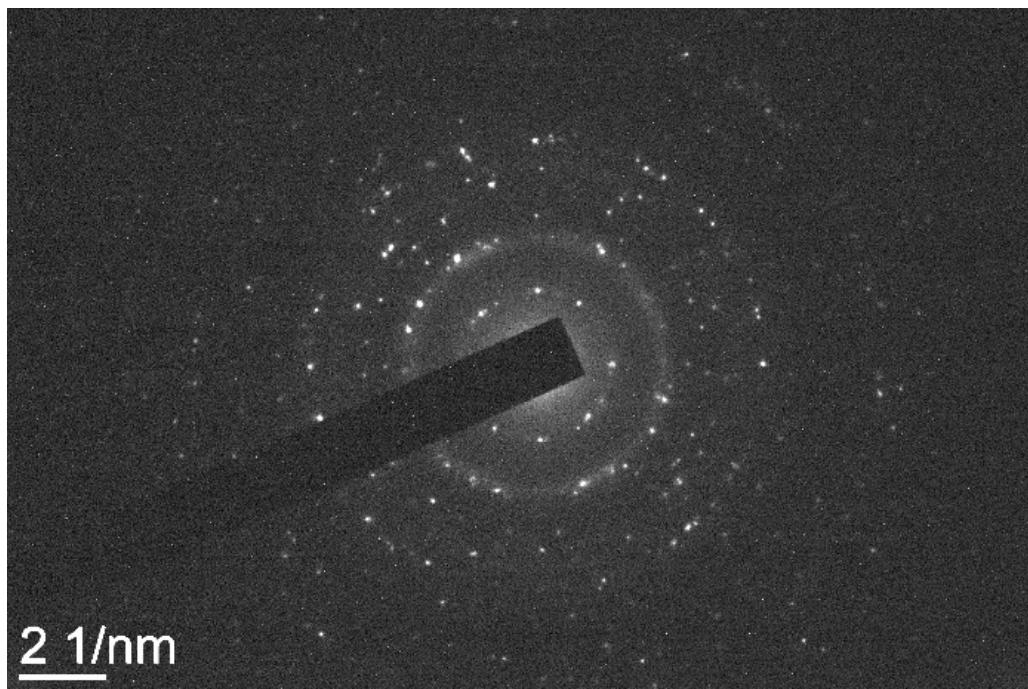
približno 25 nm (Sliki 23 in 24), matrica pa je heksagonalna (Slika 25). Kemijska sestava vzorca 2 je bila podobna prejšnji, vendar nam je v nasprotju z vzorcem 2 z EXDS na nekaterih območjih vzorca uspelo zaznati tudi fosfor in erbij (Slika 26). Sklepamo lahko, da je gostota sloja iz alendronske kisline pri vzorcu 2 večja kot pri vzorcu 1.



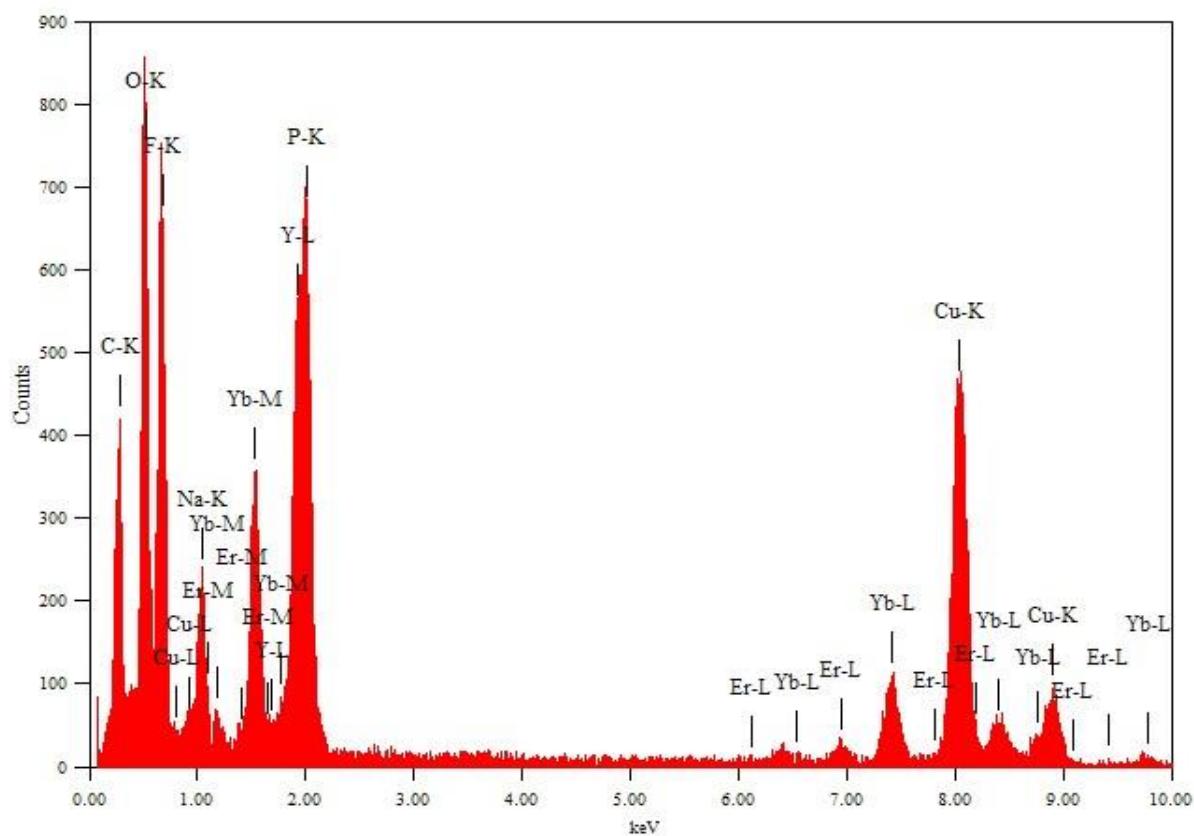
Slika 23: Prevlečeni nanodelci $\text{NaYF}_4@\text{AL10}$



