

mgr Karolina Zajdel

Ocena funkcjonalności i cytotoksyczności luminescencyjnych nanocząstek NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ do zastosowań bio-medycznych

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Małgorzata Frontczak-Baniewicz

Promotor pomocniczy: dr n. fiz. Bożena Sikora



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2022

<http://rcin.org.pl>

Badania, których wyniki umieszczono w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały wykonane częściowo w ramach funduszy pochodzących z projektu Narodowego Centrum Nauki DEC-2014/15/D/ST5/02604 oraz z funduszy statutowych IMDiK PAN.

Część badań zrealizowano w laboratoriach współfinansowanych ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka POIG.02.02.00-00-025/09.

Wykonanie niniejszej pracy było także możliwe dzięki wsparciu finansowemu udzielonemu przez Komisję Europejską w ramach programu Erasmus+ umożliwiającego odbycie praktyk w *National Measurement Laboratory, LGC* w Teddington (Londyn, Wielka Brytania).

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować wszystkim osobom, z którymi miałam przyjemność pracować w trakcie realizacji badań oraz bez których ta praca w obecnym kształcie nie mogłaby powstać.

W pierwszej kolejności szczególne podziękowania kieruję do:

***Pani dr hab. Małgorzaty Frontczak-Baniewicz** za przyjęcie mnie do zespołu i umożliwienie realizacji badań w Pracowni Badań Mikroskopowo-Elektronowych, za możliwość nauki oraz zarażenie miłością i pasją do mikroskopii elektronowej, za opiekę nad przebiegiem pracy, liczne dyskusje, wsparcie oraz cierpliwość, zwłaszcza pod koniec pisania pracy*

***Pani dr Bożeny Sikory** za umożliwienie realizacji badań w Instytucie Fizyki, za wprowadzenie w świat nanotechnologii, pomoc merytoryczną w trakcie pisania pracy oraz pomoc w rozwiązywaniu problemów naukowych, za wieloletnią przyjaźń i wsparcie*

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:

***Panu prof. Dankowi Elbaumowi** za umożliwienie realizacji badań w Instytucie Fizyki i życzliwość*

***Pani dr hab. Joannie Sypeckiej i mgr Justynie Janowskiej** za możliwość wykonania badań na skrawkach hipokampa i pomoc w realizacji tych doświadczeń, zawsze dobre słowo i uśmiech*

***Pani prof. Lidii Strużyńskiej** za wielką życzliwość oraz dobre rady udzielone w trakcie pisania pracy*

***Dr Dorocie Bartczak** za umożliwienie odbycia stażu w LGC, za pomoc w pomiarach ICP-MS, cenne wskazówki i rady podczas wykonywania eksperymentów, pomoc w analizie wyników, ogromną życzliwość, wsparcie i uśmiech*

*Many thanks to **Heidi Goenaga-Infante, PhD** for an opportunity to collaborate*

*Many thanks to **Alex David Ramsay** for being my Lab Buddy*

*Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Laboratorium Fizyki Biologicznej, w szczególności **dr Izie Kamińskiej** za pomoc w pomiarach, wszystkie przesłane publikacje, wsparcie i uśmiech oraz **mgr Przemkowi Kowalikowi** za pomoc w doświadczeniach*

***Dr Tomkowi Wojciechowskiemu** z Instytutu Fizyki PAN za wykonanie pomiarów SEM*

***Dr Romanowi Minikayewowi** z Instytutu Fizyki PAN za wykonanie pomiarów XRD*

***Dr Kamilowi Sobczakowi** z Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego za wykonanie pomiarów EDS*

***Dr Magdzie Gewartowskiej** za cenne wskazówki oraz dyskusje zarówno te naukowe jak i nienaukowe*

*Trzem wspaniałym kobietom, **Marioli Zielińskiej i Eli Grzywaczewskiej** za ogromne wsparcie i wiarę w moje możliwości, cierpliwość, pomoc i zawsze pozytywne nastawienie przez te wszystkie lata, oraz **Joli Opertowskiej** za wprowadzenie w świat mikroskopii elektronowej, cenne rady, niekończące się dyskusje, wsparcie i wielką życzliwość*

***Ryszardowi Strzałkowskiemu** za naukę obsługi Transmisyjnego Mikroskopu Elektronowego*

*Wszystkim Pracownikom IMDiK, zarówno naukowym jak i administracyjnym z którymi miałam przyjemność pracować, którzy służyli swoimi radami, pomocą i rozmową, których nie sposób wymienić z imienia i nazwiska, w szczególności **Kasiom** z sekretariatu, **Kasi Woźniak** za wsparcie i pomoc w rozwiązywaniu problemów, załatwianiu wszelakich dokumentów, przyjęciu niezliczonej ilości podań i przyjaźń, **Ani Konarzewskiej** za pomoc w organizacji stażu i wszelkich wyjazdów konferencyjnych, ciepłe słowo i życzliwość, **Dominice Masternak** z biblioteki za wsparcie, życzliwość, wiarę w moje możliwości i wszystkie zdobyte artykuły*

Wszystkim osobom z **Samorządu Doktorantów IMDiK PAN** oraz **Samorządu Doktorantów PAN**
za wieloletnią współpracę i wspólne popularyzowanie nauki

Na końcu pragnę serdecznie podziękować moim Najbliższym:

Trzem niezwykłonym towarzyszkom trudów i studiów doktoranckich w IMDiK PAN,
Oldze i jej mężowi **Adamowi Krupskim** za ogromne wsparcie i motywacje na każdym etapie
powstawania pracy, każdą wspólnie wypitą kawę i zjedzony obiad, **Ewelinie Majewskiej** za pomoc
w analizie statystycznej, przyjacielskie wsparcie i rozmowy po godzinach, i **Kasi Skowrońskiej** za
pomoc i wsparcie oraz za wspólną pracę w Samorządzie

Adze Fatalskiej i **Justynie Dąbrowskiej** za wiarę, wsparcie i przyjaźń w podążaniu tą samą ścieżką
życiową, ale w różnych miastach

Kalinie Lisowskiej za wieczną motywację do działania w dążeniu do celu, nieustanne pytania, kiedy
składam pracę oraz brak wyrozumiałości w kryzysowych momentach

Krzysiovi Kornaszewskiemu za wsparcie, motywację i wyrozumiałość

Przyjaciółom i **znajomym**, którzy wciąż pytali o postępy pracy i życzyli powodzenia

Rodzicom i **najbliższej rodzinie** za wiarę w moje możliwości, wyrozumiałość i przymykane oko na
moje humory oraz kibicowanie w podążaniu ścieżką naukową, **bratu Maciejowi** za pomoc i dobre rady

*Pracę dedykuję moim **Ukochanym Dziadkom**,
którzy wspierali mnie i podziwiali przez te lata,
niekoniecznie rozumiejąc na czym ona polega,
do końca wierząc, że pracuję w przyszłości 😊*

Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy	9
Streszczenie	10
Abstract	13
Innowacyjność rozprawy doktorskiej	16
1. Wstęp	17
1.1. Nanotechnologia w zastosowaniach biomedycznych.....	17
1.2. Nanocząstki konwertujące energię w górę	21
1.3. Proces konwersji energii w górę.....	24
1.4. Mechanizmy konwersji energii w górę.....	25
1.5. Metody syntezy nanocząstek konwertujących energię w górę.....	28
1.6. Zalety wykorzystania światła bliskiej podczerwieni	30
1.7. Funkcjonalizacja nanocząstek	32
1.8. Interakcje nanocząstek z komórkami.....	33
1.9. Nanocząstki w neurobiologii.....	35
1.10. Metody oceny toksyczności nanocząstek	36
2. Założenia i cel pracy	38
3. Materiały i metody	40
3.1. Materiały i metody stosowane w syntezie i charakterystyce nanocząstek	40
3.1.1. Nanocząstki kowertujące energię w górę domieszkowane jonami metali ziem rzadkich.....	40
3.1.2. Synteza nanocząstek β -NaYF ₄ :20% Yb ³⁺ ,2% Er ³⁺	40
3.1.3. Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek β -NaYF ₄ :20% Yb ³⁺ ,2% Er ³⁺	42
3.1.3.1. Transmisyjna mikroskopia elektronowa	43
3.1.3.2. Skaningowa mikroskopia elektronowa	43
3.1.3.3. Spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego	44
3.1.3.4. Spektroskopia fotoluminescencyjna.....	45
3.1.3.5. Pomiar potencjału zeta	46
3.1.3.6. Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego.....	47
3.1.4. Metody modyfikacji powierzchni	47
3.1.4.1. Usuwanie liganda kwasu oleinowego z nanocząstek	47
3.1.4.2. Pokrywanie nanocząstek β -NaYF ₄ :20% Yb ³⁺ ,2% Er ³⁺ warstwą SiO ₂	48
3.2. Materiały i metody stosowane w badaniach biologicznych	49

3.2.1. Linie komórkowe	49
3.2.2. Hodowle komórkowe	50
3.2.3. Przygotowanie i podanie nanocząstek β -NaYF ₄ :20% Yb ³⁺ ,2%Er ³⁺ do komórek... 50	50
3.2.4. Spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego	51
3.2.5. Transmisyjna Mikroskopia Elektronowa	51
3.2.6. Mikroskopia konfokalna	52
3.2.7. Testy cytotoksyczności	54
3.2.7.1. Test MTT.....	54
3.2.7.2. Test Presto Blue.....	55
3.2.7.3. Test Live/Dead	56
3.2.8. Pomiar wybranych markerów stresu oksydacyjnego	56
3.2.9. Inhibicja procesu endocytozy.....	57
3.2.10. Spektrometria mas sprzężona z plazmą wzbudzaną indukcyjnie	59
3.3. Organotypowe skrawki hipokampa szczura – model <i>ex vivo</i>	63
3.3.1. Zakładanie i przebieg organotypowej hodowli skrawków hipokampa.....	63
3.3.2. Optymalizacja metod podania nanocząstek do hodowli skrawków hipokampa.....	65
3.3.3. Analiza obecności UCNPs w skrawkach hipokampa z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego	66
3.3.4. Analiza immunohistochemiczna organotypowych skrawków hipokampa.....	66
3.3.5. Analiza przeżycia skrawków hipokampa metodą barwienia jodkiem propidyny... 68	68
3.4. Analiza statystyczna.....	68
4. Wyniki	69
4.1. Właściwości morfologiczne i fizykochemiczne uzyskanych nanocząstek β -NaYF ₄ :20% Yb ³⁺ ,2%Er ³⁺	69
4.1.1. Modyfikacje powierzchni	70
4.1.2. Potwierdzenie składu pierwiastkowego w uzyskanych nanocząstkach metodą spektroskopii dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego	72
4.1.3. Właściwości luminescencyjne nanocząstek β -NaYF ₄ :20% Yb ³⁺ ,2%Er ³⁺	77
4.1.4. Wartość potencjału zeta	79
4.1.5. Właściwości strukturalne nanocząstek β -NaYF ₄ :20% Yb ³⁺ ,2%Er ³⁺	79
4.2. Wyniki badań biologicznych	80
4.2.1. Wpływ badanych nanocząstek β -NaYF ₄ :20% Yb ³⁺ ,2%Er ³⁺ na komórki <i>in vitro</i> ... 80	80
4.2.1.1. Potwierdzenie obecności nanocząstek i ich składu pierwiastkowego za pomocą spektroskopii dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego	80

4.2.1.2. Ocena mikroskopowo-elektronowa oddziaływań UCNPs z komórkami.....	83
4.2.1.3. Wpływ inhibitorów endocytozy na efektywność procesu internalizacji UCNPs na podstawie spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie.....	106
4.2.1.4. Potwierdzenie obecności UCNPs i ich właściwości luminescencyjnych za pomocą mikroskopu konfokalnego.....	113
4.2.1.5. Ocena cytotoksyczności nanocząstek NaYF ₄ :20%Yb ³⁺ ,2%Er ³⁺	115
4.2.2. Model organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura <i>ex vivo</i>	118
4.2.2.1. Ocena obecności UCNPs w skrawkach oraz analiza zmian ultrastrukturalnych z wykorzystaniem obrazowania TEM.....	118
4.2.2.2. Potwierdzenie obecności UCNPs i ich właściwości luminescencyjnych w komórkach hipokampa za pomocą mikroskopu konfokalnego	124
4.2.2.3. Przeżywalność komórek hipokampa po ekspozycji na UCNPs.....	129
5. Dyskusja	132
5.1. Właściwości otrzymanych UCNPs.....	132
5.2. Oddziaływania z komórkami, endocytoza i usuwanie UCNPs	134
5.3. Cytotoksyczność UCNPs <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	143
5.4. Oddziaływania UCNPs z komórkami skrawków hipokampa	144
5.5. TEM w obrazowaniu oddziaływań nano-bio.....	148
Podsumowanie	150
Wnioski.....	154
Bibliografia	155
Załączniki.....	184

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

DIV	dni w hodowli (ang. <i>Days In Vitro</i>)
DMEM	pożywka hodowlana (ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethylsulfoxide</i>)
EDS/EDX	Spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (ang. <i>Energy Dispersive X-ray Spectrometry/ Energy Dispersive X-ray Analysis</i>)
EDTA	kwas wersenowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EE	endosomy wczesne (ang. <i>early endosomes</i>)
ETU	konwersja energii w górę z transferem energii (ang. <i>Energy Transfer Up-conversion</i>)
FBS	bydłęca surowica płodowa (ang. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
GA	aldehyd glutarowy (ang. <i>glutaraldehyde</i>)
HCl	kwas chlorowodorowy
HEK293	ludzkie embrionalne komórki nerki (ang. <i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>)
HeLa	ludzka linia komórek nabłonkowych z raka szyjki macicy (ang. <i>human cervix epitheloid carcinoma</i>)
GFAP	glejowe kwaśne białko włókienkowe (ang. <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
ICP-MS	spektrometria mas sprzężona z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ang. <i>Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry</i>)
MAP2	białko stabilizujące mikrotubule (ang. <i>Microtubule Associated Protein 2</i>)
MβcD	Metylo- β -cyklodekstryna
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu, (ang. <i>3-(4,5-dimethyl-1H-tetrazol-5-yl)-2,6-diphenyl tetrazolium bromide</i>)
MRI	rezonans magnetyczny (ang. <i>magnetic resonance imaging</i>)
NIR	bliska podczerwień (ang. <i>near infrared</i>)
NPs	nanocząstki (ang. <i>nanoparticles</i>)
LE	endosomy późne (ang. <i>late endosomes</i>)
OHSC	organotypowa hodowla skrawków hipokampa (ang. <i>Organotypic Hippocampal Slice Cultures</i>)
PB	Presto Blue
PBS	bufor fosforanowy (ang. <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PDT	terapia fotodynamiczna (ang. <i>photodynamic therapy</i>)
PFA	paraformaldehyd (ang. <i>paraformaldehyde</i>)
PI	jodek propidyny (ang. <i>Propidium Iodide</i>)
PTT	terapia fototermiczna (ang. <i>photothermal therapy</i>)
SA	azydek sodu (ang. <i>Sodium Azide</i>)
SEM	skaningowy mikroskop elektronowy (ang. <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
TEM	transmisyjny mikroskop elektronowy (ang. <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TEOS	tetraetylokrzemian (ang. <i>tetraethyl orthosilicate</i>)
UC	konwersja energii w górę (ang. <i>up-conversion</i>)
UCNPs	nanocząstki konwertujące energię w górę (ang. <i>up-converting nanoparticles</i>)
XRD	dyfrakcja rentgenowska (ang. <i>X-Ray Diffraction</i>)
ZP	potencjał zeta (ang. <i>Zeta Potential</i>)

Streszczenie

Współczesna medycyna wymusza potrzebę intensyfikacji badań w zakresie poszukiwania nowych rozwiązań diagnostycznych i terapeutycznych. Największe nadzieje pokłada się w nowatorskich strategiach opartych na wykorzystaniu nanostruktur. W celu zapewnienia bezpieczeństwa biologicznego nowo opracowanych nanocząstek, ich unikalne właściwości muszą przewyższać ich działanie toksyczne. Dlatego poszukuje się nanomateriałów wielofunkcyjnych, charakteryzujących się niską cytotoksycznością. W ostatnim czasie, na szczególną uwagę zasługują nanocząstki konwertujące energię w górę (ang. *up-converting nanoparticles*, UCNPs) domieszkowane jonami lantanowców.

UCNPs to nowa generacja nanomateriałów o bardzo interesujących właściwościach luminescencyjnych, a mianowicie, posiadających zdolność do zamiany niższej energii promieniowania (długości fal np. bliskiej podczerwieni NIR) w energię wyższą (krótsze długości fal, np. UV lub VIS) w nieliniowym procesie optycznym, zwanym konwersją energii w górę (ang. *up-conversion*, UC). Zdolność do konwersji energii w górę pozwala na wykorzystanie nanocząstek jako bio-znaczników lub bio-czujników, a także ich obserwację w komórkach i tkankach oraz monitorowanie procesów, w których uczestniczą. Zaletami UCNPs jest również ich stosunkowo niska cytotoksyczność, doskonała fotostabilność, odporność na wyświecanie oraz to, że długość fali ich wzbudzenia nie powoduje auto-fluorescencji związków organicznych zawartych w materiale biologicznym.

Celem naukowym rozprawy doktorskiej była synteza i charakterystyka właściwości fizykochemicznych (morfologicznych i spektroskopowych) otrzymanych nanomateriałów opartych o jony pierwiastków ziem rzadkich, oraz ocena ich toksycznego działania i funkcjonalności w układach biologicznych na poziomie *in vitro*, pod kątem określenia możliwości aplikacyjnych w naukach biologicznych i medycznych.

Pierwszym etapem badań była synteza nanokrystalicznych fluorków domieszkowanych wybranymi jonami lantanowców iterbu (Yb^{3+}) oraz erbu (Er^{3+}). Otrzymane metodą współstrącania nanocząstki posiadały heksagonalną strukturę, niewielki rozmiar (~20 nm), dobrą dyspersję w fizjologicznych roztworach wodnych i wykazywały intensywną luminescencję (zieloną i czerwoną) pod wpływem promieniowania NIR, zależną od zastosowanego jonu aktywatora (Er^{3+}). UCNPs $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ zostały scharakteryzowane pod kątem morfologicznym, strukturalnym i optycznym, za pomocą metod i technik fizykochemicznych, takich jak: transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM),

skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDS), spektroskopia luminescencyjna (PL), spektrometria mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS), dyfraktometria rentgenowska (XRD). Przeprowadzono również pomiary wartości ich potencjału powierzchniowego.

W dalszej części pracy weryfikowano możliwość zastosowania zsyntetyzowanych nanocząstek w badaniach biologicznych. Przeprowadzono badania wewnątrzkomórkowej akumulacji i toksyczności *in vitro* wobec komórek linii HeLa i HEK293 oraz w szczurzym modelu organotypowej hodowli skrawków hipokampa (OHSC).

W celu identyfikacji mechanizmów internalizacji nanocząstek NaYF₄:20% Yb³⁺, 2% Er³⁺ do komórek przeprowadzono analizę mikroskopowo-elektronową oraz przy pomocy mikroskopu konfokalnego. Obserwacje wykazały efektywną internalizację nanocząstek przez komórki i umożliwiły określenie ich dokładnej lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Transport nanocząstek przez błony komórkowe był bardzo dynamicznym procesem i były one z łatwością pobierane przez obie linie komórkowe (widoczna internalizacja po 30 min). UCNPs dostawały się do komórek na drodze endocytozy i zawsze występowały zamknięte w strukturach pęcherzyków. UCNPs gromadziły się jedynie w wybranych organellach komórkowych jak endosomy wczesne, endosomy późne oraz lizosomy, a następnie usuwane były na drodze egzocytozy.

Ponadto, doświadczenia z wykorzystaniem wybranych chemicznych inhibitorów endocytozy potwierdziły jej udział w internalizacji UCNPs i pomogły wytypować kilka mechanizmów w nią zaangażowanych. Głównym mechanizmem internalizacji UCNPs w komórkach HeLa była endocytoza za pośrednictwem klatryny.

Wykazano, że cytotoksyczność analizowanych UCNPs względem komórek prawidłowych i nowotworowych (badana testami MTT, PrestoBlue, Live/Dead), wyrażana obniżeniem żywotności komórek, była niewielka i zależała od stężenia nanocząstek. Odpowiedź komórkowa (zmiany ultrastrukturalne związane z degeneracją mitochondriów) była nasiloną tylko dla bardzo wysokich stężeń (100 µg/ml), znacznie przewyższających ustalone, optymalne do badań stężenie (1 µg/ml), określone na podstawie analizy mikroskopowo-elektronowej.

Ponadto, ekspozycja na wybrane stężenia UCNPs wykazała brak istotnej indukcji wybranych markerów stresu oksydacyjnego, której nie towarzyszyły zmiany ultrastrukturalne w komórkach. Z danych literaturowych wynika, że linie nowotworowe są mniej wrażliwe na obecność nanomateriałów, nie zaobserwowano jednak znaczących różnic pomiędzy komórkami HeLa i HEK293.

Badania *ex vivo* umożliwiły opracowanie efektywnego modelu podania UCNPs do hodowli skrawków hipokampa. Przeprowadzone obserwacje potwierdziły efektywną internalizację UCNPs do komórek hipokampa, ich dystrybucję oraz gromadzenie się w endosomach i lizosomach. Barwienie jodkiem propidyny i analiza TEM nie potwierdziły nasilonego, negatywnego wpływu UCNPs na przeżywalność i morfologię skrawków.

W toku przeprowadzonych analiz jednoznacznie można stwierdzić, że UCNPs budzą duże nadzieje związane z potencjalnymi korzyściami płynącymi z ich zastosowania w zakresie badań bio-medycznych. Uzyskane informacje uzupełniają obecny stan wiedzy odnośnie interakcji nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ z materiałem biologicznym, zachodzących na poziomie subkomórkowym. W związku z powyższym, wyniki dotyczące zarówno syntezy i charakterystyki, jak również szczegółowej analizy tych nanoobjektów w układach biologicznych *in vitro* są doskonałym punktem wyjścia do badań nad spersonalizowaną biofunkcjonalizacją UCNPs w leczeniu różnych chorób w przyszłości.

Abstract

Modern medicine requires intensified research in terms of seeking new diagnostic and therapeutic solutions. The greatest hopes are placed on innovative strategies based on nanostructures. In order to ensure the biological safety of the newly developed nanoparticles, their unique properties have to far outbalance their toxic effects. Therefore, multifunctional nanomaterials characterized by low cytotoxicity are needed. Recently, up-converting nanoparticles (UCNPs) doped with lanthanide ions have attracted significant attention.

The UCNPs are a new generation of nanomaterials with very interesting luminescent properties, which convert lower radiation energy (long wavelengths e.g. near-infrared NIR) into higher energy (shorter wavelengths, e.g., UV or VIS) in a nonlinear optical process called up-conversion (UC). The process of up-conversion allows the use of nanoparticles as bio-markers or bio-sensors, as well as their observation in cells and tissues and enables monitoring of the process they participate. The additional advantages of UCNPs are their relatively low cytotoxicity, excellent photostability, photobleaching resistance, and no auto-fluorescence from organic compounds in biological material under their excitation wavelength.

The main goals of this PhD dissertation comprised the synthesis and physicochemical characterization (morphological and spectroscopic properties) of the obtained nanomaterials based on rare earth ions, and evaluation their potential toxic effects and functionality in biological systems at the *in vitro* level, in terms of determining the application possibilities in biological and medical sciences.

The first stage of the research was the synthesis of nanocrystalline fluorides doped with selected lanthanide ions ytterbium (Yb^{3+}) and erbium (Er^{3+}). The nanoparticles were obtained by an adapted coprecipitation method, had a hexagonal structure, a small size (~20 nm), good solubility in aqueous solutions, and showed an intense (green and red) luminescence under NIR radiation, depending on the activator ion (Er^{3+}). The $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ UCNPs were characterised in terms of morphology, structural and optical properties, using physicochemical methods and techniques, such as transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), X-ray energy dispersion spectroscopy (EDS), luminescence spectroscopy (PL), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), X-ray diffraction (XRD), and surface potential measurements were performed.

In the next section of the dissertation, the possibility of using the synthesized nanoparticles in biological research (*in vitro* systems) was verified. Intracellular accumulation and toxicity studies on HeLa and HEK293 cell lines and rat organotypic hippocampal slice culture model (OHSC) were performed.

In order to identify the cellular internalisation mechanism of NaYF₄:20% Yb³⁺, 2% Er³⁺ nanoparticles, electron microscopy and confocal microscopy observations were carried out. Efficient internalization of the nanoparticles by the cells was confirmed and their precise localization in the cells was determined. Nanoparticles transport across cell membranes was a very dynamic process. The UCNPs were easily taken up by both cell lines (internalization was visible after 30 min). They entered the cells by endocytosis and always were trapped in vesicle structures. The UCNPs accumulated only in specific cell organelles, such as early endosomes, late endosomes, and lysosomes, and then were removed by exocytosis. Moreover, experiments with chemical inhibitors of endocytosis confirmed the involvement of endocytosis in nanoparticles internalization and helped to select several mechanisms involved in it. The main pathway for the internalization of UCNPs in HeLa cells was clathrin-mediated endocytosis.

It was shown that the cytotoxicity of the analyzed UCNPs (evaluated with MTT, PrestoBlue, and Live/Dead tests), and expressed by decreased cell viability was low for both normal and cancer cells and depended on the nanoparticles' concentration. The cellular response (ultrastructural changes as degenerative mitochondria) was enhanced only for very high concentrations (100 µg/ml), significantly above the established optimal concentration (1 µg/ml) determined by electron microscopy analysis. Furthermore, exposure to selected concentrations of UCNPs showed no significant induction of oxidative stress without ultrastructural changes in cells. The literature data shows that cancer lines are less sensitive to the presence of nanomaterials, but no significant changes between HeLa and HEK293 cells were observed.

Ex vivo studies allowed to design of an effective model of UCNPs administration on the hippocampal slice cultures. Observations confirmed efficient cellular internalization of UCNPs in the hippocampal cells, their biodistribution, and accumulation in endosomes and lysosomes. Propidium iodide staining and TEM analysis did not confirm the adverse effects of UCNPs on hippocampal slices viability and morphology.

In the course of the conducted analysis, it can be unambiguously stated that the UCNPs are raising high hopes related to the potential benefits of their application in the biomedical field. The obtained information complements the current knowledge regarding the interactions

of NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ nanoparticles with biological material at the subcellular level. Thus, regarding the UCNPs synthesis and characterizations, and subsequently detailed analysis of nanoobjects using *in vitro* biological systems, results provide the foundations for future research possibilities in personalised UCNPs biofunctionalisation for various diseases treatment.

Innowacyjność rozprawy doktorskiej

Tematyka podjęta w poniższej rozprawie doktorskiej odnosi się do zagadnień aktualnych i jest uzupełnieniem najnowszych informacji określanych jako *state-of-the-art* współczesnej nanotechnologii.

Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem nanocząstek. Mogą one znaleźć zastosowanie w obrazowaniu komórek i tkanek, jako nośniki leków, w celowanej terapii nowotworowej czy bio-detekcji. Niestety, pomimo imponującej liczby przeprowadzanych badań w laboratoriach na całym świecie i nadal pojawiających się nowych doniesień naukowych, wciąż pozostaje wiele otwartych pytań. Nie posiadamy pełnej wiedzy na temat oddziaływań nanocząstek z materiałem biologicznym. Dotąd, nie zidentyfikowano wszystkich skutków ubocznych ekspozycji na nanocząstki, mechanizmów zaangażowanych w ich pobieranie przez komórki, a także mechanizmów ich usuwania z organizmu bądź też ich neutralizacji.

W związku z powyższym niniejsza praca doktorska uzupełnia aktualny stan wiedzy o następujące zagadnienia:

- 1) po raz pierwszy przy pomocy badań mikroskopowo-elektronowych przedstawiono szczegółową dokumentację ultrastrukturalną dotyczącą analizy wpływu obecności nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ na komórki w dwóch modelach *in vitro*, z uwzględnieniem ich subkomórkowej lokalizacji;
- 2) opisane w rozprawie wyniki znacząco wzbogacają aktualny stan wiedzy na temat mechanizmów pobierania nanocząstek przez komórki HeLa, a także mogą być pomocne w wykorzystaniu opisanych mechanizmów w odniesieniu do przyszłej bio-funkcjonalizacji tego typu nanomateriałów;
- 3) opracowano model efektywnego podania nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ w organotypowej hodowli skrawków hipokampa oraz wykazano, że są one internalizowane przez komórki w obrębie tkanki hipokampa (większość badań nad NPs testowanymi w obrębie struktury hipokampa dotyczyła jedynie wyizolowanych z niego komórek, a nie całych skrawków);
- 4) wykazano, że badany typ nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ spełnia cechy atrakcyjnego narzędzia pod kątem przyszłych zastosowań nanobiotechnologicznych i bio-medycznych, ze względu na relatywnie niską cytotoksyczność i bardzo dobre właściwości luminescencyjne w materiale biologicznym.

1. Wstęp

1.1. Nanotechnologia w zastosowaniach biomedycznych

Nanotechnologia jest wciąż stosunkowo młodą, ale niezwykle dynamicznie rozwijającą się dyscypliną i jest to jedna z najbardziej obiecujących technologii XXI wieku [1]. Obecnie, nanotechnologia nie tylko znajduje się w fazie intensywnego rozwoju, ale również jest uznawana za wysoce atrakcyjną dziedzinę ze względu na możliwość komercjalizacji wyników badań. Trudno wymienić wszystkie obszary nauki i życia, które już zrewolucjonizowała, ale szczególnie nowatorskim podejściem cieszą się te z zakresu nauk biologicznych i medycznych [2]. Przedmiotem nanotechnologii są obiekty, które przynajmniej w jednym ze swoich trzech przestrzennych wymiarów posiadają nanometryczny rozmiar, mieszczący się w zakresie od 1 do 100 nm [1,3,4]. Z wyjątkowości skali nano zdano sobie sprawę po odkryciu, że zmiana rozmiaru, a dokładnie jego zmniejszenie, może wpływać na właściwości fizykochemiczne materiału, w odniesieniu do ich cech prezentowanych w skali makro. Nanomateriały, ze względu na bardzo małe wymiary, posiadają specjalną właściwość, którą jest zdolność do pokonywania barier biologicznych, co znajduje potencjalne zastosowanie w naukach biologicznych i medycynie [3]. W zastosowaniach biotechnologicznych i biomedycznych szczególnym zainteresowaniem cieszą się nanomateriały o wymiarach poniżej 50 nm. Istnieją liczne doniesienia wskazujące na to, że jest to optymalny rozmiar dla aktywnego pobierania nanocząstek i ich wewnątrzkomórkowego transportu, ponieważ wielkością odpowiadają wielu biomolekułom [5-7].

Od lat wśród najbardziej popularnych nanostruktur stosowanych w medycynie, poza najczęściej wymienianymi nanocząstkami srebra (AgNPs) i złota (AuNPs), wykorzystuje się także kropki kwantowe (ang. *Quantum dots*, QDs), nanocząstki tlenku żelaza (Fe₂O₃NPs), nanocząstki krzemionki, nanorurki węglowe, fulereny, czy też nanocząstki polimerowe i liposomy [8]. Ich unikalne cechy sprawiają, że wykorzystywane są do diagnostyki, między innymi do obrazowania różnymi metodami optycznymi lub metodą rezonansu magnetycznego. Coraz częściej wykorzystywane są również w terapiach celowanych molekularnie [9]. Szeroko prowadzone są badania w zakresie opracowywania nowych nanostruktur oraz poszukiwania ich nowych zastosowań. Równolegle przeprowadzane są analizy ich wpływu na organizm człowieka, gdyż zastosowanie nowych, nie do końca poznanych nanostruktur, stwarza trudne do przewidzenia ryzyko występowania skutków ubocznych [10]. Niejednokrotnie wykazano, że niektóre z pożądaných właściwości nanomateriałów, takie jak mały rozmiar, a przy tym duży

stosunek powierzchni właściwej do objętości, mogą prowadzić do cytotoksyczności [11,12]. Czynniki warunkującymi toksyczność może być także kształt nanocząstek (ang. *nanoparticles*, NPs), ich skład chemiczny, ładunek powierzchniowy, obecność reaktywnych grup na ich powierzchni, czy też zdolność do agregacji [11,13]. Idealnym rozwiązaniem byłoby uzyskanie takich nanocząstek, które będą łączyć w sobie możliwości diagnostyki i terapii jednocześnie, czyli nanocząstek określanych mianem teranostycznych (ang. *theranostics* = “*therapy*” and “*diagnosis*”) [14,15]. W związku z tym, poszukuje się takich nanomateriałów, które będą wielofunkcyjne i wydajne, będą generowały relatywnie niskie koszty produkcji, a przy tym będą charakteryzowały się wysoką biokompatybilnością i znikomą cytotoksycznością w układach biologicznych. Zaprojektowane w ten sposób celowo nanomateriały określane są nanocząstkami inżynieryjnymi (ang. *engineered nanoparticles*) [2,16]. Przyciągają one ogromne zainteresowanie ze względu na swoją wszechstronność aplikacyjną [17]. Takie nanomateriały charakteryzują się dobrą kompatybilnością z materiałem biologicznym i niską toksycznością. Wykazują przy tym zdolność do przenikania przez błony biologiczne i są usuwane z organizmu, dlatego mogą być wykorzystywane w biomedycynie, w tym w diagnostyce biomedycznej i leczeniu chorób [13]. Zazwyczaj posiadają one unikalne właściwości optyczne i magnetyczne, które sprawiają, że stają się uniwersalnym narzędziem w naukach biomedycznych, takich jak bioanalitka, obrazowanie biomedyczne oraz terapia pod kontrolą obrazowania [18-21]. Nanomateriały, które reagują na światło, takie jak kropki kwantowe, czy nanocząstki metali stały się optymalnymi kandydatami do zastosowania ze względu na ich dobre właściwości optyczne (silniejsza luminescencja), a także mały rozmiar, łatwość modyfikacji powierzchni, wysoka czułość i dobra fotostabilność. Powyższe cechy umożliwiają wykrywanie próbek biologicznych z wysoką selektywnością oraz znakowanie biomolekuł [22]. Zazwyczaj jednak, nanomateriały wykazujące właściwości optyczne pod wpływem światła, posiadają liczne ograniczenia, takie jak interferencja fluorescencji tła, łatwa fotoliza, słaba penetracja materiału biologicznego, a także krótkotrwała fluorescencja i długoterminowa toksyczność [23,24].

Od kilku dekad w biomedycynie znajdują zastosowanie różne typy nanostruktur. Jednak nieustannie poszukuje się nowych i bardziej wydajnych nanomateriałów, które do zastosowań biomedycznych powinny charakteryzować się niską cytotoksycznością. Niejednokrotnie wykazano, że niektóre typy nanostruktur, jak chociażby najpowszechniej stosowane nanocząstki srebra wykazują znaczną toksyczność (**Tabela 1**) [25]. Od dawna znane jest ich antybakteryjne działanie, co znalazło zastosowanie w opatrunkach na rany, ale stosowane są też do powlekania narzędzi chirurgicznych czy też protez [26]. Niewątpliwym korzyściom

z ich stosowania przeciwstawić jednak należy łatwość przenikania do ludzkiego organizmu różnymi drogami. Badania wykazały, że kumulują się w różnych narządach, ale również pokonują barierę krew-mózg wywołując neurotoksyczność [3,27].

Tabela 1. Najbardziej popularne typy nanocząstek stosowanych w aplikacjach biomedycznych i ich toksyczność.

Typ	Zastosowania biomedyczne	Efekt toksyczny
Nanocząstki srebra (AgNPs)	<ul style="list-style-type: none"> - systemy dostarczania leków - diagnostyka - terapia nowotworów - działanie przeciwbakteryjne - inżynieria tkankowa - leczenie ran (bandaże, opatrunki) - terapie genowe - powlekanie sprzętu medycznego i protez - bioczuJNIki optyczne (powierzchniowy rezonans plazmonowy) - stomatologia 	<ul style="list-style-type: none"> - kumulują się w nerkach, wątrobie, mózgu, śledzionie, płucach, łożysku, opuszcze węchowej - uwalniają jony srebra, które bezpośrednio uszkadzają DNA - przenikają i uszkadzają barierę krew-mózg - uszkadzają komórki nerwowe - wywołują stany zapalne (indukcja cytokin) powodują apoptozę komórek poprzez indukcję wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (<i>ang. reactive oxygen species, ROS</i>) - wywołują stres oksydacyjny i genotoksyczność - AgNPs są toksyczne dla komórek ssaków, które pochodzą ze skóry, wątroby, płuc, mózgu, układu krążenia i narządów rozrodczych (toksyczność potwierdzona w licznych badaniach <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>) [28]
Nanocząstki złota (AuNPs)	<ul style="list-style-type: none"> - systemy dostarczania leków przeciwnowotworowych - środki kontrastujące - obrazowanie biomedyczne (promieniowanie rentgenowskie/ tomografia komputerowa, fotoakustyczne) - bioczuJNIki - diagnostyka - terapia fotodynamiczna - terapia fototermiczna - bioznakowanie - terapia genowa - działanie przeciwbakteryjne - urządzenia chirurgiczne 	<ul style="list-style-type: none"> - kumulują się w organach wewnętrznych zmieniając ekspresję genów związanych z detoksykacją organizmu, metabolizmem tłuszczów, cyklem komórkowym, reakcjami obronnymi i rytmem okołodobowym - prowadzą do uszkodzeń nerek - są teratogenne i cytotoksyczne - wywołują stres oksydacyjny - powodują aberracje chromosomowe - powodują uszkodzenia DNA <i>in vitro</i> oraz <i>in vivo</i> w komórkach wątroby, krwi, kory mózgowej szczurów
Nanocząstki tlenku miedzi (CuONPs)	<ul style="list-style-type: none"> - działanie przeciwbakteryjne - działanie przeciwgrzybicze 	<ul style="list-style-type: none"> - przenikają barierę krew-mózg, prowadząc do degeneracji komórek układu nerwowego - zakłócenie funkcji fizjologicznych ośrodkowego układu nerwowego [29] - wywołują stres oksydacyjny [29] - obniżają żywotność komórek - obniżają LDH, nasilają proces peroksydacji lipidów [30] - wywołują genotoksyczność - uwalniają jony miedzi [31] - wywołują cytotoksyczność <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>
Nanocząstki tlenku żelaza (Fe ₂ O ₃ NPs)	<ul style="list-style-type: none"> - systemy dostarczania leków - diagnostyka - obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego - terapia genowa - suplementacja żelaza - obrazowanie guzów - znakowanie molekularne 	<ul style="list-style-type: none"> - produkują ROS: wywołują stres oksydacyjny, a następnie wywołują uszkodzenia DNA i peroksydację lipidów, wywołują stany zapalne - przenikają barierę krew-mózg - uwalniają jony Fe²⁺ - zaburzają funkcjonowanie komórek <i>in vitro</i> prowadząc do ich apoptozy i nekrozy, powodują lizę komórek - powodują zaburzenia w cytoszkieletcie aktywnym komórek - gromadzą się w wątrobie, śledzionie, płucach i mózgu - zaburzają układ krzepnięcia krwi - mogą prowadzić do agregacji białek w komórkach nerwowych [32] - wywołują zaburzenia homeostazy żelaza - wywołują zmiany w odpowiedzi komórkowej takie jak aktywacja szlaków sygnałowych i zaburzenia w regulacji cyklu komórkowego - wywołują zmiany mitochondrialne - doprowadzają do rozregulowania profili ekspresji genów, wywołują efekty genotoksyczne [33-36] - akumulują się w algach i wywołują stres oksydacyjny [37]

Nanocząstki dwutlenku tytanu (TiO ₂ NPs)	<ul style="list-style-type: none"> - dostarczanie leków - terapia fotodynamiczna - obrazowanie komórek - bioczuJNIKI - inżynieria genetyczna - ochrona skóry (właściwości blokujące promieniowanie UV) 	<ul style="list-style-type: none"> - mogą przenikać przez łożysko - wdychanie TiO₂NPs powodowało zapalenie płuc u zwierząt (wdychane TiO₂NPs mogą być transportowane do mózgu - potencjalna neurotoksyczność) - wywołują cytotoxycyzość i genotoksyczność <i>in vitro</i> w różnych liniach komórkowych, roślinach i w mózgu myszy po podaniu doustnym [38-41] - wykazano biodystrybucję TiO₂NPs z płuc do krwi i innych narządów [42] - w wysokim stężeniu TiO₂NPs są w stanie obniżyć żywotność komórek, zwiększyć apoptozę, produkcję ROS i wydzielanie cytokin prozapalnych [43] - wykazano toksyczny wpływ TiO₂NPs na układ odpornościowy, wątrobę, nerki, śledzionę, mięsień sercowy, homeostazę glukozy i lipidów w warunkach eksperymentalnych <i>in vivo</i> [3]
Nanocząstki tlenku cynku (ZnONPs)	<ul style="list-style-type: none"> - ochrona skóry (właściwości blokujące promieniowanie UV) 	<ul style="list-style-type: none"> - mogą uszkadzać komórki nerwowe i układ immunologiczny - wywołują cytotoxycyzość i genotoksyczność <i>in vitro</i> [41,44,45] i <i>in vivo</i> [46] - powodują stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA i apoptozę w wątrobie u myszy po podaniu doustnym [47] - obniżają żywotność komórek, wywołują apoptozę, powodują uszkodzenia błony komórkowej, zwiększają stres oksydacyjny, generują powstawanie ROS - induktor cytotoxycyzości w jądrach i męskich komórkach rozrodczych, powodujący uszkodzenia DNA w niektórych spermatoocytach [48,49] - wątroba, nerki, płuca, mózg i śledziona są narządami o wysokim poziomie kumulacji ZnONPs [50]
Kropki kwantowe (QDs)	<ul style="list-style-type: none"> - diagnostyka - obrazowanie komórek i tkanek <i>in vivo</i> - znakowanie <i>in vitro</i> - bioczuJNIKI - terapia fotodynamiczna - terapia fototermiczna - systemy dostarczania leków - biochipy - teranostyka 	<ul style="list-style-type: none"> - uwalniają toksyczne jony kadmu [51,52] - powodują uszkodzenia DNA - wywołują stres oksydacyjny [53] - uszkodzenia kanałów jonowych [54] - wywołują odpowiedź zapalną [55-56]
Nanocząstki krzemionki (SiO ₂ NPs)	<ul style="list-style-type: none"> - nośniki leków i genów 	<ul style="list-style-type: none"> - mogą się kumulować w sercu, wątrobie, śledzionie, nerkach i mózgu po spożyciu, inhalacji lub aplikacji na skórę - mogą indukować wytwarzanie ROS i powodować stres oksydacyjny, - mogą powodować apoptozę, genotoksyczność oraz uszkodzenia DNA w ludzkich komórkach śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) <i>in vitro</i> - wywołują genotoksyczność u szczurów.
FulereNY	<ul style="list-style-type: none"> - systemy kontrolowanego dostarczania leków - obrazowanie nowotworów 	<ul style="list-style-type: none"> - nie funkcjonalizowane fulereny mogą być dystrybuowane do wszystkich tkanek i długotrwale akumulowane w kościach, śledzionie, wątrobie i nerkach - powodują indukcję wewnątrzkomórkowego poziomu ROS w ludzkich keratynocytach i komórkach raka płuc <i>in vitro</i> - agregaty fulerenów wywołują cytotoxycyzość wraz ze wzrostem stężenia poprzez uszkodzenia błony mitochondrialnej - powodują apoptozę makrofagów
Nanorurki węglowe, NPs na bazie węgla	<ul style="list-style-type: none"> - systemy kontrolowanego dostarczania leków - nośniki leków przeciwnowotworowych, genów oraz białek w chemioterapii nowotworów - bioczuJNIKI 	<ul style="list-style-type: none"> - indukują apoptozę w komórkach macierzystych mysich zarodków poprzez aktywację białka P53 - powodują uszkodzenia DNA w komórkach płuc, szpiku kostnego i leukocytów myszy - wywołują genotoksyczność poprzez narażenie inhalacyjne - powodują natychmiastową reakcję zapalną, zwłóknienie, stres oksydacyjny i hiperplazję u myszy (C57BL)

Tabełę opracowano na podstawie [3,11,57-63].

Ze względu na unikalne właściwości nanostruktur szczególnie dużo uwagi poświęca się możliwości ich zastosowania w diagnostyce i leczeniu chorób nowotworowych. W diagnostyce tych chorób wykorzystywane są obecnie różne techniki obrazowania: promieniowanie rentgenowskie, w tym tomografia komputerowa (ang. *computed tomography*, CT), rezonans magnetyczny (ang. *magnetic resonance imaging*, MRI), pozytonowa tomografia emisyjna (ang. *positron emission tomography*, PET), ultradźwięki i obrazowanie fluorescencyjne. W obrazowaniu fluorescencyjnym powszechnie stosowanymi sondami są barwniki i białka fluorescencyjne, które cieszą się dużym uznaniem. Niemniej jednak, obarczone są one również niską czułością wykrywania, szybkim wyświecaniem (fotowycielaniem, ang. *photobleaching*) i wysoką toksycznością, a przy tym nie niosą ze sobą żadnego efektu terapeutycznego [23].

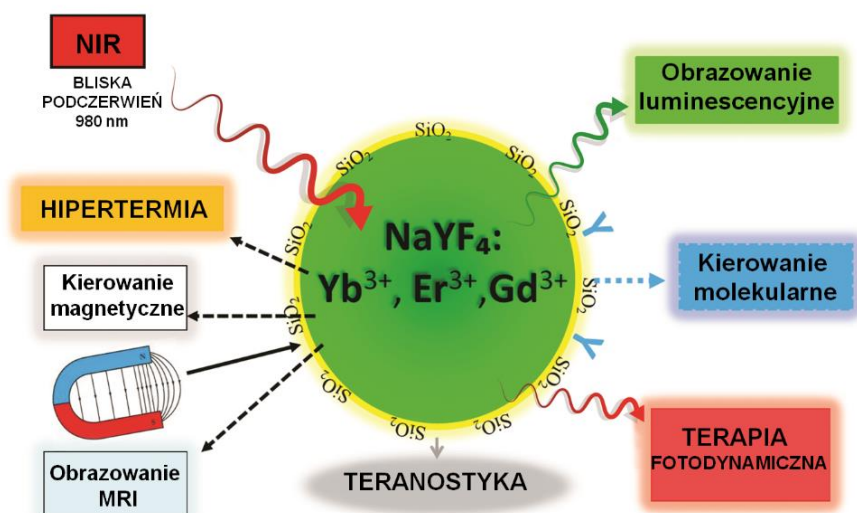
Korzystną alternatywę stanowi obrazowanie optyczne (ang. *optical imaging*) bazujące na fluorescencji lub luminescencji nanomateriałów. Z uwagi na rosnące zapotrzebowanie na tego typu nanomateriały, zwłaszcza w klinice, prace w tym obszarze prowadzone są niezwykle intensywnie. Jednak synteza nowych nanomateriałów, nawet o dobrze zdefiniowanej strukturze i właściwościach dostosowanych do konkretnych zastosowań, jest wciąż wielkim wyzwaniem współczesnej nanotechnologii. Spośród dostępnych obecnie nanostruktur, coraz większą popularnością cieszą się nowej generacji nanomateriały konwertujące energię w górę, które zdają się spełniać powyższe wymagania.

1.2. Nanocząstki konwertujące energię w górę

Nanocząstki konwertujące energię w górę (ang. *upconversion nanoparticles*, UCNPs) to nanomateriały luminescencyjne oparte na matrycach fluorkowych (np. NaYF₄, CaF₂, YF₃), tlenkowych (np. Gd₂O₃, Y₂O₃) lub siarczkowych (np. CdS, ZnS), domieszkowanych jonami pierwiastków ziem rzadkich (ang. *rare earth-doped upconversion nanoparticles*, RE-UCNPs) inaczej domieszkowane lantanowcami ang. *lanthanide-doped upconverting nanoparticles*, Ln-UCNPs, najczęściej Ln³⁺ = Er³⁺, Yb³⁺, Tm³⁺, Tb³⁺, Gd³⁺, Ho³⁺, Eu³⁺, Nd³⁺) lub metalami grup przejściowych (np.: Fe³⁺, Mn²⁺, Cr³⁺, Re⁴⁺, V³⁺, Mo³⁺, Ni²⁺, Ti²⁺, Ca²⁺, Zr⁴⁺, Y³⁺). UCNPs stanowią interesującą grupę nanomateriałów, ze względu na swoje unikalne właściwości spektroskopowe, a mianowicie posiadają zdolność do wzbudzenia luminescencji, charakterystycznej dla tej grupy związków. W swej budowie zawierają jony pierwiastków ziem rzadkich, które na skutek promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni (ang. *near infrared*, NIR) są w stanie naturalnie wyemitować promieniowanie z zakresu światła widzialnego (VIS) lub ultrafioletowego (UV) [5,64-68]. Emisja luminescencji opiera się na zachodzącym procesie konwersji energii w górę (ang. *up-conversion*, UC), zwanym inaczej promieniowaniem

anty-stokesowskim. Konwersja energii w górę odnosi się do nieliniowych procesów optycznych, w których sekwencyjna absorpcja dwóch lub więcej fotonów prowadzi do emisji światła o długości fali krótszej, niż długość fali wzbudzenia (emisja anty-stokesowska) [7,66]. W przeciwieństwie do innych procesów emisji opartych na absorpcji wielofotonowej, konwersja w górę może być skutecznie wzbudzana nawet przy stosunkowo niskich gęstościach mocy wzbudzenia [23,69].

UCNPs wykazują właściwości luminescencyjne anty-stokesowskie i mogą konwertować światło bliskiej podczerwieni do światła widzialnego (**Rycina 1**). Proces ten pozwala na obserwację ruchu nanocząstek w komórkach i tkankach oraz monitorowanie procesów, w których uczestniczą nanocząstki. UCNPs mają wysoką stabilność chemiczną i mogą być używane jako sondy fluorescencyjne w różnych układach biologicznych, ułatwiając wykonywanie testów biologicznych. Ponadto, UCNPs można funkcjonalizować poprzez przyłączenie specyficznym ukierunkowanych ligandów powierzchniowych (np. peptydów, przeciwciał lub leków drobnocząsteczkowych), oraz mogą być stosowane jako wysoce czułe i selektywne sondy do wykrywania określonych komórek [70,71]. Nanocząstki luminescencyjne są skutecznie wykorzystywane również jako optyczne znaczniki do obrazowania w terapii nowotworów [72].



Rycina 1. Schemat przedstawiający budowę nanocząstki konwertującej energię w górę oraz możliwości jej zastosowań biomedycznych.