Slika 24: Prevlečeni nanodelci $\text{NaYF}@\text{AL10}$



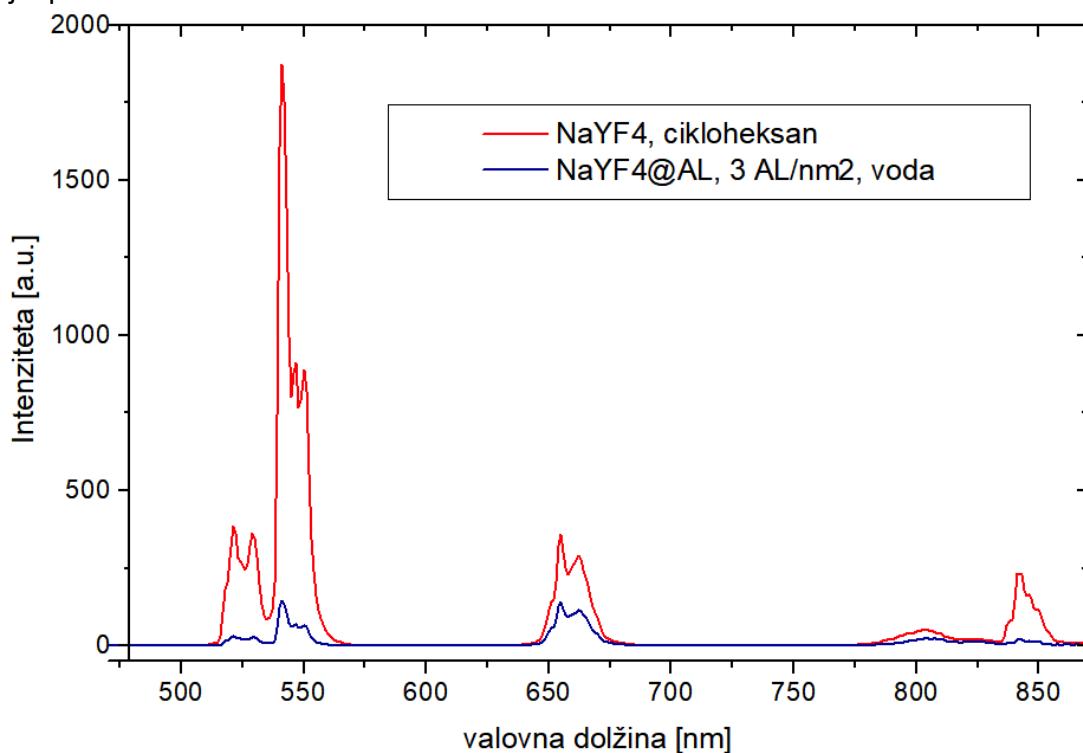
Slika 25: Heksagonalna matrica $\text{NaYF}_4@\text{AL10}$



Slika 26: Kemijska sestava nanodelcev $\text{NaYF}_4@\text{AL10}$

4.2 OPTIČNE LASTNOSTI PREVLEČENIH NANODELCEV

S fluorescenčno spektroskopijo smo primerjali luminiscenčne lastnosti golih sintetiziranih nanodelcev v cikloheksanu in prevlečenih nanodelcev v vodni fazi (Slika 27). Pri obeh smo opazili emisijske vrhove, značilne za Er^{3+} in Yb^{3+} , razlika je bila le v intenziteti luminiscenčnega sevanja. S prevleko nam je torej uspelo ohraniti optične lastnosti UCNPs. Znatno večja intenziteta fluorescence izhodnih nanodelcev v cikloheksanu je pričakovana, saj so nanodelci s prevleko iz alendronske kisline v vodi, v kateri je ugašanje fluorescence znatno, v nevodnih medijih pa ne.