Dodatkowo, w zależności od użytych jonów domieszkujących możemy nadawać UCNPs nowe właściwości lub decydować o kolorze emitowanego przez nie światła (np. Er^{3+} - zielone, Tm^{3+} - niebieskie, Sm^{3+} - pomarańczowe, Eu^{3+} - czerwone). Jony gadolinu (Gd^{3+}) wbudowane w matrycę domieszkowaną innymi jonami lantanowców, nadają nanocząstkom

właściwości magnetyczne [73]. Umożliwia to ich wykorzystanie jako środka kontrastującego w obrazowaniu MRI [74], a także jako nośnika różnych związków (np. leków) sterowanych zewnętrznym polem magnetycznym lub w hipertermii. Co więcej, taki skład chemiczny pozwala na wykorzystanie UCNPs w obrazowaniu multimodalnym (ang. *multimodal imaging*). Obrazowanie multimodalne opiera się na możliwości jednoczesnego obrazowania za pomocą wielu technik, a w tym przypadku luminescencji (znacznik fluorescencyjny) oraz rezonansu magnetycznego (środek kontrastowy) [7,75,76].

UCNPs stanowią ulepszoną alternatywę dla tradycyjnego obrazowania optycznego, ze względu na szereg innych zalet, takich jak odporność na wyświecanie (ang. *photobleaching*), niska autofluorescencja tła w materiale biologicznym, głęboka penetracja tkanek oraz minimalne fotouszkodzenia [77-81]. Powyższe cechy sprawiają, że nanocząstki te znajdują potencjalne zastosowanie w biologii i medycynie [82], szczególnie w obrazowaniu biologicznym *in vitro* i *in vivo* [7,23,81] oraz terapii fotodynamicznej (ang. *photodynamic therapy*, PDT) [83,84], fototermicznej (ang. *photothermal therapy*, PTT) [85] i hipertermicznej (ang. *hyperthermia*) [86] nowotworów [87].

W **Tabeli 2** zestawiono ze sobą barwniki organiczne, kropki kwantowe oraz nanocząstki konwertujące energię w górę ze względu na ich użyteczność w bioobrazowaniu.

Tabela 2. Porównanie barwników organicznych, kropek kwantowych oraz nanocząstek konwertujących energię w górę do zastosowań w obrazowaniu.

Właściwości	Barwniki organiczne i białka fluorescencyjne	Kropki kwantowe	Nanocząstki konwertujące energię w górę domieszkowane jonami lantanowców
Szerokość pasm absorpcji i emisji	Wąskie pasma absorpcji, szerokie pasma emisji	Bardzo szerokie pasma absorpcji, wąskie pasma emisji	Bardzo wąskie pasma absorpcji, bardzo wąskie pasma emisji
Czasy zaniku luminescencji	~1-5 ns [88,89]	~ 10-100 ns [90,91]	~ 0,1-5 ms
Odporność na fotowyświecanie	Słaba	Duża [92,93]	Duża
Rozmiar	0,5-5 nm [88]	1,5-10 nm [94]	10-30 nm
Zakres absorpcji promieniowania	UV/Vis	UV/Vis	NIR
Zakres emisji promieniowania	UV/Vis	UV/Vis	UV/Vis
Przesunięcie Stokesa	<50 nm	<50 nm	do 500 nm
Fotostabilność	Niska	Bardzo dobra; bez większych zmian nawet podczas dłuższych naświetlań, problem migotania	Doskonała, brak zmian nawet podczas długoterminowego naświetlania laserem
Toksyczność	Od niskiej do bardzo wysokiej Działanie kancerogenne i mutagenne [95-98]	Wysoka Zależna od właściwości fizykochemicznych [51] Uwalniają toksyczne jony Cd [52]	Niska Dotychczasowe wyniki wskazują na znikomy poziom toksyczności

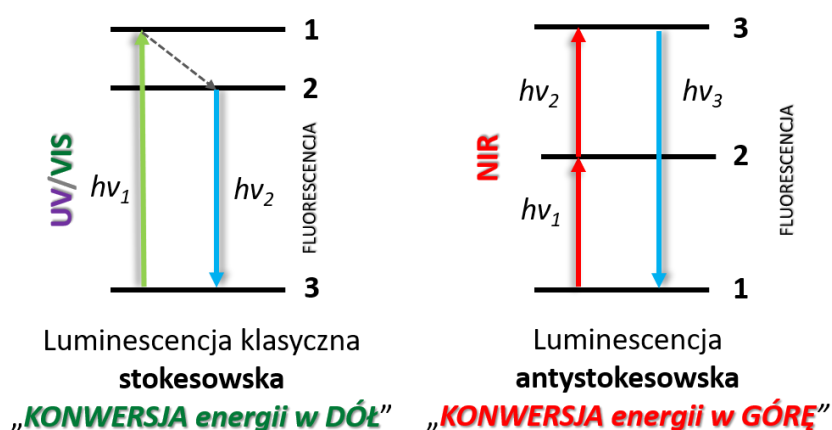
1.3. Proces konwersji energii w górę

Ze względu na swoje możliwości aplikacyjne (bio-obrazowanie i bio-detekcja), znaczącą rolę w nano-medycynie odgrywają materiały wykazujące właściwości luminescencyjne. Luminescencja (fotoluminescencja) to zjawisko emisji światła przez cząsteczki lub atomy, które przechodzą ze wzbudzonego stanu elektronowego na niższy elektronowy stan wzbudzony lub podstawowy. Następuje to w wyniku pochłonięcia przez nie promieniowania elektromagnetycznego z obszaru widzialnego, ultrafioletu lub podczerwieni. Wyróżnia się dwa zasadnicze mechanizmy luminescencji, oparte na procesie konwersji energii „w dół” (ang. *down-conversion*) lub konwersji energii „w górę” (ang. *up-conversion*) [99]. Dla większości związków wykazujących właściwości luminescencyjne, tzw. fluoroforów lub chromoforów obserwujemy konwersję energii w dół. Polega ona na wzbudzaniu fotonów, a następnie ich przechodzeniu z niestabilnego, wyższego poziomu na niższy. Energia powstała pomiędzy tymi poziomami zostaje zamieniona na promieniowanie wyemitowane w zakresie światła widzialnego, a emitowane fotony posiadają energię mniejszą niż fotony pochłonięte. Konwersja energii w dół jest procesem zachodzącym zgodnie z prawem Stokesa, które mówi, że długość fali wyemitowanego promieniowania luminescencyjnego (fluorescencja) jest zawsze większa od długości fali promieniowania wzbudzającego fluorescencję. Innymi słowy absorbowane fotony mają krótszą długość fali niż wyemitowane fotony. Energia emisji promieniowania jest niższa niż energia absorpcji, a różnica energii pomiędzy maksimum pasma absorpcji (dla zakresu długości fal pochłoniętych) a maksimum pasma emisji (dla zakresu długości fal emitowanych) dla tego samego stanu wzbudzonego nazywana jest przesunięciem Stokesa.

Najczęściej stosowane w aplikacjach bio-medycznych (bio-obrazowanie i bio-detekcja) fluorofory to barwniki organiczne i białka fluorescencyjne oraz kropki kwantowe, wykazujące fluorescencję pochodzącą z konwersji energii w dół [100]. Stosowane obecnie barwniki organiczne, pomimo dobrych właściwości optycznych charakteryzują się szeregiem wad, takich jak fotowyswiecanie ze względu na krótkie czasy zaniku fluorescencji, szerokie pasma emisji i wąskie pasma wzbudzenia oraz niewielką głębokość penetracji tkanek. Ponadto, do ich wzbudzenia stosowane jest często promieniowanie UV, które nie tylko powoduje zniszczenie samego barwnika (fotodegradacja) oraz fotouszkodzenia komórek i tkanek, ale jednocześnie wzbudza naturalnie występujące w żywych organizmach fluorofory takie jak flawiny, porfiry czy aminokwasy aromatyczne. Prowadzi to do niekorzystnego zjawiska autofluorescencji, wpływającego na parametry pomiarów obrazowania na skutek zmniejszania się stosunku sygnału do szumu oraz uniemożliwia długie obserwacje materiału biologicznego.

W odróżnieniu od organicznych fluoroforów, QDs wykazują bardzo dobrą stabilność podczas długiego naświetlania, szerokie pasma absorpcji i stosunkowo wąskie pasma emisji. Dodatkowo, ich właściwości luminescencyjne zależą od ich rozmiarów i mogą być w łatwy sposób modulowane. Wyniki pochodzące z wielu prac wykazały jednak ich znaczną toksyczność, związaną z uwalnianiem toksycznych pierwiastków w materiale biologicznym.

Interesującą alternatywą i zjawiskiem przeciwnym dla klasycznej luminescencji jest proces konwersji energii w górę. Konwersja energii w górę, nazywana również emisją antystokesowską, jest nieliniowym procesem optycznym, w którym zachodzi zamiana (konwersja) promieniowania elektromagnetycznego z zakresu bliskiej podczerwieni do światła widzialnego bądź też ultrafioletowego. Oznacza to, że pochłaniane promieniowanie posiada dłuższą długość fali niż promieniowanie emitowane. W procesie tym zachodzi absorpcja co najmniej dwóch fotonów, wskutek czego następuje emisja promieniowania o wyższej energii niż zaabsorbowana. **Rycina 2** przedstawia w uproszczony sposób różnice między klasyczną luminescencją a luminescencją towarzyszącą konwersji energii w górę.

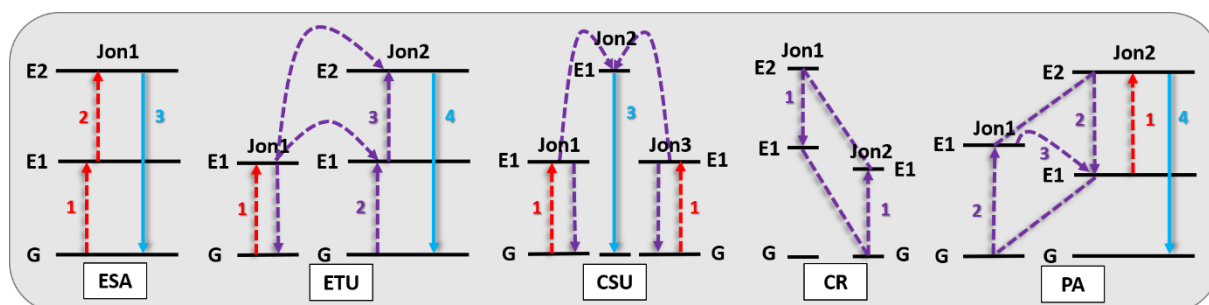


Rycina 2. Uproszczone diagramy przedstawiające proces klasycznej luminescencji stokesowskiej (konwersja energii w dół) oraz luminescencji antystokesowskiej (konwersja energii w górę). Oznaczenia: $h\nu$ – energia fotonów, czarne linie oznaczone numerami – stany energetyczne, zielona strzałka – absorpcja fotonów przy pobudzeniu UV/VIS, czerwone strzałki – absorpcja fotonów przy pobudzeniu NIR, niebieskie strzałki – emisja promieniowania (fluorescencja). Opracowanie własne na podstawie [99].

1.4. Mechanizmy konwersji energii w górę

Obecnie wyróżnia się pięć podstawowych mechanizmów przebiegu procesu konwersji energii w górę: 1) absorpcja ze stanu wzbudzonego (*ang. Excited State Absorption, ESA*), 2) konwersja energii w górę z transferem energii (*ang. Energy Transfer Up-conversion, ETU*), 3) lawina fotonów (*ang. Photon Avalanche, PA*), 4) relaksacja krzyżowa (*ang. Cross*

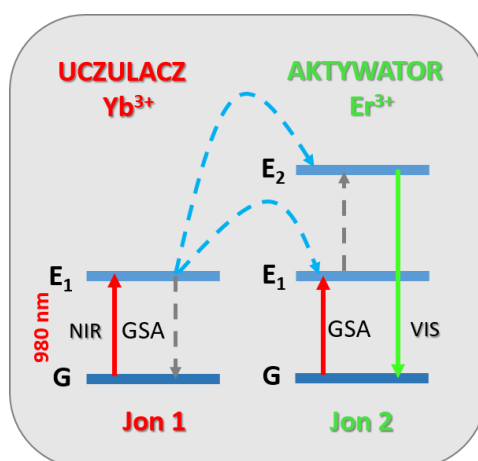
Relaxation, CR) oraz 5) kooperatywnie uczulana konwersja energii w górę (ang. *Cooperative Sensitization Upconversion, CSU*) (**Rycina 3**).



Rycina 3. Mechanizmy procesu konwersji energii w górę: ESA - absorpcja ze stanu wzbudzonego, ETU - konwersja energii w górę z transferem energii, CSU - kooperatywnie uczulana konwersja energii w górę, CR - relaksacja krzyżowa, PA- lawina fotonów. E1, E2 – stany energetyczne, G – stan podstawowy, niebieskie strzałki – emisja promieniowania, przerywane fioletowe strzałki – transfer energii, czerwone przerywane strzałki - absorpcja fotonu ze stanu podstawowego (GSA). Opracowanie własne na podstawie [67].

Spośród wymienionych procesów, dla nanokryształów $\beta\text{-NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ najbardziej efektywnym i wydajnym jest mechanizm przebiegu konwersji energii w górę z transferem energii (ETU) [64,65], określane również jako dodawanie fotonów przez transfer energii (ang. *Addition of Photons by Transfer of Energy*, fr. *Addition de Photons par Transferts d'Énergie*, APTE) [66]. Mechanizm ETU zachodzi w obrębie dwóch różnych, ale sąsiadujących ze sobą jonów, aktywatora oraz uczulacza [101-105]. W tym układzie jony iterbu (Yb^{3+}) pełnią funkcję donora (uczulacza), natomiast jony erbu (Er^{3+}) funkcję akceptora (aktywatora) oraz emitera energii. Dzięki temu, że różnica energii między stanem wzbudzonym a stanem podstawowym energii jonu uczulacza i jonu aktywatora jest zbliżona, a odległość między nimi jest wystarczająco mała, absorpcja promieniowania podczerwonego 980 nm przez jony uczulacza umożliwia wystąpienie transferu energii do jonów aktywatora. Taki bezpromienisty przekaz energii z jonów Yb^{3+} do Er^{3+} prowadzi do wzbudzenia wysokoenergetycznych stanów elektronowych i wystąpienia emisji promieniowania w zakresie widzialnym [23]. Schemat zachodzącego procesu konwersji energii w górę poprzez mechanizm ETU w badanych nanocząstkach $\beta\text{-NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$, został przedstawiony na **Rycinie 4**. Jon 1 (uczulacz) przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 980 nm (NIR) pochłania foton i ulega wzbudzeniu ze stanu podstawowego G przechodząc na wyższy poziom energetyczny do stanu wzbudzonego E1 (proces absorpcji fotonu ze stanu podstawowego, ang. *ground-state absorption*, GSA). W wyniku absorpcji fotonu jon 1 przenosi zebraną energię do jonu 2 (aktywator). Ponowna absorpcja niskoenergetycznego fotonu przez jon 1 i kolejny transfer energii powoduje przejście jonu 2 do jego górnego stanu wzbudzonego E2. Uczulacz po każdym transferze energii do aktywatora wraca z powrotem do stanu podstawowego G.

Wzbudzony jon 2 wracając do swojego stanu podstawowego G jest zdolny do emisji promieniowania w zakresie światła widzialnego (VIS). Jon Yb^{3+} jest idealnym kandydatem do roli jonu uczulającego, ze względu na nieskomplikowany układ poziomów energetycznych, zawierający tylko jeden stan wzbudzony [106,107]. Natomiast jony Er^{3+} idealnie sprawdzają się w charakterze aktywatora w procesach konwersji energii w górę ze względu na swoją konfigurację poziomów energetycznych. Wykazują długie czasy życia pośrednich elektronowych poziomów energetycznych, które są łatwo dostępne dla promieniowania w zakresie bliskiej podczerwieni. Ponadto, posiadają stosunkowo duże przerwy energetyczne pomiędzy poziomem pośrednim a emitującym oraz z łatwością ulegają wzbudzeniu ze stanu pośredniego do stanu wyższego, co przekłada się na bardzo wydajną anty-stokesowską emisję luminescencji [7,23,76,107].



Rycina 4. Mechanizm przebiegu konwersji energii w górę z transferem energii (ETU). Oznaczenia: czerwone strzałki – GSA - absorpcja fotonu ze stanu podstawowego, przerywane szare strzałki - przejścia bezpromienne, przerywane niebieskie strzałki – transfer energii, zielona strzałka – emisja promieniowania, NIR – bliska podczerwień, VIS – światło widzialne. Opracowanie własne na podstawie [23,103,104,107-109].

Mechanizm wzbudzenia energii ma charakter wieloetapowy i wymaga sekwencyjnej absorpcji dwóch niskoenergetycznych fotonów (kwantów energii) w celu wygenerowania jednego wysokoenergetycznego fotonu [110]. Promieniowanie laserowe o długości fali 980 nm zapewnia maksymalną absorpcję w jonach Yb^{3+} [111]. Najbardziej efektywny proces konwersji energii w górę wykazują nieorganiczne matryce NaYF_4 fazy heksagonalnej [7], domieszkowane parami trójwartościowych jonów Yb^{3+} - Er^{3+} [66,112-115]. W efektywnym transferze energii szczególnie ważna jest odległość między jonami [116] uwarunkowana stężeniem domieszek [104,115,117] oraz ich układ przestrzenny [107]. Kiedy nanomateriały z domieszką jonów Er^{3+} są uczulane (sensytyzacja) przez jony Yb^{3+} , zarówno wysoki przekrój czynny na absorpcję promieniowania o długości 980 nm jonów uczulacza ($1,2 \times 10^{-20} \text{ cm}^2$ [118])

w porównaniu do samych jonów Er^{3+} ($1,7 \times 10^{-21} \text{ cm}^2$ [68,118]) oraz efektywny mechanizm transferu energii między obydwoma jonami Yb^{3+} i Er^{3+} prowadzą do wzmocnienia wydajności konwersji energii w górę [119,120].

Wiele nieorganicznych matryc z domieszką lantanowców jest w stanie emitować światło widzialne przy wzbudzeniu NIR, ale wysoce wydajna konwersja energii w górę wymaga dobrego dopasowania między zastosowaną siecią macierzystą, jonami domieszki i stężeniem domieszek [103]. Długie czasy zaniku luminescencji są charakterystyczne dla wzbudzonych jonów Yb^{3+} , w związku z tym są one zdolne do magazynowania energii. Ponadto, struktura elektronowa Yb^{3+} ma zdolność minimalizowania niekorzystnych procesów związanych z wygaszaniem stężeniowym. Wobec powyższego, stężenie jonów Yb^{3+} pełniącego funkcję uczulacza w matrycy może być 10-20 krotnie większe niż stężenie jonów Er^{3+} będącego aktywatorem [76] [109] [66]. Domieszka jonów zapewnia centra luminescencyjne, natomiast matryca zapewnia sieć krystaliczną, która lokuje te centra w optymalnej pozycji [66]. Domieszkę stanowią zwykle jony lantanowców dodawane w niskich stężeniach [109]. Dla Er^{3+} optymalne wartości domieszek to zazwyczaj nieprzekraczające 3% (przeważnie 2%), a dla Yb^{3+} najczęściej pomiędzy 18-20% [65,66,107,121,122].

Zjawisko konwersji energii światła w górę, obserwowane w nanomateriałach domieszkowanych wybranymi parami jonów lantanowców (para Yb^{3+} - Er^{3+} w badanych nanocząstkach) pozwala nie tylko na efektywne wzbudzenie światła z zakresu widzialnego (zielona i czerwona emisja pochodząca od jonów Er^{3+}) w wyniku wzbudzenia laserem pracy ciągłej o długości fali $\sim 980 \text{ nm}$ (absorpcja przez jony Yb^{3+}), ale również nie wymaga stosowania drogich źródeł światła wzbudzającego (lasery femtosekundowe). Wykorzystanie tego zjawiska stanowi więc bardzo atrakcyjną alternatywę w stosowanych układach mikroskopowych do obrazowania struktur biologicznych zarówno na poziomie *in vitro* jak i *in vivo* [111].

1.5. Metody syntezy nanocząstek konwertujących energię w górę

Chemiczne metody otrzymywania UCNPs na bazie ich prekursorów należą do najbardziej uniwersalnych. Głównym ograniczeniem stosowania UCNPs w badaniach biologicznych, jest brak możliwości ich bezpośredniego wykorzystania po syntezie. Wynika to z faktu, że najczęściej stosowane syntezy chemiczne tego typu związków prowadzą do uzyskania koloidalnych roztworów nanocząstek, ale w rozpuszczalnikach organicznych (cykloheksan, chloroform, toluen). W celu wyodrębnienia nanocząstek konieczna jest modyfikacja ich powierzchni, która najpierw umożliwi transfer nanocząstek z toksycznych

rozpuszczalników organicznych do obojętnych roztworów wodnych, a następnie efektywny transfer do komórek lub organizmów żywych.

Dzięki wymianie pierwotnych ligandów hydrofobowych na hydrofilowe można otrzymać wodne roztwory tych nanocząstek, co umożliwia wykorzystanie ich luminescencyjnych właściwości w biologii i medycynie, zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*. Funkcjonalizowane nanomateriały zbudowane są z nieorganicznego rdzenia, który stanowi nanocząstka oraz dołączonych do jej powierzchni specyficznych ligandów, które nadają temu układowi nie tylko stabilność koloidalną, ale także nowe właściwości. Nanocząstki mogą być nośnikami lub wykazywać właściwości spektroskopowe, natomiast dołączone ligandy będą selektywnie oddziaływać z składnikami komórki i otaczającym go środowiskiem biologicznym. Otwiera to nowe możliwości aplikacyjne dla tak zaprojektowanych nanomateriałów oraz zwiększa ich biokompatybilność. W **Tabeli 3** przedstawiono główne metody syntezy materiałów wykazujących zjawisko konwersji energii w górę.

Tabela 3. Główne metody syntezy nanocząstek konwertujących energię w górę.

METODA SYNTEZY	ZAKRES WIELKOŚCI UCNPs	ZALETY	WADY	PRZYKŁADY
Współstrącania (ang. <i>Co-precipitation method</i>)	10-30 nm	Szybka synteza, niskie koszty, proste procedury, wąski rozrzut rozmiarów	Wysokie temperatury reakcji, skłonność do agregacji, brak kontroli wielkości	Y ₃ Al ₅ O ₁₂ BaYF ₅ NaYF ₄ LuPO ₄ YbPO ₄
Termiczna dekompozycja (ang. <i>Thermal decomposition method</i>)	50-500 nm	Wysoka jakość nanokryształów, Jednolity kształt	Wysokie koszty, toksyczne odczynniki, wrażliwe na powietrze prekursorów metali	LiYF ₄ NaYF ₄
Mikroemulsji (ang. <i>Microemulsion method</i>)	40-500 nm	Prosta procedura, wysoka stabilność nanokryształów, wąski zakres rozmiarów	Często wymagane prażenie i wyżarzanie	LaF ₃ NaYF ₄
Zol-żel (ang. <i>Sol-gel processing</i>)	30-600 nm	Tanie koszty prekursorów, prosta procedura	Szeroki rozrzut rozmiarów, ciężko kontrolować kształt, nieodpowiednia do zastosowań biomedycznych, skłonność do agregacji	YVO ₄ Lu ₃ Ga ₅ O ₁₂ BaTiO ₃ TiO ₂ ZrO ₂
Hydrotermalna (ang. <i>Phase transfer hydrothermal synthesis</i>)	10-1000 nm	Dobra dyspersja, proste procedury, wysokiej jakości kryształy z możliwością regulowania ich rozmiaru, kształtu i domieszek jonów	Potrzebne specjalistyczne naczynka reakcyjne, niemożliwa obserwacja wzrostu nanokryształów	LuF ₃ , NaYF ₄ , Ba ₂ YF ₇ , ZnGa ₂ O ₄ , YVO ₄

Tabelę opracowano na podstawie [23,66,67,99].

Wśród dostępnych metod syntezy UCNP_s NaYF₄ wybrałam tzw. metodę współstrącania, ze względu na nieskomplikowaną procedurę, pozwalającą uzyskać w krótkim czasie nanocząstki o wąskim rozrzucie rozmiarów, nieprzekraczającym 30 nm oraz czystej fazie heksagonalnej, gwarantującej efektywną emisję luminescencji.

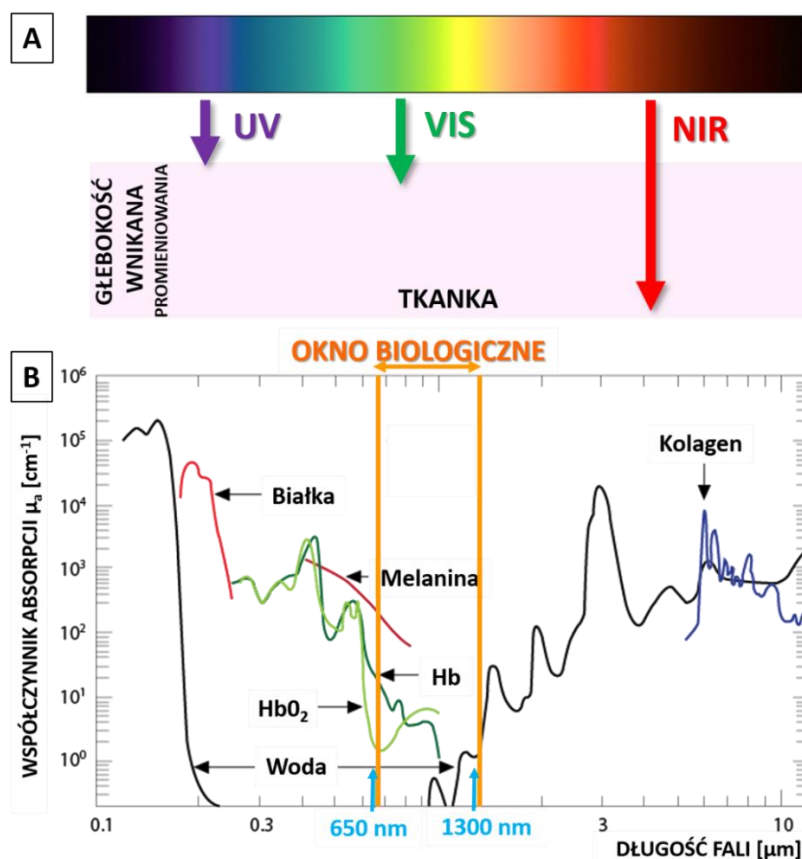
1.6. Zalety wykorzystania światła bliskiej podczerwieni

Bioobrazowanie jest kluczowym narzędziem do badania zjawisk biologicznych i diagnozowania chorób, takich jak nowotwory. Obrazowanie optyczne jest wysoce komplementarne w stosunku do innych metod obrazowania, takich jak obrazowanie rentgenowskie lub rezonans magnetyczny, w szczególności ze względu na możliwość pozyskiwania danych z dużą szybkością. Pozwala to na wizualizację dynamicznych procesów biologicznych, zarówno związanych z fizjologią jak i postępem choroby. Ponieważ wykrycie chorób na najwcześniejszych etapach znacznie zwiększa szansę na pełne wyzdrowienie pacjenta, rośnie zapotrzebowanie na wydajne i niezawodne bio-sondy. Obecnie stosowane klinicznie sondy fluorescencyjne są najczęściej oparte na cząsteczkach organicznych. Jednak zazwyczaj wymagają one wzbudzenia światłem o wysokiej energii (UV lub światło niebieskie) w celu wygenerowania emisji światła widzialnego (VIS). Takie zastosowanie światła UV powoduje fotowysyblanie cząsteczek organicznych, co ogranicza ich czasowe wykorzystanie. Dalsze wady obejmują autofluorescencję tkanki biologicznej po wzbudzeniu promieniowaniem UV, co prowadzi do zmniejszenia kontrastu obrazu przez interferencję tła oraz fototoksyczność światła UV w stosunku do materii biologicznej. Co więcej, światło UV i VIS penetruje tkankę w ograniczonym zakresie, powodując jednocześnie jej uszkodzenie, co nie pozwala na głębokie i długotrwałe obrazowanie [123].

Możliwość wzbudzenia światłem z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) jest niewątpliwą i najważniejszą zaletą UCNP_s wykorzystywaną w bio-obrazowaniu oraz innych zastosowaniach biomedycznych. Po pierwsze, NIR pozwala wyeliminować niekorzystną autofluorescencję w zakresie widzialnym, która utrudnia wykrywanie komponentów biologicznych. Autofluorescencja pochodzi od naturalnie występujących fluoroforów w tkankach biologicznych (jest obserwowana przy długościach fal wyższych niż promieniowanie pobudzające - przesunięcie Stokesa). Nanomateriały wykazujące konwersję energii w górę charakteryzują się doskonałą stabilnością fotochemiczną oraz wykazują znikomą autofluorescencję tła, ze względu na stosowany zakres wzbudzenia w podczerwieni. Takie nanostruktury mogą być stosowane do ultraczułej, wolnej od zakłóceń bio-detekcji, ponieważ biomolekuły nie posiadają właściwości konwersji energii w górę. Promieniowanie

podczerwone (NIR), umożliwia również znacznie głębszą penetrację tkanek biologicznych w porównaniu do promieniowania o innych (często krótszych, jak UV) długościach fal, minimalizując przy tym ich fotouszkodzenia.

Zakres promieniowania podczerwonego (700 - 1100 nm) znajduje się w przedziale tzw. okna biologicznego (ang. *biological window*, zakres: 650-1300 nm) inaczej określanego oknem optycznym (ang. *optical window*) lub terapeutycznym (**Rycina 5**). W tym przedziale absorpcja komponentów biologicznych występujących w organizmie jest najniższa. Głównie absorbują: krew, melanina, białka, woda, tkanka tłuszczowa i naskórek [123,124]. Dzięki temu, zastosowanie NIR po wnikięciu w głąb tkanek nie wywołuje ich autofluorescencji i ulega niewielkiemu rozpraszaniu. Jest to zgodne z prawem rozpraszania (prawo rozpraszania Rayleigh'a), które mówi, że stopień rozproszenia promieniowania jest tym mniejszy, im dłuższa jest długość fali użytego promieniowania elektromagnetycznego. Dodatkową zaletą NIR jest możliwość stosowania tanich laserów pracy ciągłej o stosunkowo niskiej gęstości mocy ($1-10^3 \text{ W/cm}^2$) [125-127].



Rycina 5. Schemat obrazujący głębokość penetracji tkanki przez promieniowanie o różnej długości fali (A). Zakres okna biologicznego (B). Opracowanie własne na podstawie [124,126].

1.7. Funkcjonalizacja nanocząstek

Wykorzystanie wysokiej jakości funkcjonalnych nanomateriałów w aplikacjach biomedycznych i obrazowaniu wymaga jednak opracowania i optymalizacji metod modyfikacji ich powierzchni, czyli biofunkcjonalizacji. Proces ten polega na przyłączaniu do nieaktywnej chemicznie nanocząstki - cząsteczek biologicznych, którymi mogą być kwasy nukleinowe, krótkie peptydy, białka i przeciwciała oraz inne biomolekuły, które wykazują specyficzne interakcje ze składnikami analizowanego materiału biologicznego [23,128,129].

Modyfikacja powierzchni nanomateriałów jest aktualnie przedmiotem licznych badań. Odpowiednia funkcjonalizacja nanocząstek zapewnia bądź poprawia biokompatybilność, co oznacza, że zmniejsza się ich toksyczność, a także oddziaływania z układem immunologicznym, co obniża ryzyko ich eliminacji z organizmu. Pozwala również na uzyskanie biospecyficzności, która umożliwi selektywne wykrywanie biomolekuł takich jak białka, antygeny, DNA lub komórki nowotworowe, co może służyć do biodetekcji w testach przesiewowych, czy też wykrywania mutacji genetycznych [130]. Uzyskane w wyniku biofunkcjonalizacji nanomateriały posiadają właściwości pozwalające spełniać określoną funkcję bez wywoływania jakichkolwiek lokalnych lub systemowych efektów ubocznych. Biofunkcjonalizacja nanocząstek jest obecnie jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin o charakterze interdyscyplinarnym, obejmującą zarówno obszar chemii, biologii, fizyki jak i medycyny, mogącą prowadzić do szeregu nowych zastosowań.

UCNPs, jako nowa generacja środków obrazujących, jest szeroko badana do stosowania w terapii PDT, PTT, chemioterapii i radioterapii, a także MRI, obrazowaniu rentgenowskim CT (ang. *X-ray CT imaging*), obrazowaniu fotoakustycznym (ang. *photoacoustic imaging*, PA), obrazowaniu termowizyjnym NIR (ang. *NIR thermal imaging*), obrazowaniu luminescencyjnym wykorzystującym zjawisko konwersji energii w górę (ang. *upconversion luminescence imaging*, UCL). Coraz więcej badań skupia się na wykorzystaniu potencjału UCNPs w PDT, ponieważ po odpowiedniej biofunkcjonalizacji mogą reagować jak fotouczulacze [82]. Dodatkowo, mogą być stosowane jako nośniki leków lub genów (np. doksorubicyna, siRNA, DNA, mikroRNA) [131].

Do niedawna trudno było znaleźć podwójnie funkcjonalny nanomateriał, który może służyć jednocześnie jako sonda do obrazowania i nośnik leku. Nanomateriały wykorzystywane jako skuteczne nośniki leków powinny spełniać następujące kryteria: (1) skutecznie dostarczać lek, (2) charakteryzować się dobrą biokompatybilnością oraz (3) dobrą stabilnością w krążeniu *in vivo* [23,132]. W ostatnim czasie, szybki rozwój nanomedycyny stworzył nowe możliwości

do uzyskania pożądaných właściwości nanomateriałów wykazujących zjawisko konwersji energii w górę.

1.8. Interakcje nanocząstek z komórkami

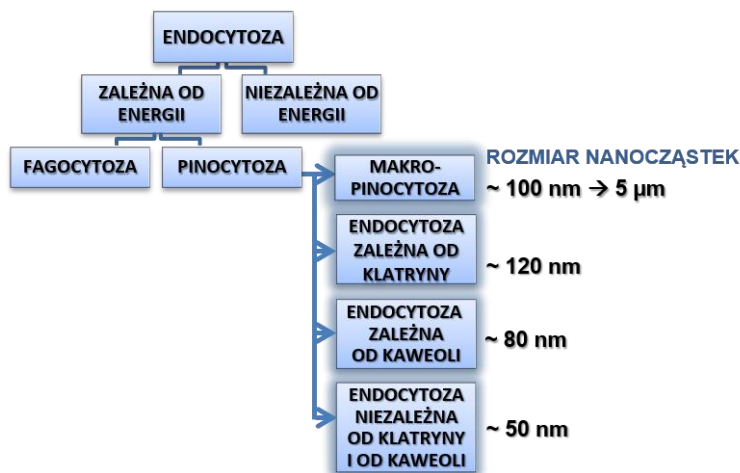
Zrozumienie fizycznych i chemicznych interakcji zachodzących pomiędzy nanocząstkami i strukturami biologicznymi jest kluczowe dla uzyskania odpowiedzi na pytania: 1) co się dzieje z nanocząstkami w momencie, kiedy dodawane są do układów biologicznych; 2) czy poszczególne komponenty biologiczne reagują z nanocząstkami i w jaki sposób; 3) czy i w jaki sposób procesy te będą kształtować odpowiedź biologiczną w obecności nanocząstek?

W rozważaniach nad zastosowaniem nanocząstek w badaniach biomedycznych, najważniejszym elementem określającym ich przydatność jest interakcja nanomateriałów ze składnikami komórkowymi, takimi jak błona komórkowa oraz organelle komórkowe. Dla szczegółowego zrozumienia tych interakcji kluczowe są informacje o mechanizmach ich internalizacji i szlakach wewnątrzkomórkowych, aktywowanych obecnością nanomateriałów. Interakcje te są uwarunkowane wielkością, kształtem, ładunkiem i właściwościami powierzchni. Właściwości powierzchni nanocząstek obejmują czynniki takie jak wartość potencjału powierzchniowego oraz dynamiczna agregacja białek w formie korony białkowej, która powstaje wokół nanocząstek w środowisku biologicznym [133].

Głównym procesem wykorzystywanym przez komórki do internalizacji nanocząstek jest endocytoza [134-139]. Endocytoza jest istotnym procesem pobierania przez komórkę składników odżywczych, który przebiega z udziałem, bądź bez udziału receptorów na powierzchni komórki. Oprócz tego, że jest procesem transportowym, endocytoza jest istotna dla regulacji metabolizmu, a także przesyłania informacji i cząstek w obrębie komórki lub do odległych tkanek [140,141]. Nanocząstki, które są efektywnie internalizowane w wyniku endocytozy, wykazują potencjał możliwy do wykorzystania w dostarczaniu środków do obrazowania w celach diagnostycznych oraz leków lub kwasów nukleinowych w celach terapeutycznych [134,142].

Tradycyjna klasyfikacja endocytozy ze względu na rodzaj pobranego materiału uwzględnia fagocytozę oraz pinocytozę. Fagocytoza dotyczy komórek takich jak makrofagi, monocyty, neutrofile czy też komórki dendrytyczne. Natomiast pinocytoza występuje we wszystkich nefagocytykujących komórkach eukariotycznych i obejmuje cztery główne mechanizmy, do których zaliczamy: endocytozę z udziałem klatryny, endocytozę z udziałem kaweoli (białka kaweoliny), endocytozę niezależną od klatryny i od kaweoli oraz

makropinocytozę. W zależności od typu i wielkości nanocząstek preferowany jest inny szlak endocytozy (*Rycina 6*).



Rycina 6. Schemat ilustrujący mechanizmy endocytozy z uwzględnieniem wielkości pobieranych nanocząstek przez poszczególne szlaki.

Pobieranie nanocząstek przez komórki można postrzegać jako proces dwuetapowy: wiązanie nanocząstek z błoną komórkową oraz internalizacja nanocząstek. Na pierwszy etap największy wpływ mają właściwości fizykochemiczne nanocząstek, a zwłaszcza ich ładunek powierzchniowy [143]. Powszechnie wiadomo, że dodatnio naładowane nanocząstki są efektywniej internalizowane przez komórki, niż nanocząstki obojętne lub ujemnie naładowane [144,145]. Wynika to z oddziaływań elektrostatycznych zachodzących pomiędzy nanomateriałami a komórkami i wiąże się z ujemnie naładowaną powierzchnią błony komórkowej. Ta właściwość wydaje się być przypisana nanocząstkom o różnym składzie chemicznym i poddanych różnym modyfikacjom powierzchni [146]. Dlatego dodatnio naładowane nanocząstki są zwykle wybierane jako nośniki leków lub genów [144,147]. Istnieją jednak dowody na to, że pobierane mogą być również ujemnie naładowane nanocząstki [148], co sugeruje, że oddziaływania elektrostatyczne tylko częściowo odpowiadają za interakcje w układzie nanocząstka-komórka. Po wprowadzeniu do środowiska biologicznego, nanocząstki są szybko pokrywane przez białka, które adsorbują się na powierzchni nanomateriałów. Tworząca się tzw. korona białkowa, wpływa na zmianę oryginalnych właściwości fizykochemicznych nanocząstek. Sprawia to, że nanocząstki zmieniają swoją pierwotną „syntetyczną tożsamość” i nabywają nowej „tożsamości biologicznej”, co będzie miało bezpośredni wpływ na odpowiedź biologiczną [144,145,149-156].

Zatem, zgodnie z najnowszymi badaniami należy uwzględniać nie tylko ładunek nanocząstek (tj. potencjał powierzchniowy), ale również powstawanie korony białkowej.

Istotną kwestią jest fakt, że w zależności od przeznaczenia, preferowane są nanocząstki, stabilne bądź też łatwo ulegające degradacji. Nanocząstki, których funkcją jest uwalnianie jonów, np. nanocząstki srebra w produktach antybakteryjnych [157] lub nanocząstki tlenku żelaza w leczeniu niedokrwistości [158]) powinny być biodegradowalne. Natomiast, nanocząstki stosowane jako związki kontrastujące (np. nanocząstki tlenku żelaza i gadolinu w MRI, NPs złota i srebra w powierzchniowym rezonansie plazmonowym - ang. *surface plasmon resonance*, SPR) lub do bio-obrazowania (kropki kwantowe, nanocząstki konwertujące energię w górę), powinny być szybko i w całości usuwane z organizmu, bez efektu kumulowania się w tkankach.

1.9. Nanocząstki w neurobiologii

Zdolność nanocząstek do przekraczania różnych barier biologicznych, w tym bariery krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB) powoduje, że prowadzone są badania nad wykorzystaniem ich w diagnostyce i leczeniu chorób centralnego układu nerwowego (ang. *central nervous system*, CNS) [159-163]. Znaczenie nanonauk w terapii chorób układu nerwowego dotyczy coraz większej liczby zagadnień [164,165]. Pomimo, że jest to dość słabo przebadana dziedzina, to szeroko podejmowane są próby wykorzystania nanomateriałów jako nośników leków [166], strategii w badaniach nad neuroprotekcją, rusztowań (skafoldy) w badaniach nad neurodegeneracją, a także do neuroobrazowania, lub jako narzędzia do neurooperacji [167]. Główne podejścia nanotechnologiczne dotyczące zaburzeń neurorozwojowych, neurologicznych i neuropsychiatrycznych obejmują: (1) stosowanie nanocząstek lub nanośników do dostarczania leków lub terapii genowych; (2) stosowanie nanotechnologii do rekonstrukcji, wzmacniania i/lub stabilizacji cytoszkieletu; (3) wytwarzanie bio-hybrydowych urządzeń do transportu różnych związków; oraz (4) pokrywanie nanocząstkami elektrod [168].

Największym zainteresowaniem cieszą się techniki projektowania i dostarczania leków. Skanowane są duże molekularne bazy danych, w których szuka się potencjalnych leków, które będą dostarczać specyficzne białka do uszkodzonych neuronów w celu przywrócenia komórkom ich funkcji. Uszkodzenie neuronów w wielu zaburzeniach układu nerwowego sprzyja poszukiwaniu nowych terapii lekowych i genowych oraz projektowaniu nanourządzeń protetycznych [168]. Oczekuje się, że teranostyka oparta na nanotechnologii doprowadzi do znacznych postępów w precyzyjnej i spersonalizowanej medycynie CNS [164].

Wśród wielu prób wykorzystania różnych typów nanocząstek do zastosowań w neurobiologii, UCNPs wykorzystane były głównie do obrazowania i terapii nowotworów

[169], optogenetycznej kontroli neuronów (ang. *optogenetic neuronal control*) [170171], jako bioczujniki (biosensory) do wykrywania jonów Zn^{2+} w neurodegeneracyjnym modelu choroby Alzheimera na mysich skrawkach mózgu oraz na danio pręgowanym (ang. *zebrafish*) [172], obrazowania mózgu na skrawkach mózgu myszy [173], czy też stosowane były jako blokery kanałów jonowych w neuronach w hodowli skrawków mózgowych [174]. Najnowsze badania dotyczyły wykorzystania UCNPs w trójchromatycznej optogenetyce neuronów myszy *in vivo* [175].

1.10. Metody oceny toksyczności nanocząstek

Obecnie toksyczność nanocząstek inżynieryjnych (zaprojektowanych) ocenia się za pomocą wielu metod. Wśród nich, najbardziej ekonomiczne finansowo i czasowo są badania *in vitro*. Dotychczas, badania *in vitro* przeprowadzane w wielu laboratoriach dostarczyły różnych wyników. Wynika to z powodu braku standaryzacji protokołów i braku dostatecznych regulacji. Badanie cytotoksyczności nowo syntetyzowanych nanomateriałów przeprowadza się za pomocą testów kolorymetrycznych opartych na redukcji soli tetrazolowej (ang. *tetrazolium salts*), takich jak: MTT, MTS, XTT i WST-1. Integralność błony komórkowej bada się za pomocą testu LDH (ang. *lactate dehydrogenase*), apoptozę ocenia się na podstawie biomarkerów immunohistochemicznych, a genotoksyczność - przy użyciu testu komet [3].

Do wykrywania żywych komórek najczęściej stosuje się związki takie jak MTT, MTS, XTT i WST-1. MTT, będąc związkiem o potencjale dodatnim, łatwo wnika do żywych komórek eukariotycznych, podczas gdy związki, takie jak MTS, XTT i WST-1, o ujemnym potencjale, nie przenikają szybko przez błony komórkowe. Test MTT jest bardzo szeroko stosowany w laboratoriach do oceny toksyczności komórkowej. Żywe komórki przekształcają związek MTT w produkt o innym kolorze, który jest następnie wykrywany na podstawie jego absorpcji w absorpcyjnym czytniku płytek. W przypadku komórek niezdolnych do życia traci on tą możliwość, ponieważ produkt nie może powstawać w nieaktywnych metabolicznie, martwych komórkach [3]. Ze względu na wyjątkowe właściwości fizykochemiczne nanocząstki oddziałują ze składnikami komponentów biologicznych, co może zakłócać prawidłowy odczyt i dawać zmienne wyniki, co zauważono w przypadku nanomateriałów węglowych [176]. Nanocząstki indukują również powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS), co może wpływać na enzymy mitochondrialne w komórkach, a następnie na ostateczny odczyt wyników [177]. Do wewnątrzkomórkowej lokalizacji nanocząstek oraz ich wpływu na morfologię komórek (co ma bezpośredni związek z toksycznością nanocząstek) wykorzystuje się mikroskopię elektronową, która jest tutaj niezastąpioną techniką [178-180]. Przegląd

literatury obejmującej wykorzystanie obrazowania TEM w celu zbadania internalizacji i lokalizacji nanocząstek w komórkach, pokazuje różne możliwości zapewnienia dodatkowego wglądu w te procesy, które są nieosiągalne przy pomocy innych technik.

2. Założenia i cel pracy

Dynamiczny rozwój nanotechnologii oraz możliwości jej zastosowania w różnych dziedzinach nauki stworzyły perspektywy wykorzystania nanomateriałów w biomedycynie. Zdolność nanomateriałów do przenikania przez selektywnie przepuszczalną błonę komórkową oraz możliwość modulowania ich właściwości fizykochemicznych sprawiają, iż posiadają one wysoki potencjał aplikacyjny w biologii i medycynie. Niesie to ze sobą szanse uzyskania rewolucyjnych rozwiązań w zakresie diagnostyki i terapii chorób, w tym nowotworowych, a także obiecujących znaczników wykorzystywanych do bio-obrazowania w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*.

Szczególnie interesującymi zagadnieniami w opracowaniu nowatorskich nano-systemów jest zrozumienie oddziaływań zachodzących po podaniu nanocząstek do układów biologicznych. Pomimo szeroko prowadzonych badań w tym zakresie, liczba informacji na temat wpływu nowych nanomateriałów na zdrowie człowieka (oceny ryzyka wynikającego z narażenia) wciąż nie jest proporcjonalna do tempa rozwoju tej dyscypliny nauki. Ze względu na szerokie spektrum pożądanych cech i właściwości nanomateriałów oraz ich potencjalnych zastosowań, ocena ich bezpieczeństwa jest fundamentalnym procesem przy projektowaniu nowych nanocząstek. Istnieje pilna potrzeba uzyskania takich nanomateriałów, które będą się charakteryzowały niskim poziomem cytotoksyczności oraz wysoką biokompatybilnością.

Obecnie wśród najbardziej popularnych nanocząstek stosowanych w bio-medycynie na szczególną uwagę zasługują nanocząstki nowej generacji uzyskane na bazie pierwiastków ziem rzadkich, które wydają się być doskonałym kandydatem spełniającym powyższe kryteria. Takie nanocząstki charakteryzują się różnym składem chemicznym i właściwościami. Na potrzeby pracy zsyntetyzowano nanocząstki o nowych właściwościach fizykochemicznych determinowanych składem pierwiastków ziem rzadkich, charakteryzujące się efektywną luminescencją w materiale biologicznym i potencjałem aplikacyjnym możliwym do przyszłego wykorzystania w biologii i medycynie.

Celem prowadzonych badań była synteza, określenie właściwości fizykochemicznych oraz funkcjonalności nowej generacji nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ do zastosowań bio-medycznych.

Realizację tak szerokiego tematu przeprowadzono w kilku etapach, dlatego pracę podzielono na trzy główne części i dla każdej z nich zrealizowano kilka celów szczegółowych, przeprowadzając następujące badania:

1) synteza oraz charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych nanocząstek NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ przeprowadzona w celu weryfikacji ich kształtu, rozmiaru, struktury i składu pierwiastkowego, w tym:

- charakterystyka morfologiczna otrzymanych nanocząstek NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺
- analiza spektroskopowa otrzymanych nanocząstek NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺

2) ocena funkcjonalności i efektywności nanocząstek w układach biologicznych *in vitro* - zbadanie interakcji pomiędzy nanocząstkami NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ a komórkami linii HeLa oraz HEK, w tym:

- ocena możliwości pobierania nanocząstek NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ przez badane komórki oraz identyfikacja mechanizmów ich internalizacji
- określenie sub-komórkowej lokalizacji nanocząstek NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ w badanych komórkach
- ocena profilu cytotoksyczności nanocząstek NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ oraz zmian ultrastrukturalnych w komórkach po ekspozycji na nanocząstki NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺
- ocena indukcji stresu oksydacyjnego w badanych komórkach po ekspozycji na nanocząstki NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺

3) ocena biologicznych interakcji wywołanych przez nanocząstki NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ w modelu *ex vivo* organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura, w tym:

- określenie możliwości internalizacji nanocząstek NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺
- ocena cytotoksyczności oraz zmian ultrastrukturalnych po ekspozycji na nanocząstki NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺

3. Materiały i metody

3.1. Materiały i metody stosowane w syntezie i charakterystyce nanocząstek

3.1.1. Nanocząstki kowertujące energię w górę domieszkowane jonami metali ziem rzadkich

W badaniach wykorzystano nanocząstki konwertujące energię w górę β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺, które zostały zsyntetyzowane przez mnie w Środowiskowym Laboratorium Fizyki Biologicznej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Nanocząstki β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ to nanomateriały o właściwościach luminescencyjnych, oparte na matrycy fluorkowej NaYF₄ i domieszkowane jonami pierwiastków ziem rzadkich: iterbem (Yb³⁺) oraz erbem (Er³⁺). Średnica nanocząstek została określona przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego i wynosiła ~20 nm. Histogramy rozkładu średnich rozmiarów nanocząstek uzyskano poprzez analizę ~200 losowo wybranych nanocząstek z fotografii wykonanych przy pomocy programu SmartTiffV2 (Carl Zeiss, Niemcy). Bezpośrednio po syntezie nanocząstek określano ich stężenie w otrzymanej próbce. W tym celu każdorazowo otrzymaną próbkę oczyszczano z kwasu oleinowego oraz zawieszano w 1 ml sterylnej wody. Roztwór nanocząstek w wodzie przechowywano w temperaturze pokojowej. Stężenie nanocząstek było oznaczane w oparciu o suchą masę fluorków.