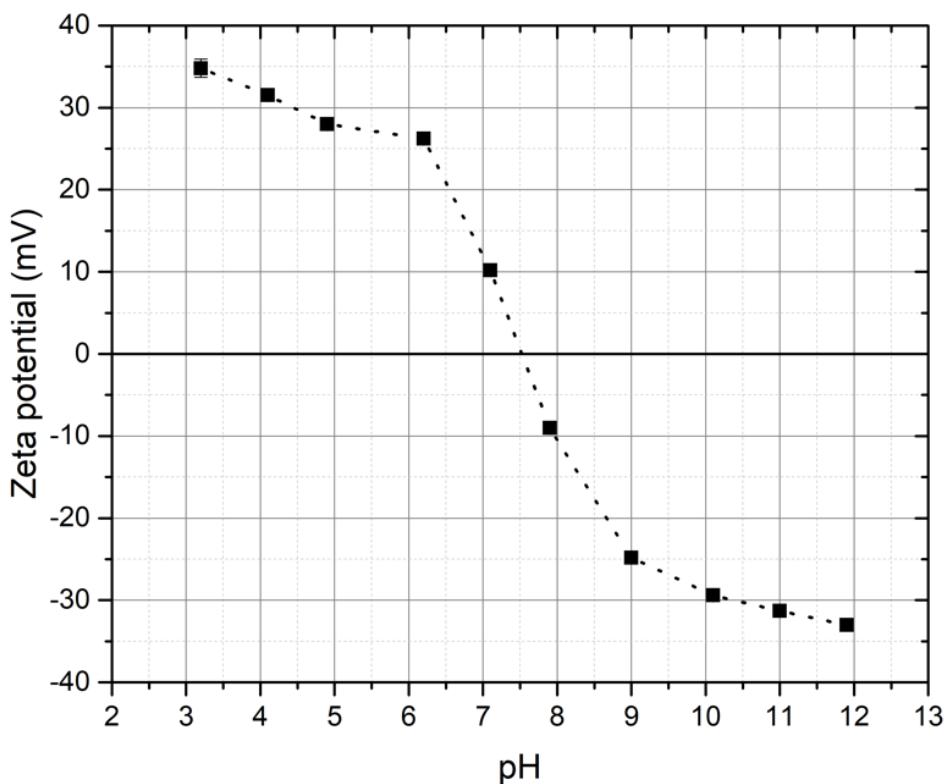


Slika 27: Rezultati fluorescenčne spektroskopije za $\text{NaYF}_4@\text{AL3}$

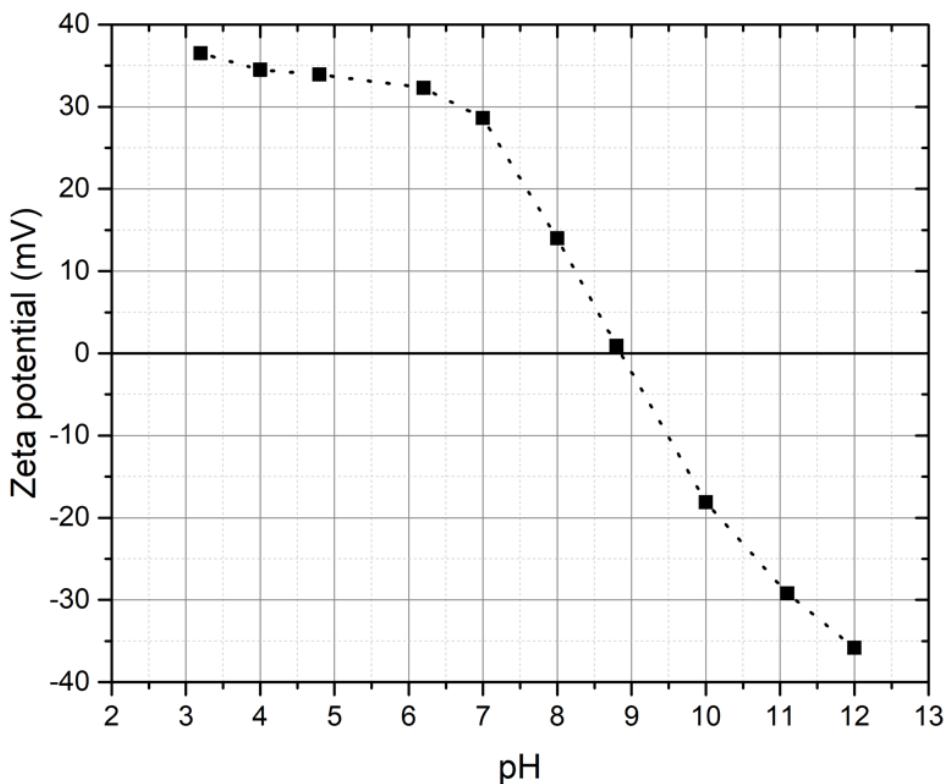
4.3 KOLOIDNA STABILNOST PREVLEČENIH NANODELCEV

Z meritvami zeta potenciala smo ugotavljali, s katerimi funkcionalnimi skupinami se je AL vezala na nanodelce ter kakšen je zaščitni sloj (ali je prišlo do tvorbe asociatov med zwitterioni ali ne). Prevleko smo pri obeh vzorcih sintetizirali z enako metodo in pod enakimi pogoji. Na grafih so predstavljene meritve zeta potenciala v odvisnosti od pH v vodnih suspenzijah za oba vzorca. Na podlagi primerjave fiziološkega pH = 7,4 in izoelektrične točke smo sklepali o uporabnosti prevlečenih nanodelcev *in vivo*.