3.1.2. Synteza nanocząstek β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺

W celu otrzymania nanocząstek zastosowano zmodyfikowaną metodę współstrącania z roztworu homogenicznego (ang. *homogeneous coprecipitation method*) [87,181], w której reakcja chemiczna przebiegała w warunkach ściśle bezwodnych i beztlenowych. Nanocząstki były przygotowane bezpośrednio z prekursorów. W tym celu, zgodnie ze schematem przedstawionym na **Rycinie 7** wykorzystano trzy prekursory jonów metali, które stanowiły sole trifluorooctanowe itru, iterbu i erbu.

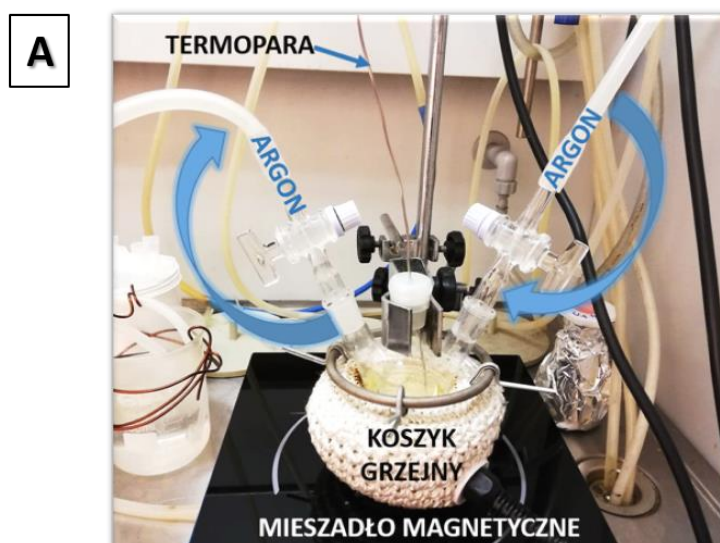
Metoda syntezy nanocząstek β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ była modyfikowana na potrzeby prowadzonych badań, ze względu na konieczność uzyskania określonych parametrów fizyko-chemicznych.

Na wstępie syntetyzowano prekursory rozpuszczając 4 mmol każdego z tlenków Y₂O₃, Yb₂O₃ oraz Er₂O₃ w wodnym roztworze kwasu trifluorooctowego (TFA) (10 ml H₂O oraz 10 ml TFA). Roztwór tlenku mieszano pod wyciągiem w temperaturze wrzenia, do momentu

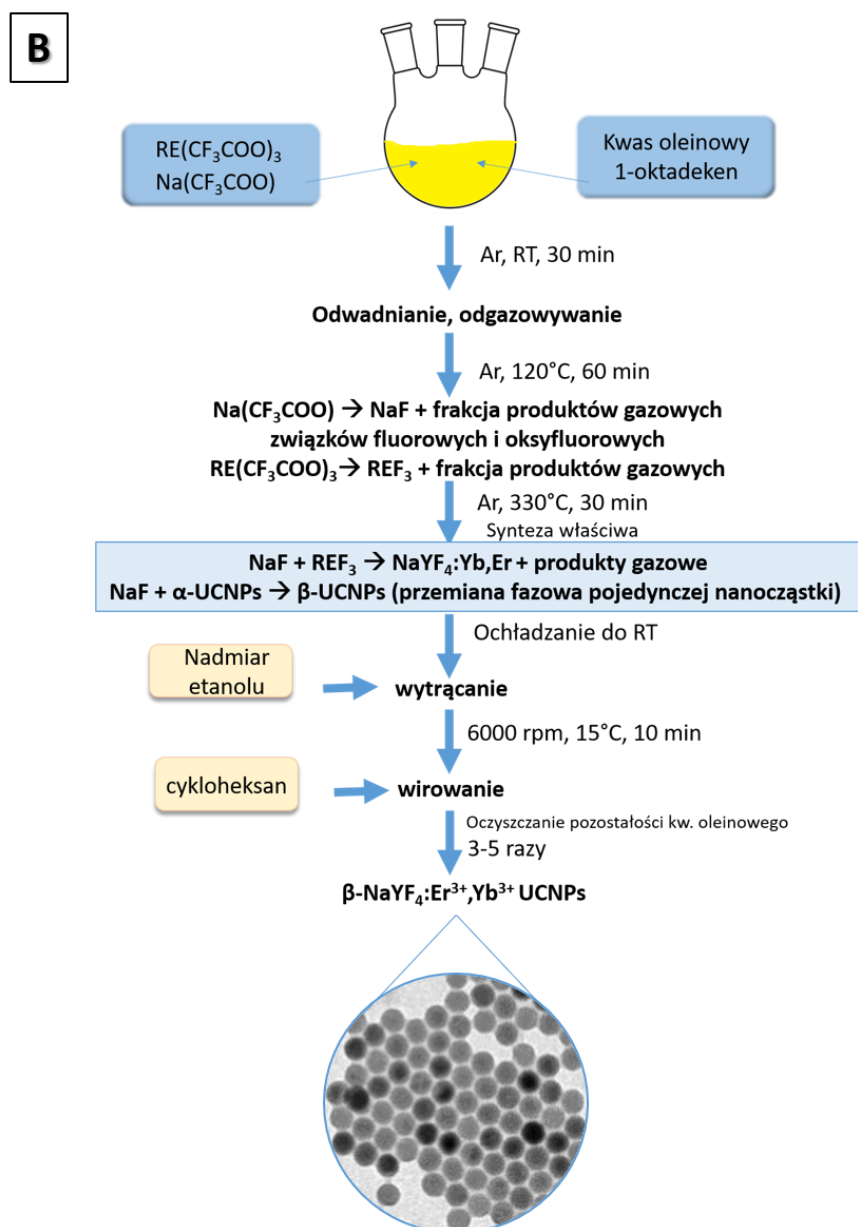
uzyskania transparentnego roztworu prekursorów. Następnie gorący roztwór filtrowano przez bibułę w celu usunięcia nieprzereagowanych materiałów tlenkowych. Roztwór pozostawiono ponownie w temperaturze wrzenia w celu odparowania wody. Powstały osad przenoszono do suszarki laboratoryjnej i suszono w atmosferze powietrza i temperaturze 120°C przez 12 godzin do otrzymania suchego proszku $\text{Ln}(\text{CF}_3\text{COO})_3$ ($\text{Ln}=\text{Y}$, Yb lub Er).

W kolejnym etapie do kolby trójszyjnej (o objętości 50 ml) odważono zsyntetyzowane fluorooctany ziem rzadkich: 0,78 mmol (0,33 g) $\text{Y}(\text{CF}_3\text{COO})_3$, 0,20 mmol (0,10 g) $\text{Yb}(\text{CF}_3\text{COO})_3$ i 0,02 mmol (0,01 g) $\text{Er}(\text{CF}_3\text{COO})_3$ oraz 2,5 mmol (0,34 g) NaCF_3COO . Następnie do mieszaniny fluorooctanów ziem rzadkich dodawano 20 mmol (6,35 ml) kwasu oleinowego (OA) oraz 20 mmol (6,39 ml) 1-oktadekenu (ODE). Tak przygotowaną mieszaninę odgazowywano za pomocą gazu obojętnego (argon) przy przepływie 0,5 l/min w temperaturze pokojowej przez 30 min. Dalej stopniowo podnoszono temperaturę do 120 °C i ogrzewano przez 60 min w celu usunięcia wody z roztworu. Po odgazowaniu próbki, temperaturę reakcji podnoszono do 330°C i główny etap syntezy przebiegał w tych warunkach przez 30 min w celu uzyskania nanokryształów. Po tym czasie uzyskany roztwór chłodzono do temperatury pokojowej z użyciem mieszadła magnetycznego. Nanokryształy wytrącano z wystudzonego roztworu nadmiarem etanolu, a następnie próbkę wirowano w 6000 rpm przez 10 min w 15°C. Po wirowaniu supernatant usuwano, a osadzony na dnie próbówki materiał zawierający nowo zsyntetyzowane nanocząstki rozpuszczano w cykloheksanie (5ml) poprzez sonikowanie i wytrącano etanolem (25ml). Procedurę powtarzano od 3 do 5 razy. Finalną próbkę nanocząstek odwirowywano stosując takie same parametry, zawieszano w 5 ml cykloheksanu i przechowywano w temperaturze pokojowej.

Wszystkie odczynniki użyte do syntezy UCNPs zamieszczono w *Załączniku nr 1, Tabela 11*.



Rycina 7.



Rycina 7. Układ przygotowany do chemicznej syntezy nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+}, 2\%\text{Er}^{3+}$ metodą współstrącania z roztworu jednorodnego. Mieszanka reakcyjna zawierająca prekursor soli trifluoroocentanowych itru, iterbu i erbu była stopniowo odgazowywana i podgrzewana do 330°C w koszyku grzejnym na mieszadło magnetyczne pod wyciągiem, pod stałym przepływem argonu (A). Schemat syntezy chemicznej nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+}, 2\%\text{Er}^{3+}$ metodą współstrącania z roztworu jednorodnego (B). Oznaczenia: Ar – argon, OA – kwas oleinowy, ODE – oktadeken, RT – temperatura pokojowa.

3.1.3. Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+}, 2\%\text{Er}^{3+}$

Uzyskane nanocząstki $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+}, 2\%\text{Er}^{3+}$ scharakteryzowano pod względem ich morfologii i struktury przy pomocy technik skaningowej oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Skład pierwiastkowy analizowano opierając się na mikroanalizie rentgenowskiej i spektroskopii emisyjnej ze wzbudzeniem plazmowym. Charakterystykę luminescencyjną wykonano dokonując pomiaru widm emisji po pobudzeniu światłem podczerwonym o długości fali 980 nm.

3.1.3.1. Transmisyjna mikroskopia elektronowa

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *Transmission Electron Microscopy*, TEM) jest niezwykle cenną techniką nie tylko stosowaną do dokładnej charakterystyki fizykochemicznej nowo zsyntetyzowanych nanomateriałów, ale przede wszystkim do badania ich wpływu na układy biologiczne. Dostarcza fundamentalnych i niezbędnych informacji na temat zmian zachodzących na poziomie sub-komórkowym, zdolności nanocząstek do przechodzenia przez błony cytoplazmatyczne oraz umożliwia obserwację ich zachowania wewnątrz komórek [182]. TEM umożliwia analizę morfologii nanocząstek (kształt i wielkość), a także analizę struktury powierzchni i budowy materiału biologicznego.

Do oceny morfologii zsyntetyzowanych nanocząstek β -NaYF₄:20% Yb³⁺,2%Er³⁺ wykorzystano TEM JEM-1011 (JEOL, Japonia). Napięcie robocze mikroskopu wynosiło 80 kV. Próbkę przygotowano poprzez nakropienie 1 μ l roztworu nanocząstek w cykloheksanie na miedzianą siatkę pokrytą błoną formwarową (Agar Scientific) i suszono w atmosferze powietrza w temperaturze pokojowej poprzez odparowanie rozpuszczalnika.

3.1.3.2. Skaningowa mikroskopia elektronowa

Skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM) jest techniką mikroskopii elektronowej umożliwiającą obserwację topografii analizowanej próbki w skali nanometrycznej. SEM polega na skanowaniu powierzchni preparatu wiązką elektronów formowaną przez układ elektro-optyczny mikroskopu. Wiązka elektronów nie przechodzi przez próbkę, a odbite od jej powierzchni elektrony wtórne lub wstecznie rozproszone tworzą obraz. Układ SEM umożliwia obserwację struktury materiałów przy powiększeniu obrazu w zakresie od 10 do 300 000 razy [183].

Rozkład wielkości i morfologia powierzchni nanocząstek β -NaYF₄:20% Yb³⁺,2%Er³⁺, były analizowane za pomocą SEM wyposażonego w katodę z emisją polową (ang. *field emission scanning electron microscopy*, FE-SEM) Auriga Neon 40 Microscope (Carl Zeiss, Niemcy) przy napięciu przyspieszającym regulowanym w zakresie od 1 kV do 5 kV dla trybu obrazowania. W przypadku obrazowania SEM próbki przygotowano przez naniesienie 3 μ l roztworu nanocząstek w cykloheksanie na powierzchnię płytki krzemowej o wymiarach 0,5 x 0,5 cm² przyklejonej przy pomocy pasty srebrowej (PIK Instruments, MicroShop, Polska, nr kat. 15-002141) do stolika aluminiowego (PIK Instruments, Polska, nr kat. AGG301) i wysuszonej na powietrzu w temperaturze pokojowej.

Pomiary SEM przeprowadzono w Środowiskowym Laboratorium Fizyki i Wzrostu Kryształów Niskowymiarowych Instytutu Fizyki PAN.

3.1.3.3. Spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego

Spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (ang. *Energy Dispersive X-ray Spectrometry*, EDS lub *Energy Dispersive X-ray Analysis*, EDX) to technika wykorzystująca pomiar promieniowania rentgenowskiego. Układ EDS pozwala na przeprowadzenie mikroanalizy chemicznej, zarówno jakościowej (identyfikacja pierwiastków występujących w próbce nanocząstek) jak i ilościowej (procentowa zawartość zidentyfikowanych pierwiastków w analizowanym obszarze). Analiza odbywa się w oparciu o widmo charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego, emitowane przez próbkę bombardowaną wiązką elektronów. Wytworzona w mikroskopie wiązka elektronów o wysokiej energii wybija elektrony z wewnętrznej powłoki (K, L, M) atomów analizowanej próbki, a powstałe wolne miejsca po wybitych elektronach są zajmowane przez elektrony z powłoki o wyższej energii. Różnica energii elektronów pomiędzy tymi dwoma poziomami energetycznymi odpowiada za powstawanie charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego. Analizę składu chemicznego EDS można przeprowadzić dla wszystkich pierwiastków o liczbie atomowej Z większej od liczby atomowej boru ($Z=5$) [184].

Emitowane przez próbkę promieniowanie X rejestrowane jest w detektorze EDS, a następnie przetwarzane w postaci wykresu widma będącego zależnością liczby zliczeń (oś Y - Intensywność) w funkcji energii promieniowania (oś X - Energia). Wartość promieniowania jest charakterystyczna dla każdego pierwiastka, co pozwala na ich bezpośrednią i dokładną identyfikację w analizowanej próbce (analiza jakościowa), a intensywność zapisywana na wykresie w postaci pików o różnej wysokości pozwala na ich analizę ilościową. Zastosowany układ umożliwił analizę pierwiastków w punkcie (dla nanocząstek w komórkach) lub w punktach (dla samych nanocząstek), w dowolnie wybranym obszarze (lub komórce).

Próbkę przygotowano poprzez nakropienie roztworu nanocząstek zawieszonych w cykloheksanie na niklową siatkę pokrytą formwarem i wysuszenie na powietrzu w temperaturze pokojowej. Układ EDS wykorzystany do analizy składu chemicznego nanocząstek został przedstawiony w *Załączniku nr 2*.

Mapy rozkładu pierwiastków chemicznych wchodzących w skład nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ oraz $\beta\text{-NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+} @ \text{SiO}_2$ przeprowadzono metodą EDS przy pomocy TEM TALOS F200X (FEI, Stany Zjednoczone) z katodą o emisji polowej X-FEG, wyposażonego w czterodetektorowy bez okienkowy system Super X EDS i energii wiązki elektronowej 200 keV. Pomiarzy zostały wykonane w trybie TEM oraz STEM (ang. *Scanning Transmission Electron Microscopy*) z wykorzystaniem pierścieniowego detektora

ciemnego pola HAADF (ang. *High Angle Annular Dark Field*). Próbkę przygotowano poprzez nakropienie roztworu nanocząstek w cykloheksanie na miedzianą siatkę pokrytą filmem węglowym i wysuszenie na powietrzu w temperaturze pokojowej.

Pomiary EDS przy pomocy TEM TALOS F200X przeprowadzono w Laboratorium Mikroskopii i Spektroskopii Elektronowej, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego.

3.1.3.4. Spektroskopia fotoluminescencyjna

Spektroskopia fotoluminescencyjna (ang. *photoluminescence*, PL) jest narzędziem do optycznej charakteryzacji struktury elektronowej materiałów [185]. Metoda polega na pomiarze promieniowania elektromagnetycznego wyemitowanego przez badaną próbkę. W przypadku nanomateriałów konwertujących energię w górę, analiza ma na celu określenie parametrów luminescencyjnych, a pomiar ma charakter bezkontaktowy i nieniszczący dla analizowanej próbki [186]. Źródłem wzbudzenia może być laser pracy ciągłej (ang. *continuous wave*, CW), emitujący promieniowanie o stałym natężeniu lub laser impulsowy, który emituje promieniowanie w formie impulsów. Dane z pomiarów fotoluminescencji zapisywane są w postaci widm emisyjnych. Obecność danego ugrupowania pierwiastków w nanocząstce wiąże się z obecnością w widmie podczerwieni charakterystycznych dla niego pasm absorpcyjnych. Każdy jon cechuje specyficzny rozkład pasm na widmach emisji, o charakterystycznej dla niego długości fali, przy której fotoluminescencja jest największa. Pozwala to w prosty sposób na potwierdzenie obecności analizowanych pierwiastków i ich rozróżnienie za pomocą pomiarów spektrofluorymetrycznych.

Pomiary PL przeprowadzono w Środowiskowym Laboratorium Fizyki Biologicznej Instytutu Fizyki PAN. Właściwości luminescencyjne nanocząstek β -NaYF₄:20% Yb³⁺, 2% Er³⁺ zmierzono przy użyciu spektrometru połączonego z monochromatorem SPEX 270 M (Jobin Yvon, Francja) o rozdzielczości 0,1 nm, wyposażonego w kamerę CCD. Próbkę nanocząstek rozpuszczonych w cykloheksanie o stężeniu 30 mg/ml pobrano do 3 ml kuwety kwarcowej i pobudzano ją laserem diodowym IR (model LU0980D300-DNA014, Lumics, Niemcy) o długości fali 980 nm (praca ciągła). Widma PL konwersji energii w górę nanocząstek mierzono w zakresie widzialnym od 500 nm do 700 nm w temperaturze pokojowej. Do pobudzenia nanocząstek wykorzystano sześć gęstości mocy lasera 980 nm: 1,3 W/cm², 3,5 W/cm², 6,3 W/cm², 9,0 W/cm², 11,9 W/cm² oraz 15,0 W/cm².

3.1.3.5. Pomiar potencjału zeta

Potencjał zeta (ang. *Zeta Potential*, ZP) jest wielkością fizyczną oznaczaną grecką literą ζ , a jego wartość wyrażana jest w miliwoltach [mV]. ZP jest ważnym parametrem fizykochemicznym, który określa ładunek powierzchniowy ciał stałych zdyspergowanych w różnych roztworach (polarne, niepolarne) oraz świadczy o stabilności tych układów. Potencjał zeta definiowany jest jako potencjał elektryczny wytwarzany pomiędzy ciałem stałym (cząstkami zdyspergowanymi) a otaczającym go roztworem (cieczą dyspergującą), na tzw. płaszczyźnie poślizgu, którą stanowi granica podwójnej warstwy elektrycznej cząstki z otaczającym ją roztworem [187,188]. Stabilność układów koloidalnych (nanocząstek) związana jest z wartością ZP, im wartość ta jest wyższa tym nanocząstki uważane są za bardziej stabilne. Koloidy (nanocząstki) o wysokim potencjale zeta (ujemnym lub dodatnim) są stabilizowane elektrycznie, podczas gdy roztwory nanocząstek o niskim potencjale zeta posiadają naturalną tendencję do koagulacji lub flokulacji, co skutkuje ich niestabilnością fizyczną. Stabilność nanocząstek w roztworze zależy od sił przyciągających (van der Waalsa) i sił odpychających (elektrostatycznych). Gdy potencjał zeta nanocząstek jest wysoki, to siły odpychające przewyższają siły przyciągania, co powoduje, że nanocząstki odpychają się wzajemnie od siebie, zapobiegając tworzeniu agregatów, a w konsekwencji aglomeracji nanocząstek. Uważa się, że jeśli wartość bezwzględna potencjału zeta jest większa niż ± 30 mV (ZP wyższy od +30 mV lub niższy od -30 mV), badane nanocząstki można uznać za stabilne fizykochemicznie w roztworze koloidalnym [189-191].

Wartość potencjału zeta dostarcza cennych informacji o chemii powierzchni analizowanych materiałów, co pozwala określić ich przydatność w późniejszych zastosowaniach przemysłowych, bioinżynierii, biotechnologii czy medycynie. Znajomość parametrów takich jak, wielkość i kształt nanocząstek oraz ładunek powierzchniowy i chemia ich powierzchni jest niezwykle istotne przy projektowaniu nanomateriałów, o konkretnym przeznaczeniu. W badaniach nad mechanizmami pobierania nanocząstek, potencjał zeta jest nie tylko istotny dla określenia stabilności nanocząstek w roztworze, ale także jest głównym czynnikiem wpływającym na adsorpcję nanocząstek do błony komórkowej w początkowej fazie [188]. Po związaniu się z receptorami powierzchniowymi błony komórkowej, szybkość internalizacji zależy już tylko od wielkości nanocząstek. Potencjał zeta i rozmiar są zatem bardzo ważnymi czynnikami, które określają toksyczność nanocząstek [192] oraz wpływają na skuteczność nanocząstek projektowanych jako systemy dostarczania leków [188,192,193]. Zważywszy na oddziaływania elektrostatyczne nanomateriałów z negatywnie naładowaną

bloną komórkową, badania wskazują, że najbardziej efektywnie internalizowane są nanocząstki naładowane pozytywnie [138,194,195].

Pomiar potencjału zeta wykonano przy użyciu aparatu Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical, Wielka Brytania) w Instytucie Fizyki PAN. Pomiary zrealizowano w oparciu o technikę elektroforezy i laserowego pomiaru prędkości, na podstawie zjawiska Dopplera (ang. *Laser Doppler Velocimetry*, LDV). Wartość potencjału zeta wyznaczono na podstawie średniej uzyskanej z trzech pomiarów (1 ml roztworu nanocząstek bez żadnego liganda na powierzchni zawieszonych w wodzie, pH 7) wpuszczano do kuwety pomiarowej o wymiarach 10×10×45 mm). Uzyskane dane analizowano z wykorzystaniem oprogramowania ZS Xplorer.

3.1.3.6. Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego

Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (ang. *X-ray diffraction*, XRD) jest jedną z najczęściej stosowanych metod do określania struktury krystalicznej nanomateriałów. XRD jest techniką analityczną, umożliwiającą zarówno jakościową jak i ilościową analizę, której nie można uzyskać przy pomocy innych technik. Metoda ta jest nieniszcząca i wykorzystuje oddziaływanie promieniowania rentgenowskiego z badanym materiałem. Na skutek oddziaływania promieniowania rentgenowskiego z elektronami atomów badanego kryształu powstają obrazy dyfrakcyjne, które następnie tworzą dyfraktogram. Wiązka promieniowania padająca na próbkę jest odbijana pod różnymi kątami θ , tworząc przestrzenny obraz komórek, z których składa się kryształ. Analiza XRD pozwala wyznaczyć wartości parametrów sieci krystalicznej, typ komórki elementarnej, rozmiar oraz orientację badanych nanokryształów. Struktura krystalograficzna jest określana na podstawie dopasowania z wzorcem, pochodzącym z krystalograficznych baz danych.

Pomiary XRD dla nanocząstek β -NaYF₄:20% Yb³⁺,2%Er³⁺ (w formie proszku) przeprowadzono na dyfraktometrze Philips X'Pert ProAlpha1 MPD (Malvern Panalytical, Wielka Brytania) wyposażonym w monochromator, w zakresie kątów 2 θ od 10° do 150° przez 15 godzin. Jako źródło promieniowania rentgenowskiego użyto miedzianej lampy rentgenowskiej ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). Pomiary XRD przeprowadzono w Środowiskowym Laboratorium Badań Rentgenowskich i Elektronomikroskopowych Instytutu Fizyki PAN.

3.1.4. Metody modyfikacji powierzchni

3.1.4.1. Usuwanie liganda kwasu oleinowego z nanocząstek

Zastosowana synteza nanostruktur, oparta na metodzie współstrącania homogenicznego w rozpuszczalnikach organicznych, skutkuje obecnością hydrofobowych ligandów kwasu

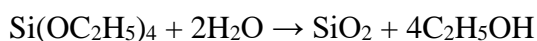
oleinowego na powierzchni uzyskanych nanocząstek. Obecność długich łańcuchów węglowodorowych kwasu oleinowego gwarantuje rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych i zapobiega niepożądaną agregacji nanocząstek w roztworze. Uniemożliwia to jednak wprowadzenie ich w takiej formie do układów biologicznych ze względu na hydrofobowy charakter kwasu oleinowego. W związku z tym, jedną z głównych strategii dotyczących modyfikacji powierzchni nanocząstek jest usunięcie z ich powierzchni liganda organicznego.

Roztwór UCNPs (0,5 ml) w cykloheksanie wytrącano etanolem i odwirowano przez 10 min w 15°C i przy prędkości 6000 rpm. Frakcję nanocząstek zawieszono w 0,1 M roztworze HCl poprzez sonikowanie (60-120 min). Następnie nanocząstki odwirowano i rozpuszczono w etanolu o pH 4 również sonikując. Kolejno, nanocząstki odwirowano i rozpuszczono kilkakrotnie (3-5 razy) w wodzie i etanolu w celu pozbycia się pozostałości HCl. Procedurę powtarzano kilkakrotnie (3-5 razy) dla każdego rozpuszczalnika w celu całkowitego usunięcia resztek kwasu oleinowego. Nanocząstki pozbawione kwasu oleinowego na powierzchni zawieszano w 1 ml sterylnej wody destylowanej i określano stężenie próbki. Stężenie nanocząstek było oznaczane w oparciu o suchą masę fluorków.