Pri vzorcu NaYF₄@AL10 (Slika 28) je bil zeta potencial pozitiven v kislem območju pH (2,0–7,5) ter negativen v bazičnem pH (7,5–12,0). Izoelektrično točko smo določili pri pH = 7,5. To pomeni, da bi nanodelci NaYF₄@AL10 aglomerirali pri fizioloških pogojih. Poleg tega je pH izoelektrične točke primerljiv tistemu pri izhodnih nanodelcih (Vozlič, Dalton Trans, 2021). Naša hipoteza je bila, da se bo pri vzorcu NaYF₄@AL3 izoelektrična točka zaradi manjše gostote zaščitnega sloja (manj možnosti za tvorbo asociatov med molekulami AL) in prostih aminskih skupin pomaknila proti bazičnemu območju pH. To se je tudi uresničilo, saj je bil zeta potencial pozitiven v območju pH 2,0–8,8 in negativen v območju pH 8,8–12,0. Izoelektrična točka se je torej premaknila na pH = 8,8 (Slika 29). Prevleka z nominalno površinsko gostoto 3 molekule/nm² torej pri fiziološkem pH doseže večje absolutne vrednosti zeta potenciala (prib. 21 mV), kar pomeni boljšo stabilnost takšnih delcev *in vivo*. Obenem pa je izoelektrična točka v bazičnem pH znak prostih aminoskupin na površini nanodelcev.



Slika 28: Zeta potencial vzorca NaYF₄@AL3 (linije smo dodali z namenom boljše predstave)



Slika 29: Zeta potencial vzorca $\text{NaYF}_4@\text{AL10}$ (linije smo dodali z namenom boljše predstave)

Primerjali smo koloidno stabilnost vzorca z nominalno gostoto 10 molekul/ nm^2 ($\text{NaYF}_4@\text{AL10}$) pri postopnem dodajanju AL, ki je predstavljal tudi ključno razliko med našimi in predhodnimi raziskavami, z rezultati predhodnih raziskav, v katerih se je AL dodala naenkrat v celotni količini (Vozlič M., 2021). Ravno tako smo primerjali po postopnem dodajanju AL pripravljeni vzorec z nominalno gostoto 3 molekule/ nm^2 ($\text{NaYF}_4@\text{AL3}$) in zgolj za to primerjavo sintetizirani vzorec z enako nominalno gostoto in dodatkom AL naenkrat v celotni količini. Primerjali smo pH izoelektrične točke (Tabela 2), pridobljen iz meritev zeta potenciala. Iz rezultatov je razvidno, da je pri postopku, pri katerem je bila AL dodana v celotni količini naenkrat, pH izoelektrične točke precej bolj pomaknjen pod fiziološki pH, ki je pri 7,4. Pri vzorcu $\text{NaYF}_4@\text{AL3}$ je bil pH izoelektrične točke pri 7,0, kar je nižje od fiziološkega pH, pri vzorcu $\text{NaYF}_4@\text{AL10}$ pa še nižje, to je pri 6,5. Rezultata dokazujeta, da z dodajanjem AL v zmes v celoti in naenkrat sintetiziramo nanodelce s prevleko, ki imajo nižje absolutne vrednosti zeta potenciala pri fiziološkem pH, kar pomeni slabšo stabilnost takšnih delcev *in vivo*.

Tabela 2: Načini dodajanja Al pri različnih vzorcih nanodelcev

Vzorec	Način dodajanja AL	Nominalna površinska gostota (molekule/nm ²)	pH izoelektrične točke	referenca
NaYF ₄ @AL3	postopoma v roku 1h	3	~ 8,8	Naša raziskovalna naloga.
NaYF ₄ @AL10	postopoma v roku 1h	10	~ 7,5	Naša raziskovalna naloga.
NaYF ₄ @AL3 (naenkrat)	naenkrat dodali celotno količino	3	~ 7,0	Naša raziskovalna naloga.
NaYF ₄ @AL10 (Vozlič)	naenkrat dodali celotno količino	10	~ 6,5	(Vozlič & Černič, 2021)

5 RAZPRAVA

Raziskovali smo, kako način in količina dodane AL ter pH raztopine vplivajo na učinkovitost vezave AL na izhodne nanodelce NaYF₄ ter kakšen je vpliv prevleke na luminiscenčne lastnosti nanodelcev.

5.1 Učinkovitost vezave AL na nanodelce NaYF₄

Pri raziskovalni nalogi smo zaščitno prevleko vzorcev NaYF₄@AL3 in NaYF₄@AL10 sintetizirali s postopnim dodajanjem AL v trivratno bučko, naenkrat pa smo celotno količino AL dodali pri vzorcu NaYF₄@AL3 (naenkrat). Za primerjavo smo izbrali tudi vzorec NaYF₄@AL10 (Vozlič), kjer so prav tako celotno AL med sintezo dodali naenkrat (Vozlič & Černič, 2021).

Iz vrednosti izoelektričnih točk vseh vzorcev smo sklepali o enakomernosti sintetiziranega sloja in posledično o njihovi koloidni stabilnosti. Najdlje v bazično območje (pH = ~ 8,8) je pomaknjena izoelektrična točka našega vzorca NaYF₄@AL3. Najnižjo vrednost je imela izoelektrična točka vzorca NaYF₄@AL10 (Vozlič), kar pomeni večji delež asociatov na površini, ki jih najbolj določa fosfonska skupina in ne aminoskupina. Ugotovili smo, da je ob postopnem dodajanju liganda verjetnost tvorjenja asociatov med molekulami AL manjša, kar pomeni, da je prevleka enakomernejša, delci pa so bolj stabilni v fiziološkem okolju.

Tako lahko potrdimo tudi našo prvo hipotezo:

Alendronska kislina se bo pri počasnem dodajanju bolje vezala na površino nanodelcev. Nastanke asociatov bomo preprečili s počasnim dodanjem alendronske kisline.

Ioni dvojčki, v našem primeru molekule AL, so zaradi nasprotno nabitih funkcionalnih skupin nagnjeni k tvorjenju asociatov, kar vodi do neenakomernih in zato neprimernih prevlek. Možnost interakcije med molekulami AL v raztopini smo poskušali čim bolj omejiti in na ta način omejiti njihovo vezavo na nanodelce v obliki enojnega sloja s prostimi aminoskupinami na površini prevlečenih nanodelcev.

Postopek sinteze zaščitne prevleke smo izvedli z različnima količinama AL, ki naj bi se teoretično na površino nanodelcev vezala z nominalno površinsko gostoto 3 molekule/nm² (NaYF₄@AL3) in 10 molekul/nm² (NaYF₄@AL10). Ob merjenju zeta potenciala smo ugotovili, da se je izoelektrična točka vzorca NaYF₄@AL3 (za razliko od vzorca NaYF₄@AL10) zaradi manjše gostote zaščitnega sloja (manj možnosti za tvorbo asociatov med molekulami AL) in prostih aminoskupin pomaknila proti bazičnemu območju (pH = 8,8). To pomeni, da je absolutna vrednost zeta potenciala pri fiziološkem pH (7,4) višja pri manjši količini dodane AL. Torej je elektrostatski naboj med delci v vzorcu NaYF₄@AL3 večji, delci pa so posledično manj nagnjeni k agregirjanju pri fiziološkem pH.

S tem smo potrdili našo drugo hipotezo:

Manjša nominalna površinska gostota molekul AL, vezanih na nanodelce NaYF₄, bo preprečila nastanek asociatov in s tem zagotovila večjo gostoto prostih aminoskupin v zaščitni prevleki ter večjo koloidno stabilnost nanodelcev v fiziološkem pH.

5.2 Vpliv prevleke na fluorescenčne lastnosti nanodelcev NaYF₄

Ena od ključnih uporabnih lastnosti nanodelcev, dopiranih z lantanoidi, je njihova sposobnost luminiscence v spektralnem območju NIR med 650 in 1000 nm. Pomembno je, da se kljub sintetiziranemu dvosloju fluorescenčne lastnosti nanodelcev NaYF₄ ohranijo. Rezultati fluorescenčne spektroskopije so pokazali, da tudi prevlečeni nanodelci izkazujejo luminiscenco pri enakih valovnih dolžinah kot goli nanodelci, razlika se pojavi le v intenziteti luminiscenčnega sevanja.

S tem smo potrdili tudi našo tretjo hipotezo:

Nanodelci bodo pri fluorescenčni spektroskopiji kljub sintetiziranim prevlekam izkazovali luminiscenčne lastnosti.

6 ZAKLJUČEK

Zaradi svojih specifičnih optičnih lastnosti so nanodelci s pretvorbo navzgor pogosto preučevani, predvsem na področju humane medicine. Vendar do dokazane varnosti, učinkovitosti in kakovosti takih delcev ostaja še dolga pot. V sklopu raziskovalne naloge smo se osredotočili na zaščito UCNP pred raztplavljanjem, in sicer z optimizacijo sinteznih pogojev za čim bolj učinkovito sintetiziran zaščitni sloj.