3.1.4.2. Pokrywanie nanocząstek β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ warstwą SiO₂

Pokrywanie powierzchni nanocząstek warstwą dwutlenku krzemu (krzemionka, SiO₂) jest uniwersalnym sposobem funkcjonalizacji powierzchni nanocząstek nieorganicznych. SiO₂ jest materiałem nietoksycznym, biokompatybilnym, obojętnym chemicznie, stabilnym termicznie i optycznie przezroczystym dla światła widzialnego. Zaletą modyfikacji powierzchni krzemionką jest również fakt, że może być stosowana zarówno dla hydrofilowych jak i hydrofobowych materiałów. W przypadku tych ostatnich oznacza to, że dzięki modyfikacji nanocząstki są chemicznie stabilne i dobrze dyspergowane w roztworach wodnych. Stosowanie powłok zapobiega również agregacji nanocząstek [121,196-199].

Pokrywanie nanocząstek β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ warstwą krzemionki przeprowadzono w oparciu o zmodyfikowaną metodę Stöbera, polegającą na hydrolizie, a następnie kondensacji tetraetylokrzemianu (tetraetoksyilanu, TEOS), który pełni funkcję organicznego prekursora dwutlenku krzemu (krzemionki). Reakcja przebiegała w obecności amoniaku będącego homogenicznym katalizatorem reakcji, zgodnie z równaniem:



W tym celu, roztwór nanocząstek w cykloheksanie mieszano z surfaktantem IGEPAL CO-520, który powoduje obniżenie napięcia powierzchniowego. Mieszanina nanocząstek z surfaktantem była sonikowana przez 10 min. Następnie wkraplano roztwór amoniaku w wodzie (30% NH₄OH, pH 9) i mieszano przez 30 min na mieszadle magnetycznym. W kolejnym etapie dodano TEOS i roztwór mieszano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym. Po tym czasie, pozostałości mieszaniny użytej do pokrycia nanocząstek usuwano poprzez kilkukrotne wirowanie (3-5 razy) w mieszaninie etanol: woda (1:1) przez 15 min w 15°C i przy prędkości 9000 rpm. Po tym etapie morfologia nanocząstek była oceniana przy użyciu SEM. Po otrzymaniu nanocząstek pokrytych warstwą dwutlenku krzemu (β -NaYF₄:20% Yb³⁺, 2% Er³⁺@SiO₂) określano ich stężenie i zawieszano w 5 ml sterylnej wody destylowanej.

3.2. Materiały i metody stosowane w badaniach biologicznych

3.2.1. Linie komórkowe

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem dwóch komercyjnie dostępnych ludzkich linii komórkowych pochodzących z kolekcji ATCC® (American Type Culture Collection). Materiał do badań stanowiła linia komórek prawidłowych HEK293 (ATCC® CRL-1573™) oraz nowotworowa linia komórkowa HeLa (ATCC® CCL-2™).

Linia HEK293 (ang. *Human Embryonic Kidney*) pochodząca z embrionalnych ludzkich komórek nerki jest stabilną i jedną z najczęściej wykorzystywanych do celów badawczych linią komórkową, która pod względem powszechności i częstości stosowania ustępuje pierwszeństwa tylko komórkom HeLa [200].

Komórki HeLa to ludzka linia komórek nabłonkowych wyprowadzonych z raka szyjki macicy. Charakteryzują się niezwykle szybkim tempem wzrostu i mogą być pasażowane nieskończoną ilość razy. W związku z tym komórki HeLa uważane są za nieśmiertelne [201]. Z powodzeniem komórki te znalazły zastosowanie w badaniach nad toksycznością różnych związków, kosmetyków czy leków, a także nanomateriałów. Pierwszy eksperyment z udziałem komórek HeLa i nanocząstek krzemionkowych został opisany w 2005 roku przez *Xing i wsp.* [202].

Zastosowane do badań linie komórkowe są typami komórek adherentnych, rosnących w monowarstwie. Hodowle komórkowe prowadzone były w standardowych warunkach (*podrozdział 3.4.2.*). Wybór komórek podyktowany był potrzebą przetestowania nanocząstek na dobrze opisanych, wzorcowych modelach doświadczalnych *in vitro*. Nie wszystkie badania

realizowane w ramach pracy, prowadzone były jednocześnie na obu liniach komórkowych. Wynikało to z szerokiego spektrum przeprowadzonych analiz.

3.2.2. Hodowle komórkowe

Hodowle komórkowe prowadzono w warunkach pełnej jałowości środowiska pod komorą laminarną HERAsafe (Heraeus, Niemcy) o pionowym przepływie powietrza (II klasa bezpieczeństwa Biohazard) oraz z użyciem sterylnego sprzętu i jednorazowych naczyń hodowlanych. Komórki hodowano w kompletnej pożywce hodowlanej DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) z dodatkiem 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydlęcej (ang. *fetal bovine serum*, FBS) i bez dodatku antybiotyków.

Hodowlę utrzymywano w warunkach standardowych w inkubatorze w 37°C i atmosferze zawierającej 5% CO₂ i 95% wilgotności. W celu utrzymania stałego poziomu proliferacji komórki były regularnie pasażowane w odstępach 3-4 dniowych do nowych naczyń hodowlanych po osiągnięciu 80-90% konfluentnego wzrostu. W skrócie: monowarstwę komórek przemywano buforem PBS i odklejano przy pomocy 0,25% roztworu trypsyny z EDTA przez 3 do 5 min w 37°C i przenoszono do nowych szalek hodowlanych o powierzchni 10 cm². Proces trypsynizacji oraz ocenę żywotności komórek kontrolowano pod odwróconym mikroskopem DMI3000 B (Leica, Niemcy).

3.2.3. Przygotowanie i podanie nanocząstek β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ do komórek

Bezpośrednio przed użyciem, nanocząstki (UCNPs) sonikowano w wodzie umieszczając w łaźni ultradźwiękowej (Ultrasonic cleaner Sonic-3, 230 V, Polsonic, Polska, nr kat. 146618) przez 20 minut, aby zapobiec ich agregacji. Następnie nanocząstki zawieszano w pożywce hodowlanej, rozcieńczając do odpowiednich stężeń i ponownie sonikowano przez 10 minut. Tak przygotowany roztwór UCNPs w pożywce hodowlanej podawano do hodowli komórkowych, z zachowaniem zasady: określone stężenie nanocząstek zawsze przypadało na każde wysiane 1×10^5 komórek.

W zależności od przeprowadzanej analizy, komórki wysiewano na szalki o średnicy 35 mm i 10 cm bądź na 6- lub 96-dołkowe płytki hodowlane. Hodowlę komórek za każdym razem zakładano 24 godziny przed planowanym eksperymentem, w celu umożliwienia komórkom adhezji do dna naczynia hodowlanego. Po tym czasie pożywkę hodowlaną odciągano, komórki przemywano buforem PBS i podawano nową pożywkę zawierającą odpowiednie stężenie nanocząstek. Do eksperymentów używano komórek z pasażu od 4 do 10.

Liczbę wysianych komórek oraz rodzaj stosowanych naczyń hodowlanych w poszczególnych eksperymentach zestawiono w *Tabeli 4*.

Tabela 4. Liczba komórek użytych w poszczególnych eksperymentach.

Typ eksperymentu	Typ naczynia hodowlanego	Liczba komórek
Transmisyjna Mikroskopia Elektronowa (2, 24 lub 48 h inkubacji*)	Szalka o średnicy 10 cm	1×10^6 komórek/szalkę
Mikroskop konfokalny (2 lub 24 h inkubacji*)	Szalka o średnicy 35 mm	1×10^5 komórek/szalkę
Testy cytotoksyczności (krótkie czasy inkubacji - 1 i 2 h*)	96-dołkowe płytki	1×10^4 komórek/dołek
Testy cytotoksyczności (długie czasy inkubacji - 24 i 48 h*)	96-dołkowe płytki	5×10^3 komórek/dołek
Pomiary stresu oksydacyjnego (2 h inkubacji*)	96-dołkowe płytki (czarne z przezroczystym dnem)	1×10^4 komórek/dołek
Pomiary stresu oksydacyjnego (24 h inkubacji*)	96-dołkowe płytki (czarne z przezroczystym dnem)	$7,5 \times 10^3$ komórek/dołek
ICP-MS (2 h inkubacji*)	6-dołkowe szalki o średnicy 35 mm	1×10^5 komórek/szalkę

*- czas inkubacji komórek z nanocząstkami wyrażony w godzinach

3.2.4. Spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego

W celu potwierdzenia składu pierwiastków w nanocząstkach, a także obecności nanocząstek we wnętrzu komórek, została wykonana analiza metodą EDS. Procedura została opracowana na potrzeby prowadzonych badań. Materiał przygotowano dokładnie w taki sam sposób jak dla oceny w TEM (metoda opisana w *podrozdziale 3.4.5.*), z pominięciem etapu kontrastowania 1% OsO₄ oraz barwienia 0,5% octanem uranylu. Przygotowany materiał krojono na skrawki o grubości 100-120 nm.

Ultracienkie skrawki umieszczane były na niklowych siatkach i analizowane przy użyciu detektora EDS INCAxSight (Oxford Instruments Analytical, Wielka Brytania) połączonego z mikroskopem JEOL JEM-1011, z oprogramowaniem INCA Energy software.

3.2.5. Transmisyjna Mikroskopia Elektronowa

Ze względu na unikatowość prowadzonych badań klasyczne techniki stosowane w analizach mikroskopowo-elektronowych zostały zmodyfikowane i przystosowane do prowadzonych eksperymentów. Transmisyjna mikroskopia elektronowa uważana jest za tzw. „złoty standard” w ocenie interakcji nanomateriałów z materiałem biologicznym. Badania z użyciem TEM umożliwiły wiele szczegółowych analiz: 1) potwierdzenie obecności nanocząstek w badanych komórkach, 2) określenie dokładnej lokalizacji wewnątrzkomórkowej

nanocząstek, 3) zidentyfikowanie mechanizmów internalizacji, 4) ustalenie optymalnego stężenia nanocząstek, 5) ustalenie optymalnego czasu inkubacji, 6) obserwację zmian ultrastrukturalnych w badanych komórkach wywołanych obecnością UCNPs.

Po inkubacji z nanocząstkami, komórki (1 mln komórek) zostały odklejone za pomocą 0,025% trypsyny (Gibco, Life Technologies), a następnie zwirowane (1200 rpm, 3 min, temp. pokojowa). Pelet komórkowy został utrwalony w 2,5% roztworze glutaraldehydu (GA) i 2% roztworze paraformaldehydu (PFA) w 0,2 M buforze fosforanowym o pH 7,4 w temperaturze 4°C przez 3 godziny. Po utrwaleniu, komórki przepłukano 0,1 M buforem fosforanowym (3 razy). Następnie, materiał dotrwalano w 1% czterotlenku osmu (OsO_4) przez 1 godzinę, przepłukiwano wodą i inkubowano z 0,5% wodnym roztworem octanu uranylu przez 2 godziny. Tak przygotowane komórki zostały odwodnione w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu, od 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% do alkoholu absolutnego (99,8%) (po 5 minut). Kolejnym etapem było przesycenie materiału tlenkiem propylenu i mieszaniną tlenku propylenu z żywicą epoksydową w stosunku 1:1 (przez 1 godzinę). Po inkubacji, materiał zatapiano w żywicy (skład żywicy przedstawiony w *Załączniku nr 1, Tabela 13*), pozostawiając je do następnego dnia w temperaturze pokojowej, a następnie przenoszono do żelatynowych kapsulek i poddawano polimeryzacji w temperaturze 60°C przez 24 godziny w cieplarni laboratoryjnej (Cieplarka C-65, Wamed, Polska). Po polimeryzacji, materiał był krojony przy pomocy noża diamentowego (Diatome, Stany Zjednoczone) na ultracienkie skrawki o grubości około 60 nm na ultramikrotomie MTXL (RMC, Stany Zjednoczone) i umieszczany na miedzianych siatkach. Gotowy materiał był oceniany i sporządzona została dokumentacja fotograficzna przy użyciu TEM JEM-1011 (JEOL, Japonia). Napięcie przyspieszające mikroskopu wynosiło 80 kV.

Specyfikacja uwzględniająca stosowane odczynniki i sprzęt laboratoryjny do analiz TEM została zamieszczona w *Załączniku nr 1, Tabela 12 i Tabela 14*.

Pomiary TEM oraz EDS przeprowadzono w Pracowni Badań Mikroskopowo-Elektronowych IMDiK PAN.

3.2.6. Mikroskopia konfokalna

Kolejną techniką obrazowania użytą do oceny interakcji komórek z nanocząstkami była mikroskopia konfokalna. Komórki zawierające nanocząstki analizowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego LSM 710 NLO (Carl Zeiss, Niemcy) wyposażonego w podczerwony laser femtosekundowy (Coherent, Chameleon), w Środowiskowym Laboratorium Fizyki Biologicznej Instytutu Fizyki PAN. Obserwowano trzy kanały. Pierwszy kanał, z pobudzeniem przy długości fali 980 nm (laser femtosekundowy), był używany do obrazowania UCNPs w

zakresie długości fali 500-730 nm. Drugi kanał, z pobudzeniem przy długości fali 705 nm (laser femtosekundowy) do obrazowania jąder komórkowych, wykrywanie w zakresie długości fali 425-475 nm. Trzeci kanał, z pobudzeniem przy długości fali 488 nm (laser ciągły) i z detekcją w zakresie długości fali 495-572 nm, był używany do obrazowania endosomów wczesnych, endosomów późnych oraz lizosomów (przeciwciała zestawione w **Tabeli 5**).

Tabela 5. Przeciwciała pierwszorzędowe i drugorzędowe użyte w badaniach immunocytochemicznych do oceny interakcji komórek z nanocząstkami.

Przeciwciała pierwszorzędowe (gospodarz)	Rozcieńczenie	Producent, nr kat.
Poliklonalne anty-EEA1 - Early Endosome Marker (królik) <i>wczesne endosomy</i>	1:1000	Abcam, ab2900
Rekombinowane monoklonalne anty-Rab9 [EPR13272] (królik) <i>późne endosomy</i>	1:250	Abcam, ab179815
Poliklonalne anty-LAMP1 - Lysosome Marker (królik) <i>lizosomy</i>	1:1000	Abcam, ab24170
Przeciwciała drugorzędowe	Rozcieńczenie	Producent, nr kat.
Poliklonalne, kozie anty-królicze IgG (H+L) skoniugowane z Alexa Fluor® 488	1:1000	Abcam, ab150077

Komórki wysiewano na szkiełku nakrywkowym (2×2cm²) umieszczonym w 6-dółkowej płytce, o gęstości 1×10⁵ komórek na dółek. Po inkubacji, której czas, a także stężenie i typ nanocząstek, były dostosowane do rodzaju eksperymentu, pożywkę usuwano i komórki przemywano trzykrotnie roztworem PBS. Komórki utrwalano w 3,7% roztworze formaldehydu w PBS przez 20 minut. Następnie komórki przemywano trzykrotnie w PBS. Później, błona komórkowa była permabilizowana przy użyciu 1% roztworu TritonX-100 w 5% FBS/PBS (5% roztwór bydlęcej surowicy płodowej w PBS przez 10 minut). Komórki przemywano trzykrotnie PBS i blokowano przez dodanie 5% roztworu FBS w PBS przez 30 minut. Preparaty przemywano trzykrotnie PBS. Wybrane organelle komórkowe wybarwiono wybranym przeciwciałem pierwszorzędowym. 25 µl przeciwciała w 5% FBS/PBS nakładano na próbkę i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym, inkubowano przez 1 godzinę i po tym czasie usuwano szkiełko. Próbkę przemywano dwukrotnie PBS. Stosując ten sam protokół, nakładano drugorzędowe przeciwciała połączone z AlexaFluor 488. Od tego etapu eksperyment był przeprowadzany w ciemności. Jądra komórkowe znakowano przy użyciu 25 µl Hoechst 33342 (Abcam, Wielka Brytania, nr kat. ab228551) w 5% FBS/PBS w rozcieńczeniu 1:5000 (10 minut). Szkiełko przemywano dwukrotnie PBS i przyklejano

za pomocą ProLong™ Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, Molecular Probes™, Stany Zjednoczone, nr kat. P36930) do szkiełek podstawowych.

3.2.7. Testy cytotoksyczności

Ocenę potencjalnego cytotoksycznego działania badanych nanocząstek β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ względem komórek HeLa i HEK293 przeprowadzono w oparciu o trzy komercyjne testy cytotoksyczności:

- MTT (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone, nr kat. M6494);
- Presto Blue (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone, nr kat. A13261);
- Live/Dead (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone, nr kat. L3224).

Testy cytotoksyczności *in vitro* pozwalają na pomiar różnych zmian zachodzących w komórkach, które odzwierciedlają aktywność cytotoksyczną analizowanych związków. Zmiany te mogą dotyczyć utraty integralności błony komórkowej, aktywności enzymatycznej związanej z metabolizmem komórki lub zdolności do podziałów komórkowych. Pomiar zmian najczęściej jest przeprowadzany z wykorzystaniem technik kolorymetrycznych, fluorymetrycznych lub bioluminescencyjnych.

Ocena cytotoksyczności została przeprowadzona dla hodowli komórkowych poddanych działaniu nanocząstek w zakresie wybranych stężeń i wariantów czasowych, w odniesieniu do kontroli stanowiącej hodowlę nietraktowane nanocząstkami.

W tym celu, komórki wysiewano na 96-dółkowe płytki hodowlane 24 godziny przed planowanym eksperymentem, w gęstości odpowiedniej dla poszczególnych eksperymentów, podanej w **Tabeli 4** (podrozdział 3.4.3.). Po 24-godzinnej hodowli, komórki przemywano buforem PBS, dodawano 200 μ l medium zawierającego wybrane stężenia nanocząstek i inkubowano w inkubatorze przez 2, 24 lub 48 godzin. Po tym czasie medium usuwano, komórki przemywano trzykrotnie buforem PBS i przeprowadzano testy.

3.2.7.1. Test MTT

Test MTT jest kolorymetrycznym testem służącym do ilościowej oceny aktywności metabolicznej komórek. Opiera się na zdolności mitochondrialnego enzymu, dehydrogenazy bursztynianowej, obecnego w żywych komórkach, do przekształcania rozpuszczalnej soli tetrazolowej - bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazoliowy (MTT), w formę zredukowaną, nierozpuszczalnego formazanu, który wytrąca się w postaci ciemno niebieskich kryształów. Po rozpuszczeniu kryształów formazanu w DMSO powstaje fioletowy roztwór,

którego intensywność mierzy się spektrofotometrycznie w zakresie długości fal 492–570 nm. W komórkach martwych lub nieaktywnych metabolicznie, formazan tworzy się w niewielkich ilościach lub nie powstaje w ogóle. Ilość powstałego produktu formazanu przekłada się na intensywność zabarwienia powstałego po reakcji roztworu i jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek.

Do każdego dołka z komórkami dodawano 100 μ l pożywki hodowlanej z dodatkiem 10% MTT (wyjściowe stężenie 5mg/ml) i inkubowano w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂ przez 4 godziny. Następnie roztwór MTT usuwano, a kryształy formazanu rozpuszczano w 100 μ l dimetylosulfotlenku (ang. *dimethyl sulfoxide*, DMSO). Analizę kolorymetryczną wytworzonego formazanu przeprowadzono przy długości fali $\lambda=560$ nm, z użyciem automatycznego czytnika do mikropłytek GLOMAX Discover GM3000 (Promega, Stany Zjednoczone). Procent żywych komórek wyliczano porównując wartość absorbancji komórek inkubowanych z nanocząstkami z wartością absorbancji komórek kontrolnych, nietraktowanych nanocząstkami. Absorbancję komórek kontrolnych przyjmowano za 100%.

3.2.7.2. Test Presto Blue

Test PrestoBlue® jest testem do oceny cytotoksyczności w oparciu o resazurynę, która działa jako wskaźnik żywotności komórek. Resazuryna (C₁₂H₇NO₄), jest niefluorescencyjnym, niebieskim, nietoksycznym i przepuszczalnym dla komórek związkim. Pod wpływem procesów metabolicznych zachodzących w żywych komórkach ulega redukcji do silnie fluorescencyjnej najpierw różowej, a następnie czerwonej rezorufiny. Barwnik umożliwia ciągle monitorowanie hodowli komórkowej i wykazano, że jest efektywnym narzędziem o wysokiej czułości. Pomiar ilości otrzymanego produktu można dokonać spektrofotometrycznie lub fluorymetrycznie. Dane literaturowe wskazują, że testy z użyciem resazuryny są jednymi z najdokładniejszych, przy ocenie żywotności i proliferacji komórek [203,204].

Do każdego dołka dodawano 100 μ l pożywki hodowlanej z dodatkiem 10% odczynnika Presto Blue (PB) (10 μ l odczynnika PB i 90 μ l świeżej pożywki) i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Fluorescencję barwnika PB mierzono przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 520$ nm i emisji w zakresie 580-640 nm, z użyciem automatycznego czytnika do mikropłytek GLOMAX Discover GM3000 (Promega, Stany Zjednoczone).

3.2.7.3. Test Live/Dead

Do oceny żywotności komórek zastosowano protokół podwójnego barwienia z wykorzystaniem komercyjnego zestawu LIVE/DEAD™. Test umożliwia jednoczesne różnicowanie populacji analizowanych komórek na komórki żywe i komórki martwe, w oparciu o różnice w ciągłości ich błon cytoplazmatycznych. Zestaw zawiera dwa markery do oceny żywotności komórek: kalceinę AM (ang. *calcein AM*) barwiącą na zielono komórki żywe oraz homodimer-1 etydyny (ang. *ethidium Homodimer-1*, EthD-1) barwiący na czerwono komórki martwe. Kalceina AM to niefluorescencyjny, acetoksymetylowy ester kalceiny. Posiada ona wysoce lipofilny charakter, dlatego z łatwością może przenikać przez błony biologiczne do wnętrza komórek. W cytoplazmie zdrowych komórek, kalceina AM wykorzystuje aktywność znajdujących się tam esteraz i ulega hydrolizie do hydrofilowej i silnie fluoryzującej na zielono kalceiny. Ponadto, związek ten posiada niską cytotoksyczność, co sprawia, że jest szeroko stosowany w badaniach. Homodimer-1 etydyny nie posiada zdolności do przenikania przez nieuszkodzoną błonę komórkową i wiąże się z DNA martwych komórek, co wskazuje na utratę integralności błony komórkowej. Obydwa odczynniki stosowane jednocześnie do wykrywania żywych i martwych komórek posiadają znikomy wpływ na funkcje zdrowej komórki.

Test przeprowadzono zgodnie ze wskazaniem producenta. Komórki inkubowano z 2 μM (0,05 μl) kalceiny AM oraz 4 μM (0,2 μl) EthD-1 przez 1 godzinę w temperaturze 37°C i bez dostępu światła (w 100 μl mieszaniny na jeden dołek: 0,2 μl EthD-1, 0,05 μl kalceiny AM i 99,75 μl PBS). Kontrole stanowiły żywe komórki nietraktowane nanocząstkami oraz komórki martwe (bez nanocząstek), które zostały uśmiercone przy użyciu 70% metanolu 30 minut przed odczytem. Fluorescencja była odczytywana w przezroczystych płytkach 96-dołkowych (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone) z wykorzystaniem czytnika GLOMAX Discover GM3000 (Promega, Stany Zjednoczone). Odczyty wykonywano przy fali wzbudzenia o długości $\lambda = 475$ nm dla kalceiny AM i $\lambda = 520$ nm dla EthD-1, natomiast emisję mierzono przy długości fal w zakresie 500-530 nm dla kalceiny AM i 580-640 nm dla EthD-1.

3.2.8. Pomiar wybranych markerów stresu oksydacyjnego

Pomiar stężenia wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (RFT, ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS) w komórkach HeLa oraz HeK293 po inkubacji z wybranymi stężeniami UCNPs oznaczano przy pomocy komercyjnego testu Cellular ROS/Superoxide Detection Assay Kit (Abcam, Wielka Brytania, nr kat. ab139476).

Zestaw zawierał dwa reagenty Oxidative Stress Detection Reagent (charakteryzuje się zieloną fluorescencją) do detekcji ROS oraz Superoxide Detection Reagent (charakteryzuje się

pomarańczową fluorescencją) do detekcji nadtlenków. Odczynniki zostały rozpuszczone w 60 μl bezwodnego DMF (ang. *N,N-Dimethylformamide*) w celu przygotowania roztworów o końcowym stężeniu 5 mM. Niefluorescencyjny, przepuszczalny dla komórek barwnik do detekcji ROS (zielona sonda) reaguje bezpośrednio z nadtlenkiem wodoru (H_2O_2), nadtlenoazotynem (ONOO^-), tlenkiem azotu (NO^*), rodnikiem hydroksylowym (HO^*) i rodnikiem nadtlenkowym (ROO^*). Sonda w reakcji z ROS tworzy zielony fluorescencyjny produkt. Barwnik do wykrywania nadtlenków (sonda pomarańczowa) jest również przepuszczalny dla komórek i specyficznie reaguje z anionorodnikiem ponadtlenkowym (O_2^*), dając pomarańczowy produkt fluorescencyjny. Test przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta.