Za zaščitno prevleko smo uporabili alendronska kislina (AL). Gre za učinkovino, ki spada med bifosfonate in je uveljavljena v medicini kot nehormonsko zdravilo za zdravljenje osteoporoze. Ima obliko zwitteriona, za zaščito je zelo primerna predvsem zaradi dveh fosfonskih skupin, ki omogočata močnejšo vezavo iona na površino delca. Z alendronska kislino (AL) smo z metodo izmenjave ligandov prevlekli vnaprej sintetizirane nanodelce NaYF₄. Slaba stran AL je, da zaradi svojih nasprotno nabitih skupin pri večji koncentraciji rada tvori associate, ki zmanjšujejo koloidno stabilnost.

Naš namen je bil poiskati čim boljše pogoje za uspešno vezavo AL na nanodelce NaYF₄. Pri prvem vzorcu NaYF₄@AL3 smo uporabili manjšo količino AL, ki je ustrezala nominalni površinski gostoti 3 molekule/nm², pri drugem vzorcu NaYF₄@AL10 pa je količina liganda ustrezala nominalni površinski gostoti 10 molekul/nm². Izkazalo se je, da manjša količina AL omogoča bolj homogeno prevleko, saj je na voljo manj molekul, ki bi med seboj tvorile associate. AL smo v reakcijsko zmes dodajali na dva različna načina: postopoma in naenkrat. Ko smo rezultate primerjali še z drugimi raziskavami, smo ugotovili, da se ob postopnem dodajanju ligand enakomerneje veže na površino nanodelca. Z metodo fluorescenčne spektroskopije smo preverili vpliv zaščitnega sloja na luminiscenčne lastnosti prevlečenih nanodelcev. Delci NaYF₄ so ohranili svoje optične lastnosti, zmanjšala se je le jakost njihovega luminiscenčnega sevanja. Kemijsko sestavo nanodelcev smo določili z energijsko disperzijsko spektroskopijo rentgenskih žarkov (EDXS). Pri vzorcu NaYF₄@AL3 nam sicer ni uspelo zaznati erbija Er, a smo ga že prej potrdili s fluorescenčno spektroskopijo. Tudi fosforja zaradi manjše količine dodane AL ni bilo v spektru EDXS, vendar že možen prenos delcev v vodo dokazuje prisotnost AL in s tem tudi P. Zaščitno prevleko smo opazovali s presevno elektronsko mikroskopijo, na njeno urejenost pa smo sklepali iz izmerjenega zeta potenciala. Višja absolutna vrednost zeta potenciala v določenem pH pomeni, da je delec koloidno stabilnejši. Pri fiziološkem pH = 7,4 je imel najvišjo vrednost zeta potenciala vzorec NaYF₄@AL3 (~ 22 mV). Naša raziskovalna naloga predstavlja zgolj enega izmed mnogih korakov k zagotavljanju biokompatibilnosti nanodelcev s pretvorbo navzgor v biomedicini. Dokazali smo pomen količine alendronske kislinske, dodane v reakcijsko mešanico, in potrdili prednost postopnega dodajanja pred enkratnim dodatkom liganda. Čeprav smo svoje hipoteze uspeli potrditi, je za nadaljnje raziskave nujno treba preveriti tudi ponovljivost eksperimentalnega dela. Pri nadalnjih raziskavah bi lahko ugotovitve naše raziskovalne naloge kombinirali z drugačnimi sinteznimi parametri (npr. temperatura mešanice, vrsta liganda, način izmenjave ligandov itd.). Vsekakor pa je potrebno v prihodnosti še dodatno temeljito preučiti obnašanje UCNP v telesu, njihovo citotoksičnost, kakovost in učinkovitost.

7 VIRI

- ACS Chemistry for Life. (11. Oktober 2010). *Explore Chemistry Chemical Landmarks Fullerens*. Pridobljeno iz Discovery of Fullerenes:
<https://www.acs.org/education/whatischemistry/landmarks/fullerenes.html>
- Anna Gnach, T. L. (1. September 2014). Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity. *Chemical Society Reviews*(6), 1561-1584.
- Anne Marie Helmenstine, P. (3. Maj 2019). *Lanthanides Properties and Elements*. Pridobljeno iz Thought.Com: <https://www.thoughtco.com/lanthanides-properties-606651>
- Azuel, F. (2004). Upconversion and anti-Stokes processes with f and d ions in solids. *Chemical reviews*, 139–173.
- Bigi, A. &. (2018). Calcium phosphates as delivery systems for bisphosphonates. *Journal of functional biomaterials*.
- Bogdan, N. V. (2011). Synthesis of Ligand-Free Colloidally Stable Water Dispersible Brightly Luminescent Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles. *Nano Letters*, 835-840.
- Bünzli, J.-C. G. (2013). Lanthanides. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.
- Chen, X. X. (2020). Lanthanide organic/inorganic hybrid systems: Efficient sensors for fluorescence detection. *Dyes and Pigments*, 108386.
- Del Rosal, B. &. (2019). Upconversion nanoparticles for in vivo applications: limitations and future perspectives. *Methods and Applications in Fluorescence*.
- Dr. Ronald Redwing, S. L. (13. Februar 2023). *Materials In Today's World*. Pridobljeno iz Hexagonal Close Packed Crystal Structure (HCP): <https://www.e-education.psu.edu/matse81/node/2134>
- Edinburgh Instruments Ltd. (6. Marec 2023). *Edinburg Instruments*. Pridobljeno iz What is the Difference between Luminescence, Photoluminescence, Fluorescence, and Phosphorescence?: <https://www.edinst.com/blog/photoluminescence-differences/>
- Elsaesser, A. &. (2012). Toxicology of nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 129-137.
- Gnach, A. B. (2012). Lanthanide-doped up-converting nanoparticles: Merits and challenges. *Nano Today*, 532-563.
- Gnach, A. L. (2015). Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity. *Chemical Society Reviews*, 1561-1584.
- H. W. Kroto, J. R. (1985). C₆₀: Buckminsterfullerene. *Nature Vol. 318*, 162-163.

Hao Dong, L.-D. S.-H. (2014). Energy transfer in lanthanide upconversion studies for extended optical applications. *Chem Soc Rev*, 44(6), 1608–1634.

IJS. (16. March 2023). *Optical Spectro-Fluorometer*. Pridobljeno iz IJS: <http://www-f7.ijs.si/facilities/optical-spectro-fluorometer/instruments>, M. (2012).

JE Hull, S. S. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human and Experimental Toxicology*, Vol. 34(12) 1318–1321.

Johnston, N. R. (2020). Principles of fluoride toxicity and the cellular response: a review. *Archives of toxicology*, 1051-1069.

Kabir, H. G. (2020). Fluoride and human health: Systematic appraisal of sources, exposures, metabolism, and toxicity. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1116-1193.

Kemijski inštitut. (11. February 2023). *Elektronska mikroskopija*. Pridobljeno iz Kemijski inštitut: <https://www.ki.si/odseki/d10-odsek-za-kemijo-materialov/l10-laboratorij-za-elektrokatalizo/elektronska-mikroskopija-in-katalizatorji/elektronska-mikroskopija/>

Kit Chapman, K. T. (29. Oktober 2018). *Feature*. Pridobljeno iz The most important village in chemistry: <https://edu.rsc.org/feature/the-most-important-village-in-chemistry/3009670.article>

Kolman, N. (2021). Reološke lastnosti vodnih raztopin izbranih soli polialilamina. Ljubljana.

Kumar, A. &. (2017). Methods for characterization of nanoparticles. V S. C. Nimesh, *Advances in nanomedicine for the delivery of therapeutic nucleic acids* (str. 43-58). Woodhead Publishing.

Labrador-Páez, L. K. (2022). Water: An Influential Agent for Lanthanide-Doped Luminescent Nanoparticles in Nanomedicine. *Advanced Optical Materials*.

Lazarini, F., & Brenčič, J. (1992). *Splošna in anorganska kemija*. Ljubljana: DZS.

Li, Z., Ding, X., Cong, H., Wang, S., Yu, B., & Shen, Y. (2020). Recent advances on inorganic lanthanide-doped NIR-II fluorescence nanoprobes for bioapplication. *Journal of Luminescence*, 117627.

Ling-Dong Sun, H. D.-Z.-H. (5. May 2015). Upconversion of Rare Earth Nanomaterials. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 66:619-42. Pridobljeno iz Upconversion fluorescence enhancement of NaYF₄:Yb/Re nanoparticles by coupling with SiO₂ opal photonic crystals: https://www.researchgate.net/figure/Energy-level-diagram-and-upconversion-emission-mechisms-of-NaYF4Yb-Er-and-NaYF4Yb-Tm_fig4_331499284

Lisjak, D. P.-S. (2015). Dissolution of upconverting fluoride nanoparticles. *RSC Advances*, 5, 27393.

Lisjak, D. P.-S. (2016). Dissolution Mechanism of Upconverting $\text{AYF}_4\text{:Yb,Tm}$ ($\text{A} = \text{Na or K}$). *Langmuir*, 8222-8229.

Lucas, J. (5. Oktober 2018). *What are X-Rays?* Pridobljeno iz LiveScience: <https://www.livescience.com/32344-what-are-x-rays.html>

Mahmoudi, M. B. (2016). Emerging understanding of the protein corona at the nano-bio interfaces. *Nano Today*, 11(6), 817-832.

Mandl, G. A. (2019). Perspective: lanthanide-doped upconverting nanoparticles. *Methods and Applications in Fluorescence*.

Martha Sahylí Ortega Pijeira, H. V.-Ö.-J. (2022). Radiolabeled nanomaterials for biomedical applications: radiopharmacy in the era of nanotechnology. *Radiopharmacy and Chemistry*, 8.

McGill, I. (13. Februar 2000). Rare Earth Elements. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, vol. 1, pp. 416 – 500; vol. 2, pp. 190 – 297]. Pridobljeno iz Lanthanide: <https://en.wikipedia.org/wiki/Lanthanide>

MCGILL, I. (13. Februar 2023). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Pridobljeno iz Rare Earth Elements: https://sci-hub.ru/10.1002/14356007.a22_607

Nguyen, T. D. (2016). Engineered nanomedicine with alendronic acid corona improves targeting to osteosarcoma. *Scientific Reports*.