Badane komórki inkubowano 2 lub 24 godziny z wybranymi stężeniami nanocząstek (0,1; 1; 5; 10 i 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ w 200 μl medium hodowlanego w 96-dółkowych płytkach). Po zakończonej inkubacji pożywkę z pozostałością nanocząstek usuwano, komórki przemywano buforem PBS i do każdego dołka z komórkami dodawano po 200 μl świeżej pożywki zawierającej 5 mM (0,08 μl) reagenta do detekcji stresu oksydacyjnego oraz 5 mM (0,08 μl) reagenta do detekcji rodnika nadtlenkowego. Komórki inkubowano w inkubatorze bez dostępu światła w temperaturze 37°C i 5% CO_2 przez 1 godzinę, a następnie przeprowadzano pomiary przy użyciu czytnika do mikropłytek GLOMAX Discover GM3000 (Promega, Stany Zjednoczone). Pomiary odczytu płytek wykonywano przy dwóch długościach fal wzbudzenia i emisji luminescencji dla ROS: $\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}} = 490/525 \text{ nm}$ oraz dla nadtlenków: $\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}} = 550/620 \text{ nm}$.

Kontrolę negatywną i pozytywną stanowiły komórki nietraktowane nanocząstkami. W przypadku kontroli pozytywnej do wyżej wymienionej mieszaniny, zawierającej obydwie sondy dodawano induktor wolnych rodników piocyjaninę (ang. *pyocyanin*) w stężeniu 500 μM (godzinna inkubacja induktora z sondami, następnie odczyt). Natomiast w przypadku negatywnej kontroli stosowano inhibitor wolnych rodników N-acetylo-L-cysteinę (ang. *N-acetyl-L-cysteine*) w stężeniu 500 μM dodawaną na 30 minut przed dodaniem pożywki zawierającej mieszaninę odczynników (30 minut inkubacja z inhibitorem, przemycie PBS, inkubacja 1 godzina z sondami i odczyt).

3.2.9. Inhibicja procesu endocytozy

W celu określenia dróg wnikania nanocząstek do komórek zastosowano wybrane inhibitory procesu endocytozy. Endocytoza jest jednym ze sposobów transportu różnych cząstek ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki eukariotycznej. Wyróżniamy kilka

szlaków endocytarnych i zaliczamy do nich endocytozę zależną od klatryny, endocytozę zależną od kaweoliny, makropinocytozę oraz fagocytozę [143].

W zaplanowanych doświadczeniach wykorzystano następujące chemiczne i fizyczne inhibitory procesu endocytozy komórkowej: chloropromazynę, metylo- β -cyklodekstrynę, amiloryd, cytochalazynę D, azydek sodu, genisteinę, nystatynę, nokodazol, sacharozę, dansylkadawerynę oraz niską temperaturę (4°C). Aby uzyskać odpowiednie stężenia inhibitorów, wyjściowe naważki musiały zostać rozpuszczone w stosownych rozpuszczalnikach (zgodnie z zaleceniami producenta). Ustalone stężenia wyjściowe inhibitorów podawano na każde 1×10^5 komórek. Stosowane stężenia inhibitorów oraz blokowane ścieżki endocytozy zestawiono w **Tabeli 6**. W zależności od przeprowadzanej analizy komórki w odpowiedniej gęstości wysiewano 24 godziny przed planowanym eksperymentem. Następnego dnia, bezpośrednio przed podaniem, przygotowywano odpowiednie stężenia badanych inhibitorów i mieszało je z pożywką hodowlaną. Dotychczasową pożywkę hodowlaną odciągano, komórki przepłukiwano buforem PBS i dodawano świeżą pożywkę zawierającą inhibitory.

Komórki z inhibitorami i nanocząstkami inkubowano w dwóch wariantach:

- 1) 0,5 godziny inkubacji z pożywką z danym inhibitorem, trzykrotne przepłukanie buforem PBS, 2 godziny inkubacji z nanocząstkami (1 $\mu\text{g/ml}$)
- 2) 1 godzina inkubacji z pożywką zawierającą równocześnie dany inhibitor i nanocząstki (1 $\mu\text{g/ml}$)

Po tym czasie komórki przemywano PBS i wizualizowano przy pomocy TEM. Zastosowano taki sam schemat postępowania jak w przypadku komórek bez podania inhibitorów.

Stężenia inhibitorów ustalone były w oparciu o dostępne dane literaturowe dotyczące opisów różnych linii komórkowych [205-207]. Dodatkowo, dla poszczególnych inhibitorów stężenia ustalone były w sposób eksperymentalny. W celu optymalizacji użycia tych związków (osiągnięcie efektywnego zahamowania endocytozy, nie wykazując przy tym działania toksycznego) oraz uniknięcia błędów w późniejszej interpretacji wyników przetestowano ich toksyczność względem komórek na podstawie obserwacji mikroskopowo-elektronowych i pomiarów cytotoxyczności. Obserwacje dotyczyły zmian w morfologii i ilości komórek analizowanych w mikroskopie świetlnym, oceny zmian ultrastrukturalnych w mikroskopii elektronowej oraz pomiarów żywotności komórek przy pomocy testu MTT.

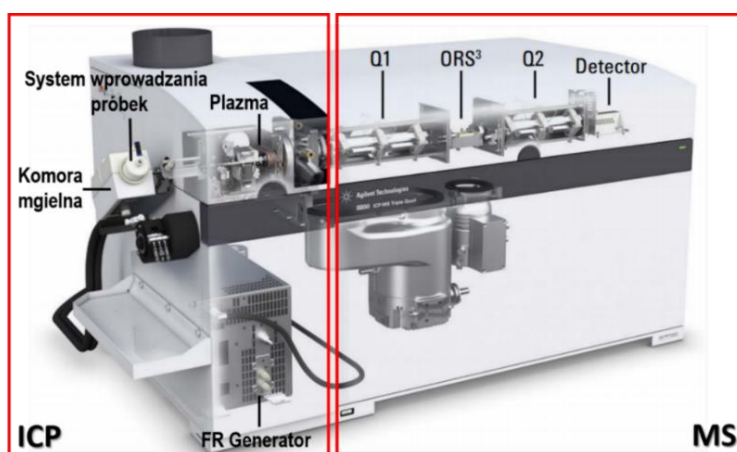
Tabela 6. Inhibitory procesu endocytozy.

Nazwa inhibitora	Blokowana ścieżka endocytozy	Podane stężenie/ 1×10 ⁵ komórek	Producent, Nr kat.
Amiloryd	Makropinocytoza	0,2 mM	Sigma, A7410
Azydek sodu (NaN ₃)	Prawie wszystkie szlaki endocytozy (procesy zależne od energii)	200 mM	Sigma, S2002
Chloropromazyna	Endocytoza zależna od klatryny	28 μM (10 μg/ml)	Sigma, C8138
Cytochalazyna D	Fagocytoza; makropinocytoza	1 μM	Sigma, C2618
Dansylkadaweryna	Endocytoza zależna od klatryny	500 μM	Sigma, D4008
Genisteina	Endocytoza zależna od kaweoli	37 μM (10 μg/ml)	Sigma, G6649
Metylo-β-cyklodekstryna (MβcD)	Endocytoza zależna od kaweoli/ tratwy lipidowe	5 mM	Sigma, C4555
Hipertoniczny roztwór sacharozы	Endocytoza zależna od klatryny Endocytoza zależna od kaweoli	225 mM	Sigma, S0389
Nokodazol	Endocytoza zależna od klatryny; Makropinocytoza	33,2 μM (10 μg/ml)	Sigma, M1404
Nystatyna	Endocytoza zależna od kaweoli (reaguje z cholesterolem)	1,1 mM (10 μg/ml)	Sigma, N6261
4°C	Prawie wszystkie szlaki endocytozy (procesy zależne od energii)	-	-

3.2.10. Spektrometria mas sprzężona z plazmą wzbudzaną indukcyjnie

Spektrometria mas sprzężona z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ang. *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, ICP-MS) jest nowoczesną techniką analityczną, umożliwiającą szybką analizę wielopierwiastkową, która wykorzystuje plazmę jako źródło jonizacji analizowanego materiału oraz spektrometr mas jako analizator wygenerowanych w plazmie jonów (**Rycina 8**). Technika ta charakteryzuje się dużą czułością, selektywnością, a także jej zaletą są bardzo niskie granice wykrywalności pierwiastków. Ponadto, umożliwia oznaczenie całego spektrum pierwiastków w trakcie jednej analizy, w tym samym czasie. Procedura pomiarowa polega na wprowadzeniu próbki cieczy w postaci kropelek aerozolu bezpośrednio do plazmy argonowej (ok. 6000K÷10000K). Najpierw próbka cieczy trafia do rozpylacza próbek (nebulizera; ang. *nebulizer*, wł. *nebula* - mgławica) gdzie następuje wytwarzanie aerozolu (mgła składająca się z drobnych kropelek), który trafia do komory mgielnej (ang. *spray chamber*). Tam następuje oddzielenie większych kropelek i usuwanie ich z układu w celu zapewnienia stabilności plazmy [208]. W plazmie próbka w formie aerozolu jest najpierw atomizowana, następnie jonizowana i kierowana do spektrometru masowego. Po wyjściu ze spektrometru masowego jony są wykrywane w detektorze tzw. powielaczu

elektronów (ang. *electron multiplier*), gdzie uwalniają kaskadę elektronów wytwarzających mierzalny impuls. Intensywność tego impulsu odnosi się bezpośrednio do stężenia danego pierwiastka w analizowanym roztworze (analyzer rozdziela wiązkę jonów według stosunku masy do ładunku elektrycznego). Ze względu na ogromne możliwości zarówno w ilościowej jak i jakościowej analizie pierwiastków, technika znajduje szerokie zastosowanie najczęściej w badaniu próbek środowiskowych i produktów żywnościowych, jak również w dziedzinach takich jak biologia, geologia, kryminalistyka, archeologia, medycyna i farmacja czy radiochemia.



Rycina. 8. Schemat budowy spektrometru mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną. FR Generator – generator prądu o wysokich częstotliwościach, Q1 – pierwszy kwadropol (ang. first quadrupole), ORS³ – oktopol (ang. Octopole Reaction System), Q2 - drugi kwadropol (ang. second quadrupole). Opracowanie własne na podstawie [209].

Badania wykonano w laboratorium Inorganic Analysis, National Measurement Laboratory mieszczącym się w LGC Limited w Teddington, Wielkiej Brytanii w ramach praktyk z programu Erasmus+.

Eksperyment miał na celu szczegółową analizę jakościową oraz ilościową na podstawie składu nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$, która pozwalała na oznaczenie z dużą dokładnością ilości pobranych nanocząstek przez komórki HeLa z pożywki hodowlanej w różnych wariantach eksperymentalnych. Ilość określano jako procent zinternalizowanych nanocząstek po inkubacji z wybranymi inhibitorami endocytozy w stosunku do komórek kontrolnych z podanymi nanocząstkami ($\sim 1 \mu\text{g/ml}$), ale bez zastosowania inhibitorów endocytozy.

Materiał badany stanowiły próbki:

- 1) nanocząstki $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$;
- 2) komórki HeLa po internalizacji nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$;

3) komórki HeLa po internalizacji nanocząstek β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ z użyciem specyficznych inhibitorów procesu endocytozy komórkowej (chloropromazyna, azydek sodu, dansylkadaweryna, amiloryd, sacharoza, metylo- β -cyklodekstryna, niska temperatura; szczegółowa specyfikacja inhibitorów została przedstawiona w **Tabeli 4, podrozdział 3.4.10.**)

Analizę przeprowadzono przy pomocy Agilent 8900 ICP-QQQ-MS (8900 Triple Quadrupole ICP-MS, Agilent Technologies, Stany Zjednoczone) wyposażonego w analizator kwadrułowy oraz komory kolizyjno-reakcyjne. Próbkę wprowadzono do plazmy za pomocą koncentrycznego nebulizatora kwarcowego z mikroprzepływem, pracującego w trybie pompowania ok. 0,1 ml/min oraz komory natryskowej z podwójnym przepływem typu Scotta chłodzonej do 2°C. ICP-MS pracował w trybie bez gazu oraz w trybie MS/MS (tzn. przy użyciu obu kwadrułoli). Ocenę ilościową próbek przeprowadzono metodą zewnętrznej kalibracji przy użyciu wzorców kalibracyjnych (ang. *calibration standards*) pochodzących z akredytowanego źródła. Aby zapewnić wysoką jakość wyników, do kontroli jakości pomiarów użyto również wzorców kalibracyjnych (dla itru), pochodzących z dwóch różnych źródeł (ROMIL oraz VHG). Przygotowanie próbki do analizy ma kluczowe znaczenie w opracowaniu optymalnej strategii pomiarowej. W związku z tym zakres badań obejmował również dobór warunków (optymalizację) mineralizacji próbek.

Schemat doświadczeń:

Schemat przygotowania komórek do eksperymentów nie odbiegał od procedury opisanej w *podrozdziale 3.4.2*. W dniu eksperymentu pożywkę odciągano, komórki przepłukiwano 3-krotnie PBS i inkubowano odpowiednio:

- 1) przez 2 godziny z określonym stężeniem UCNPs (~1, 2 lub 10 μ g/ml – wartość teoretyczna, określona w oparciu o suchą masę fluorków);
- 2) przez 30 minut z wybranymi inhibitorami (ilości inhibitorów podane na 1×10^5 komórek: 1 μ l amilorydu ze stocku o stężeniu końcowym 0,2 mM; 50 μ l azydku sodu o stężeniu 200 mM; 1 μ l chloropromazyny o stężeniu 10 μ g/ml; 50 μ l metylo- β -cyklodekstryny o stężeniu 5 mM; 50 μ l sacharozy o stężeniu 225 mM; 10 μ l dansylkadaweryny o stężeniu 500 μ M), następnie pożywkę z inhibitorem usuwano, komórki przepłukiwano PBS i inkubowano z nanocząstkami β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ (0,5 μ l o stężeniu końcowym ~1 μ g/ml) przez 2 godziny w 37 °C;

- 3) przez 1 godzinę z wybranymi inhibitorami (50 μ l azydku sodu o stężeniu 200 mM; 50 μ l sacharozy o stężeniu 225 mM) i z nanocząstkami β -NaYF₄:20% Yb³⁺,2% Er³⁺ (0,5 μ l o stężeniu końcowym \sim 1 μ g/ml).

Następnie, po zakończonej inkubacji medium komórkowe odciągano, komórki przepłukiwano 3 razy PBS w celu usunięcia niezinternalizowanych nanocząstek i do każdego dołka dodawano 1 ml akutazy (Accutase®, Sigma-Aldrich, nr kat. A6964) i inkubowano w 37°C przez 5 min lub do momentu całkowitego odklejenia się komórek. Po tym czasie pobierano całą zawiesinę komórek (1 ml) i przenoszono do uprzednio zważonego 1,5 ml eppendorfa.

Każdy eksperyment wykonano w 3 powtórzeniach.

Optymalizacja warunków pomiaru i mineralizacji próbek:

Optymalizacja obejmowała dobranie odpowiednich stężeń wzorców kalibracyjnych (testowane stężenia: 0, 50, 100, 200, 300 μ g/kg) oraz wzorców wewnętrznych (wielopierwiastkowy wzorzec: 68 Element Multi Standard 1 w 5% HNO₃, nr kat. VHG-SM68-1-100). Testowane było także optymalne stężenie próbek zawierających komórki z nanocząstkami (objętość wyjściowa 100 μ l) oraz samych nanocząstek (objętość wyjściowa 50 μ l). Analizę uzyskanych mineralizatów prowadzono w trybie z gazem (hel) i bez gazu dla wszystkich izotopów Y, Yb i Er. Poszczególne parametry aparaturowe oraz warunki analityczne pomiaru wyżej wymienionych pierwiastków dobrano tak, aby uzyskać ich maksymalną intensywność, przy minimalnej wartości błędu.

Przygotowanie próbki do mineralizacji (zgodnie z optymalnymi warunkami):

Próbka nanocząstek (100 μ l roztworu nanocząstek w wodzie o stężeniu \sim 1 μ g/ml) lub próbka komórek z nanocząstkami (200 μ l pobrane z 1 ml roztworu komórek po inkubacji z nanocząstkami zawieszonych w akutazie o stężeniu \sim 1 μ g/ml) była odważana z wykorzystaniem wagi analitycznej (Denver Instrument Si-234A, Stany Zjednoczone) do teflonowych naczynek*. Następnie, próbkę zalewano mieszaniną 1,5 ml HNO₃ oraz 1,5 ml H₂O₂ o podwyższonej czystości (v:v, 1:1), szczelnie zamykano i poddawano procesowi rozkładu (mineralizacji) w mineralizatorze mikrofalowym (Microwave Digestion System, ETHOS EZ, Stany Zjednoczone). Proces mineralizacji próbki z wykorzystaniem energii promieniowania mikrofalowego, wspomagany przez wzrastającą temperaturę \sim 190°C i podwyższone ciśnienie, odbywał się przez 20 min, po czym próbki były chłodzone do

temperatury pokojowej przez 40 min. Po przeprowadzonej mineralizacji i wystudzeniu każda z próbek przenoszona była do wcześniej zważonej próbki ilościowo i uzupełniana wodą oczyszczoną (ang. *Milli-Q*) w celu uzyskania pożądanego rozcieńczenia. Próbki ponownie ważono (końcowe stężenie kwasu w próbkach wynosiło 3%, objętość próbki 10 ml).

Tak przygotowane próbki wprowadzane były do urządzenia wraz z przygotowanymi roztworami kalibracyjnymi (ang. *calibration standards*) o stężeniach 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200; 300 oraz 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Y, Yb i Er (Yttrium, Ytterbium, Erbium element reference solution, 1000 ppm, ROMIL Pure Chemistry PrimAg), wzorcami kontroli jakości (ang. *quality control standards*) o stężeniu 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Y, Yb i Er, oraz wzorcami wewnętrznymi (ang. *internal standards*) o stężeniu 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ In, Pt oraz Rh (ROMIL). Oprócz próbek zmierzono również H_2O jako próbę ślepią (ang. *blank*) oraz zmineralizowane komórki, które nie były traktowane inhibitorami ani nanocząstkami jako próbę negatywną.

W celu przeprowadzenia analizy ilościowej, konieczna jest normalizacja sygnału ICP-MS przy użyciu wzorców wewnętrznych zawierających izotopy pierwiastków, których nie ma w próbce i które są wolne od wszelkich interferencji (In, Pt i Rh) oraz wykreślenie krzywej kalibracyjnej przy użyciu roztworów kalibracyjnych zawierających izotopy pierwiastków pomiarowych Y, Yb i Er (zależność sygnału ICP-MS od stężenia danego izotopu w roztworze pomiarowym).

*Wszystkie naczynia laboratoryjne były ważone przed dodaniem i po dodaniu próbki.

3.3. Organotypowe skrawki hipokampa szczura – model *ex vivo*

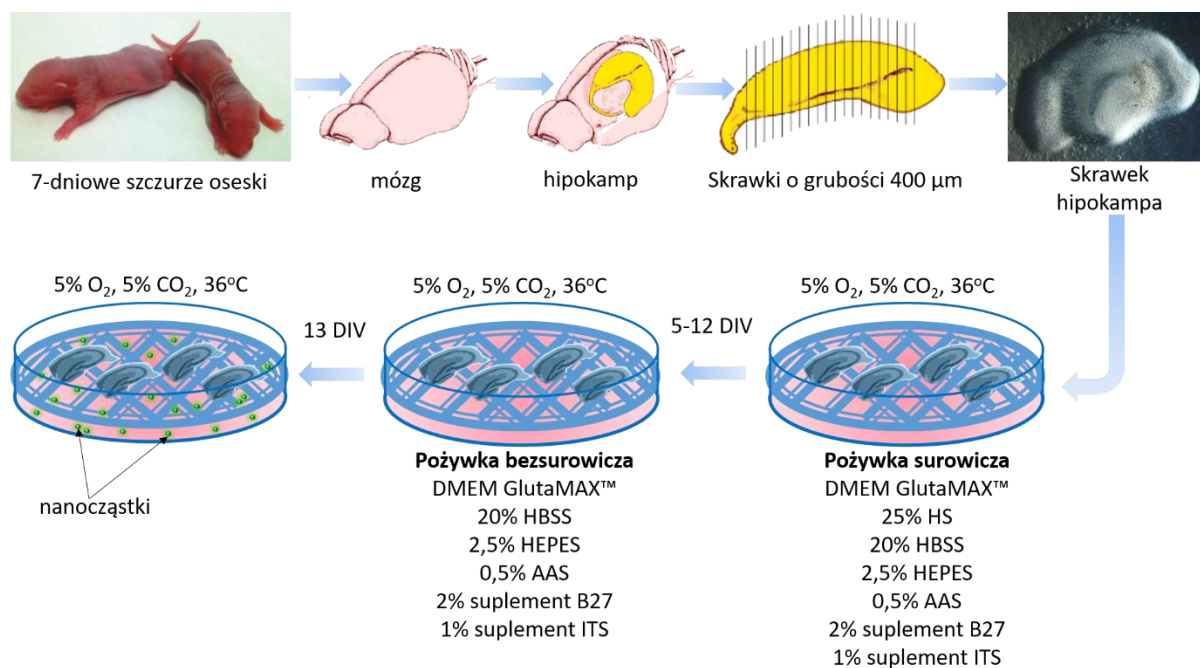
Eksperymenty *ex vivo* przeprowadzone były z wykorzystaniem szczurów szczepu Wistar. Zwierzęta hodowane były w zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Hipokampy wykorzystywane w doświadczeniach pobierane były od 7-dniowych osesków szczurzych. Procedura uśmiercania zwierząt oraz pobrania tkanek (nr zezwolenia 39/2015) do badań przebiegała zgodnie z wytycznymi zawartymi w aneksie IV dyrektywy Parlamentu Europejskiego 2010/63/EU.

3.3.1. Zakładanie i przebieg organotypowej hodowli skrawków hipokampa

Hodowle organotypowe skrawków hipokampa (ang. *Organotypic Hippocampal Slice Cultures*, OHSC) prowadzono w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN.

Hodowle zakładano z hipokampów 7-dniowych osesków szczurzych szczepu Wistar. Hipokampy izolowano według zmodyfikowanej procedury opisanej wcześniej przez *Sypecka*

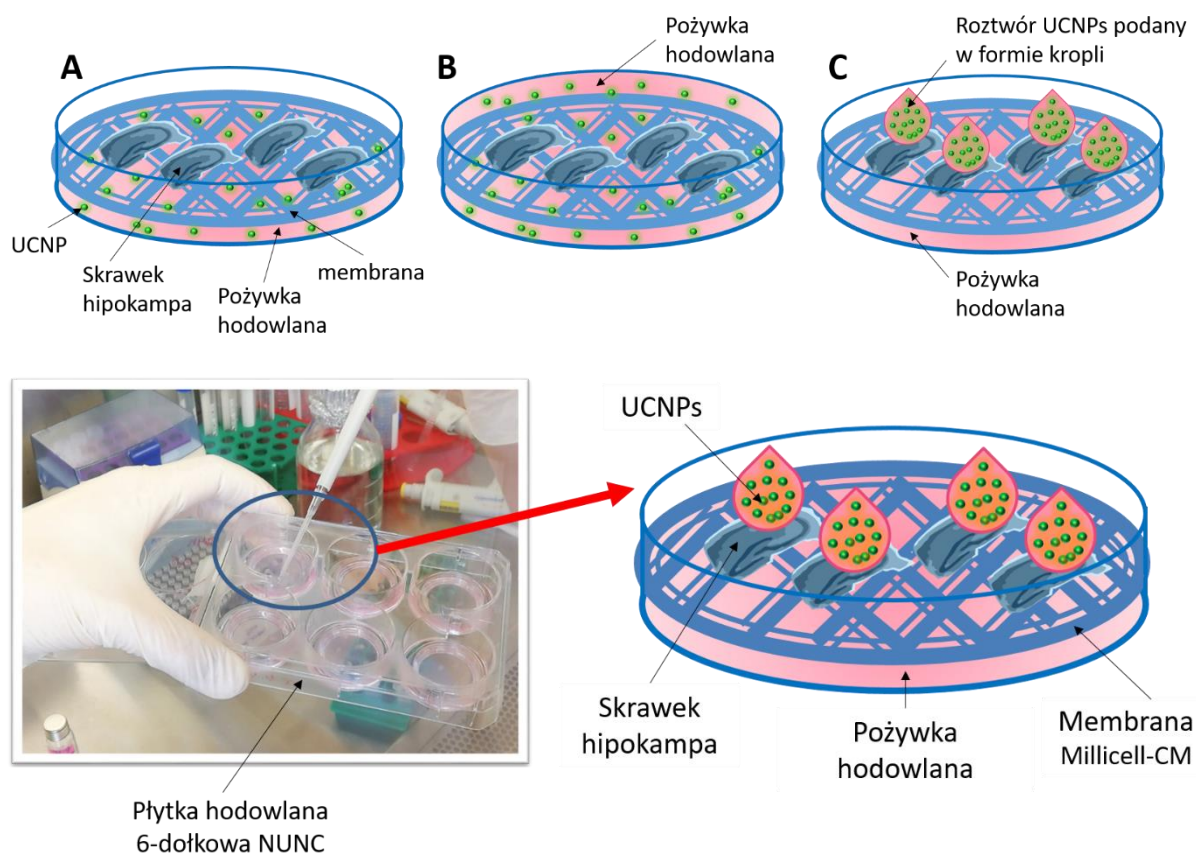
i Sarnowska [210]. Szczurze oseski dekapitowano i izolowano hipokampy, które cięto poprzecznie na skrawki o grubości 400 μm przy użyciu aparatu do cięcia tkanek McIlwain Tissue Chopper (Campden Instruments, Wielka Brytania). Skrawki przeszły wstępną selekcję pod mikroskopem stereoskopowym (Opta-Tech, Polska), następnie do eksperymentów wybierano te z wyraźnie zachowaną strukturą regionów CA1 oraz CA2. Pocięte skrawki umieszczano po cztery na membranie Millicell® Cell Culture Inserts (Merck Millipore, nr kat. PIHA03050) o średnicy porów 0,45 μm , po czym wkładano je do płytek 6-dołkowych (Thermo Scientific Nunc, nr kat. 140675). W każdym dołku znajdowała się pożywka hodowlana DMEM GlutaMAX™ o wysokiej zawartości glukozy, dodatkowo zawierająca: 25% inaktywowaną surowicą końską, 20% HBSS, 2,5% HEPES (1 M), 0,5% roztwór antybiotyków AAS (10000 U/ml penicylina, 10 mg/ml streptomycyna oraz 25 $\mu\text{g/ml}$ amfoterycyna B), 2% suplement B-27 oraz 1% suplement ITS (*Załącznik nr 1, Tabela 15*). Hodowla prowadzona była w warunkach normoksji fizjologicznej tj. w obecności 5% O_2 , 5% CO_2 , w temperaturze 36°C oraz wilgotności na poziomie 90%. Pożywka hodowlana była wymieniana co 2-3 dni. Przez pierwsze 4 dni hodowla prowadzona była w pożywce surowiczej. Natomiast od 5 dnia hodowli, stopniowo z każdą kolejną wymianą pożywki zmniejszano ilość surowicy końskiej o 6,25%, tak aby od 12 dnia hodowla była prowadzona w pożywce bezsurowiczej. Eksperyment podania UCNPs rozpoczynano 13 dnia hodowli (*Rycina 9*).