NICE CXone Expert knowledge management. (2. Februar 2022). *LibreText Chemistry*. Pridobljeno iz Lantanoides: Properties and Reaction: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_and_Websites_\(Inorganic_Chemistry\)/Descriptive_Chemistry/Elements_Organized_by_Block/4_f-Block_Elements/The_Lanthanides/aLanthanides%3A_Properties_and_Reactions](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_and_Websites_(Inorganic_Chemistry)/Descriptive_Chemistry/Elements_Organized_by_Block/4_f-Block_Elements/The_Lanthanides/aLanthanides%3A_Properties_and_Reactions)

Oliveira, H. B.-M. (2019). Critical considerations on the clinical translation of upconversion nanoparticles (UCNPs): recommendations from the European upconversion network (COST Action CM1403). *Advanced healthcare materials*, 1801233.

Oxford Instruments. (16. March 2023). *What is EDS/EDX?* Pridobljeno iz Oxford Instruments: <https://nano.oxinst.com/campaigns/what-is-eds/edx>

PubChem. (1. 2 2023). *PubChem*. Pridobljeno iz Alendronic acid: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alendronic-acid>

Pujari, S. P. (2014). Covalent surface modification of oxide surfaces. *Angewandte Chemie International Edition*, 6322-6356.

Qize Zhang, S. O. (2022). Biomedical Applications of Lanthanide Nanomaterials, for Imaging, Sensing and Therapy. *Nanotheranostics*, 6(2): 184–194.

Rieger, P. H. (1994). Electrode potentials. V P. H. Rieger, *Electrochemistry* (str. 1-58). Netherlands: Springer Netherlands.

Rogers, R. G. (2008). Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*, 19:733–759.

Ruijie D. Teo, J. T. (2016). Lanthanides: Applications in Cancer Diagnosis and Therapy. *J. Med. Chem*, 6012–6024.

Salgin, S. S. (2012). Zeta Potentials and Isoelectric Points of Biomolecules: The Effects of Ion Types and Ionic Strengths. *International journal of electrochemical science*, 12404-12414.

Simon A. Cotton, J. M. (2. Februar 2023). Lanthanides in Living Systems. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry, Online*. Pridobljeno iz Lanthanides in Living Systems.

Teo, R. D. (2016). Lanthanides: Applications in Cancer Diagnosis and Therapy. *Journal of medicinal chemistry*, 6012–6024.

The Fluorescent Mineral Society, Inc. (15. Marec 2023). *Incandescence & Luminescence*. Pridobljeno iz Luminescence: <https://uvminerals.org/science/luminescence/>

The Open University. (6. Marec 2017). *Science, Maths & Technology*. Pridobljeno iz Using lanthanides as medical imaging tools: <https://www.open.edu/openlearn/science-maths-technology/across-the-sciences/using-lanthanides-medical-imaging-tools>

Toofan, M. &. (8. Marec 2015). A Brief Review of the Cleaning Process for Electronic Device Fabrication. *Developments in Surface Contamination and Cleaning*, 185-212. Pridobljeno iz Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy:
<https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/energy-dispersive-x-ray-spectroscopy>

Uliana Kostiva, V. L. (2021). A simple neridronate-based surface coating strategy for upconversion nanoparticles: Highly colloidally stable ¹²⁵I radiolabeled NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺@PEG nanoparticles for multimodal. *Nanoscale*.

Valeur, B. &.-S. (2011). A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. *Journal of Chemical Education*, 88, 731–738.

Vozlič, M. (2021). Vpliv fosfonskih prevlek na biokompatibilnost fluorescenčnih nanodelcev. Ljubljana.

Vozlič, M., & Černič, T. G.-S. (2021). Formation of phosphonate coatings for improved chemical stability of upconverting nanoparticles under physiological conditions. *Dalton Transactions*, 6588-6597.

Wang, F., & Liu, X. (2009). Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals. *Chemical Society Reviews*, 976-989.

Wikipedia. (11. February 2023). *Fluorescence spectroscopy*. Pridobljeno iz Wikipedia The Free Encyclopedia: https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_spectroscopy

Wikipedia. (11. February 2023). *Transmission electron microscopy*. Pridobljeno iz Wikipedia The Free Encyclopedia: https://en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron_microscopy

Wikipedia. (16. Oktoper 2022). *Ytterby*. Pridobljeno iz Wikipedia The Free Encyclopedia: <https://en.wikipedia.org/wiki/Ytterby>

Wikipedia. (6. Marec 2023). *Wikipedia The Free Encyclopedia*. Pridobljeno iz Photon upconversion: https://en.wikipedia.org/wiki/Photon_upconversion

8 VIRI SLIK

Vse slike, ki nimajo dodanih virov, so avtorske slike ali fotografije.