Rycina 9. Schemat organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura. DIV - dni w hodowli.

3.3.2. Optymalizacja metod podania nanocząstek do hodowli skrawków hipokampa

W celu opracowania efektywnej metody podania UCNPs w modelu organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura przetestowano trzy samodzielnie opracowane systemy (**Rycina 10**). Pierwszym analizowanym wariantem była metoda podania roztworu nanocząstek bezpośrednio do pożywki (nanocząstki powinny być pobierane (zasysane) wraz z pożywką hodowlaną). Następnie podjęto próbę zanurzenia skrawków w pożywce. Skrawki pozostawiono bezpośrednio w pożywce (1ml) przez 2 godziny lub na membranie, dodając dodatkowy 1 ml pożywki tak, aby pozostały one całkowicie zanurzone. W tych warunkach inkubowano je przez 1 godzinę (1ml pożywki pod membraną i 1 ml pożywki nad membraną). W dalszej kolejności nałożono roztwór UCNPs w formie kropli (4 μ l - zoptymalizowana objętość) bezpośrednio na górną powierzchnię każdego skrawka i inkubowano przez 2 lub 24 godziny.



Rycina 10. Organotypowa hodowla *ex vivo* skrawków hipokampa. Schemat przedstawiający trzy analizowane metody podania nanocząstek do hodowli skrawków hipokampa szczura: A) UCNPs znajdują się w 1 ml pożywki hodowlanej pod membraną, na której znajdują się skrawki, B) skrawki umieszczone na membranie są zanurzone w pożywce hodowlanej zawierającej UCNPs, C) roztwór UCNPs w formie kropli jest nałożony na każdy skrawek od góry.

3.3.3. Analiza obecności UCNPs w skrawkach hipokampa z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego

TEM JEM-1011 został wykorzystany w celu detekcji nanocząstek, a także obserwacji zmian ultrastrukturalnych w komórkach hipokampa wywołanych obecnością UCNPs.

W opracowanej na potrzeby eksperymentu metodyce przygotowania preparatu do obserwacji mikroskopowo-elektronowych po 1-, 2- lub 24-godzinnej ekspozycji na UCNPs, skrawki zostały delikatnie przeniesione do eppendorfów zawierających utrwalacz (mieszanina 2,5% GA i 2% PFA w 0,2 M buforze kakodylanowym o pH 7,4) i inkubowane w temperaturze 4° C przez 24 godziny. Po tym czasie preparaty były płukane trzy razy w 0,1 M buforze kakodylanowym oraz dotrwalone w roztworze 1% czterotlenku osmu przez 1 godzinę. Następnie skrawki zostały odwodnione w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu (30%-99,8%). Kolejnym etapem było przesylenie materiału tlenkiem propylenu i mieszaniną tlenku propylenu z żywicą epoksydową w stosunku 1:1 przez 1 godzinę. Materiał zatopiono w bloczkach z żywicy i pozostawiono w temperaturze pokojowej do następnego dnia. Następnie, materiał poddano polimeryzacji w temperaturze 60° C przez 24 godziny. Spolimeryzowany materiał krojono na ultracienkie skrawki (40-60 nm) na ultramikrotomie MTXL (RMC, Stany Zjednoczone) i umieszczano na miedzianych siatkach. Pominięto etap kontrastowania wodnym roztworem octanu uranylu oraz cytrynianem ołowiu, aby wykluczyć obecność strąków innych metali bądź artefaktów. Napięcie przyspieszające mikroskopu podczas obserwacji wynosiło 80 kV.

3.3.4. Analiza immunohistochemiczna organotypowych skrawków hipokampa

W celu potwierdzenia obecności nanocząstek w obrębie komórek hipokampa wykonano oznaczenia immunohistochemiczne. Wykonane preparaty immunohistochemiczne obrazowano przy pomocy mikroskopu konfokalnego 710 NLO (Carl Zeiss, Niemcy) wyposażonego w laser femtosekundowy (Coherent, Chameleon), w Środowiskowym Laboratorium Fizyki Biologicznej Instytutu Fizyki PAN.

Po 24-godzinnej inkubacji z odpowiednim stężeniem nanocząstek, skrawki były przepłukiwane trzykrotnie buforem PBS przez 15 min, w celu usunięcia nadmiaru nanocząstek niezinternalizowanych przez komórki. Następnie skrawki inkubowano w świeżo przygotowanym 4% roztworze paraformaldehydu w PBS przez 40 min. Kolejno preparaty były płukane trzykrotnie w PBS i blokowane w roztworze 10% surowicy koziej w PBS zawierającym 0,1% Triton X-100 (Serva, nr kat. 39795) przez 1 godzinę w temperaturze

pokojoyej. W celu wizualizacji nanocząstek w obrębie różnych komórek tkanki nerwowej, skrawki hipokampa inkubowano z wybranymi przeciwciałami pierwszorzędowymi zestawionymi w **Tabeli 7**. Inkubację dla przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko białku stabilizującemu mikrotubule MAP-2 oraz kwaśnemu białku włóknkowemu GFAP (ang. *Glial Fibrillary Acidic Protein*), rozcieńczonych w 5% surowicy koziej, prowadzono przez całą noc w temperaturze 4°C. W dalszej kolejności preparaty płukano trzykrotnie buforem PBS i tak przygotowane skrawki poddano 1-godzinnej inkubacji z kozim anti-mysim przeciwciałem drugorzędowym z Alexa Fluor 488 rozcieńczonym w 5% surowicy koziej w temperaturze pokojowej. Po inkubacji skrawki ponownie płukano trzykrotnie buforem PBS. Ostatnim etapem było wybarwienie jąder komórkowych 5 µM roztworem barwnika Hoechst 33258 (rozcieńczenie 1:150) w PBS przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty płukano trzykrotnie PBS, umieszczano na szkiełkach podstawowych i zaklejano przy pomocy Fluorescence Mounting Medium (Dako, nr kat. S3023) oraz szkiełka nakrywkowego. Przygotowane preparaty przechowywane były w temperaturze 4°C.

W celu potwierdzenia obecności UCNPs w skrawkach hipokampa obserwowano trzy kanały. Pierwszy kanał był używany do obrazowania nanocząstek, z pobudzeniem przy długości fali 980 nm (laser femtosekundowy) i detekcją w zakresie 500-730 nm. Drugi kanał był przeznaczony do obrazowania jądra komórkowego znakowanego znacznikiem Hoechst 33258 (Abcam, Wielka Brytania), z pobudzeniem przy długości fali 705 nm (laser femtosekundowy) i wykrywaniem w zakresie 425-475 nm. Trzeci kanał był używany do obrazowania neuronów lub astrocytów wyznakowanych przeciwciałem drugorzędowym skoniugowanym z Alexa Fluor 488, z pobudzeniem przy długości fali 488 nm (laser pracy ciągłej) oraz z detekcją w zakresie 495-572 nm.

Tabela 7. Przeciwciała pierwszorzędowe i drugorzędowe użyte w badaniach immunocytochemicznych.

Przeciwciała pierwszorzędowe (gospodarz)	Rozcieńczenie	Producent, nr kat.
Monoklonalne anty-MAP-2 (2a+2b) (mysz) <i>neurony</i>	1:500	Sigma, M1406
Monoklonalne anty-GFAP (mysz) <i>astrocyty</i>	1:200	Dako, M0761
Przeciwciało drugorzędowe	Rozcieńczenie	Producent, nr kat.
Kozie anty-mysie IgG (H+L) skoniugowane z Alexa Fluor® 488	1:1000	Invitrogen, A21121

3.3.5. Analiza przeżycia skrawków hipokampa metodą barwienia jodkiem propidyny

W celu ilościowej oceny potencjalnego działania toksycznego nanocząstek na komórki hipokampa, przeprowadzono przyżyciowe barwienie fluorescencyjnym jodkiem propidyny (PI). PI wiąże się z helisą DNA na zasadzie interkalacji i posiada zdolność do wnikania jedynie przez uszkodzone błony komórkowe. Oznacza to, że PI selektywnie barwi tylko populację komórek martwych (komórek nekrotycznych lub w końcowej fazie apoptozy). Komórki barwiące się PI emitują czerwoną fluorescencję, im wyższy poziom fluorescencji, tym większy odsetek martwych komórek [211]. Wpływ cytotoksycznego działania UCNPs określano poddając skrawki 24-godzinnej inkubacji z 1, 10, 45 i 50 μg UCNPs w formie nałożonej kropli (zawiesinę UCNPs w wodzie nakładano w postaci kropli o objętości 4 μl) bezpośrednio na skrawek lub bezpośrednio do pożywki hodowlanej (objętość pożywki 1 ml). Po 24-godzinnej ekspozycji skrawków na różne stężenia nanocząstek, pożywkę hodowlaną odciągano i do każdego dołka dodawano świeżą pożywkę zawierającą 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ jodku propidyny i inkubowano przez 1 godzinę w 36°C. Fluorescencyjne obrazy skrawków rejestrowano następnie pod mikroskopem odwróconym Axio Vert (Carl Zeiss, Niemcy). Kolorowe obrazy przekształcono w skalę szarości i mierzono średnią fluorescencję z każdego skrawka hipokampa przy użyciu oprogramowania ImageJ.

3.4. Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki wyrażano jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*, SD). Liczbę doświadczeń podano w opisie przyporządkowanym do każdej ryciny. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego California USA) przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a lub z testem Dunnetta'a (dla porównywania więcej niż dwóch grup; przedział ufności 95%, $\alpha = 0,05$). Wyniki były uznawane za istotne statystycznie dla wartości współczynnika $p < 0,05$.

Za istotne statystycznie przyjęto różnice z wartością współczynnika $p < 0,05$ i oznaczono na wykresach symbolem *, różnice z wartością współczynnika $p < 0,01$ oznaczono na wykresach symbolem **, różnice z wartością współczynnika $p < 0,001$ oznaczono na wykresach symbolem *** oraz różnice z wartością współczynnika $p < 0,0001$ oznaczono na wykresach symbolem ****.

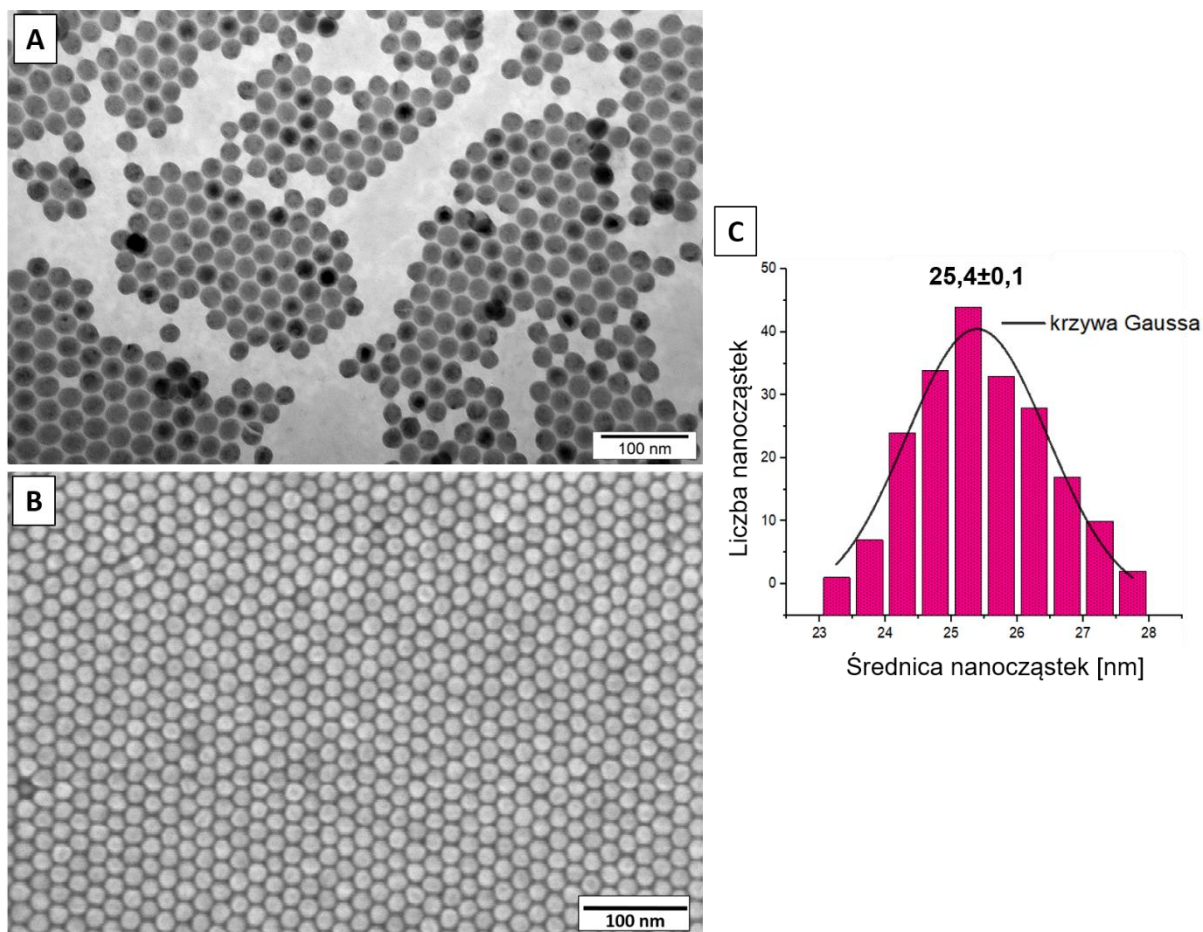
4. Wyniki

4.1. Właściwości morfologiczne i fizykochemiczne uzyskanych nanocząstek β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺

W ramach prowadzonych badań zaprojektowano i zsyntetyzowano samodzielnie nanocząstki NaYF₄ domieszkowane jonami pierwiastków ziem rzadkich Er³⁺ i Yb³⁺. Metoda współstrącania z roztworu jednorodnego, wykorzystana do syntezy badanych nanocząstek, pozwoliła na otrzymanie nanoproduktów o bardzo regularnej i heksagonalnej strukturze krystalograficznej. Zastosowana metoda oparta była o tzw. syntezę *bottom-up*, w której po dodaniu organicznych prekursorów lantanowców oraz poprzez ich rozkład termiczny otrzymywano nanocząstki NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺. Uzyskane nanostruktury składały się z jonów domieszkujących, które są źródłem procesu konwersji energii w górę (Yb³⁺, Er³⁺) oraz z nieorganicznej matrycy na bazie fluorku itrowo-sodowego (NaYF₄). Zachowanie odpowiedniej temperatury i czasu reakcji pozwoliło kontrolować ich rozmiar i kształt. Opracowana synteza była efektywna i powtarzalna, a nanostruktury bazujące na matrycach fluorkowych wykazywały taką samą morfologię i charakteryzowały się niewielkimi rozmiarami, nieprzekraczającymi 30 nm.

Właściwie przeprowadzona metodyka syntezy nanocząstek gwarantowała powtarzalność cech uzyskanych próbek. Wybrany mechanizm syntezy nanocząstek ogranicza jednak ilość otrzymanego materiału (w jednym procesie współstrącania), którego można uzyskać jedynie kilka mg/ml.

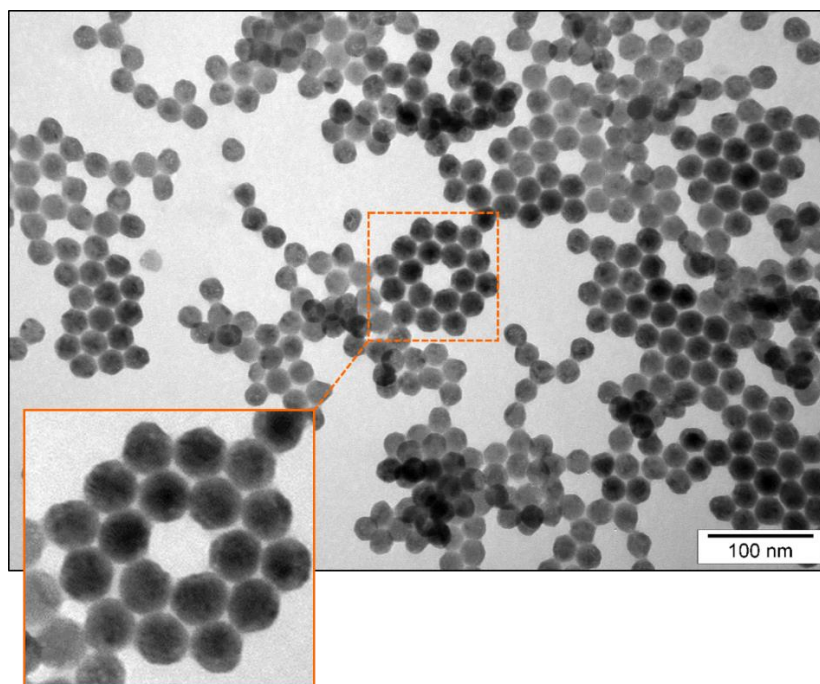
Morfologię uzyskanych nanostruktur β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ oceniano przy pomocy TEM oraz SEM (*Rycina 11*). Przeprowadzone pomiary wykazały, że otrzymane nanocząstki posiadały średnicę rzędu $\sim 25,4 \pm 0,1$ nm, która została oszacowana na podstawie analizy ~ 200 losowo wybranych nanostruktur. Nanocząstki NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ były bardzo jednorodne pod względem kształtu i charakteryzowały się regularną strukturą heksagonalną.



Rycina 11. A) Elektronogram TEM i B) SEM nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$, C) Histogram rozkładu wielkości dla nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ wykonany przy pomocy programu SmartTiffV2 (Carl Zeiss).

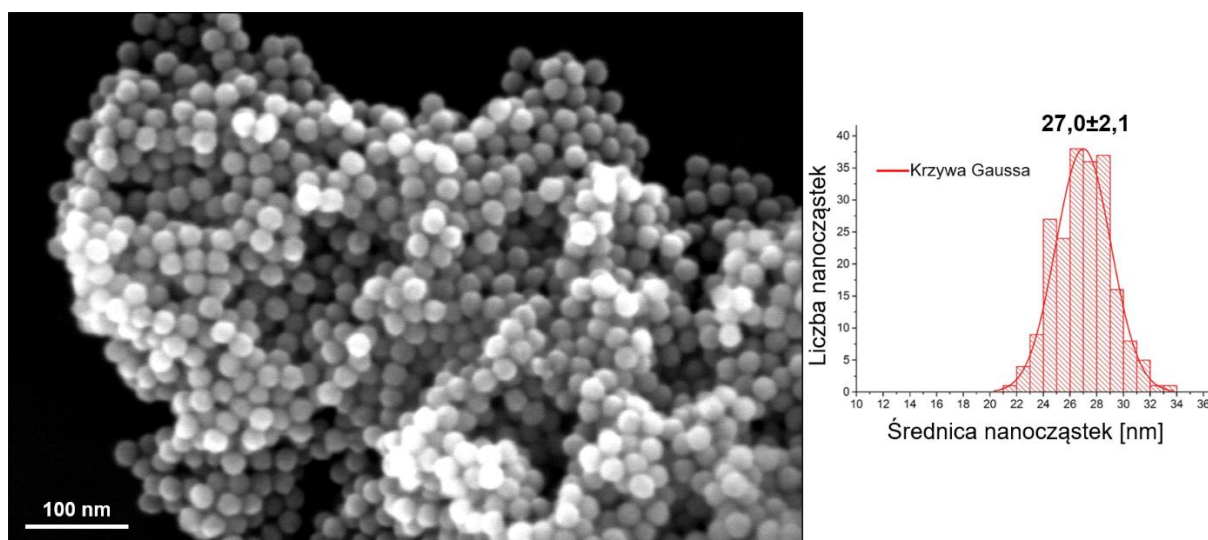
4.1.1. Modyfikacje powierzchni

Nanocząstki pokryte kwasem oleinowym potraktowane 0,1 M roztworem kwasu solnego zostały skutecznie uwolnione z jego obecności, a produktem końcowym były nanocząstki o hydrofilowej powierzchni, przypominające wyglądem próbkę wyjściową (**Rycina 12**). Hydrofilowy charakter powierzchni nanocząstek gwarantował ich dobrą dyspergowalność w wodnych roztworach oraz obojętnych roztworach fizjologicznych, stosowanych w badaniach biologicznych.



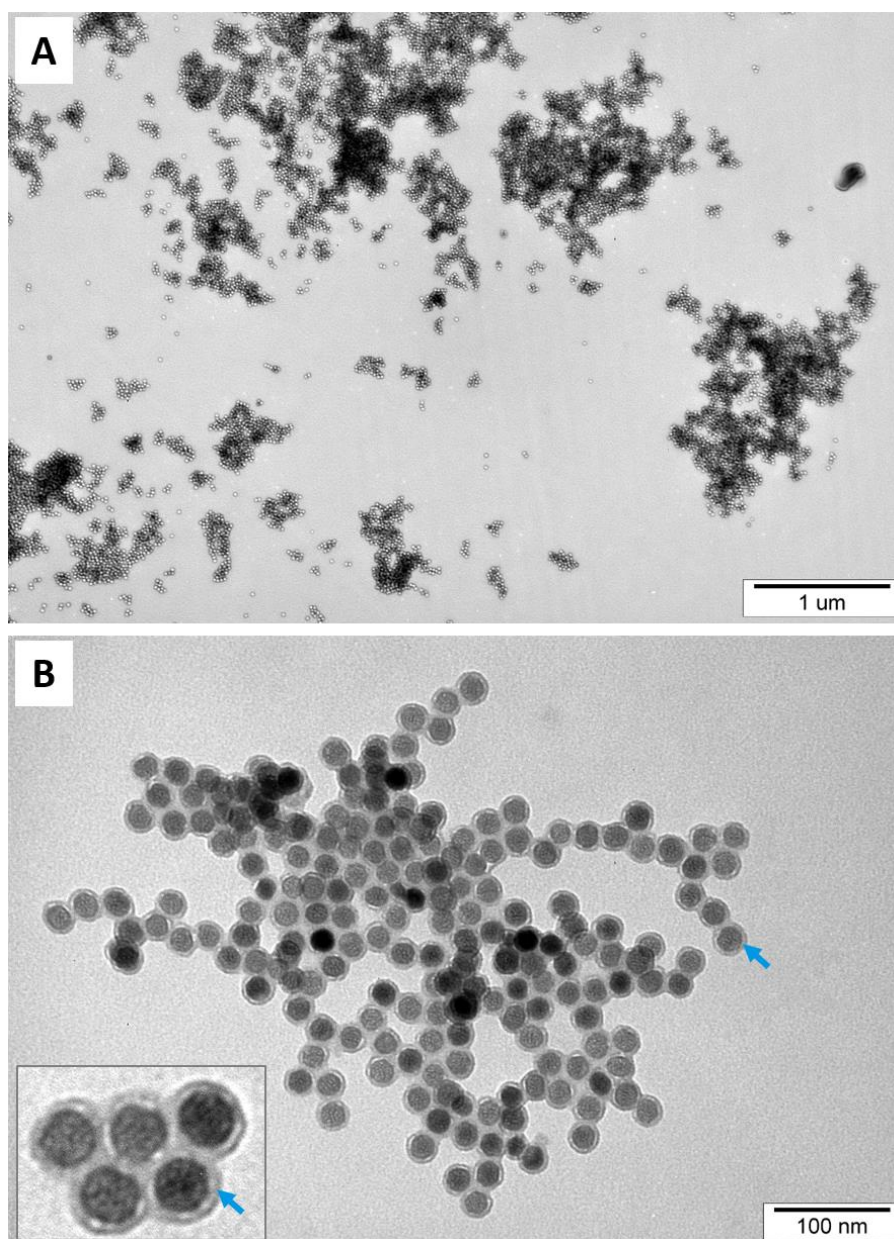
Rycina 12. Elektronogramy TEM przedstawiające nanocząstki $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ po usunięciu kwasu oleinowego z ich powierzchni.

Dzięki zastosowanej metodzie kapsułkowania otrzymano produkt końcowy w postaci nanocząstek pokrytych warstwą tlenku krzemu ($\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}@SiO_2$) o grubości ~ 2 nm. Grubość otoczki została oszacowana na podstawie średniej uzyskanej z pomiarów rozkładu wielkości losowo wybranych ~ 200 nanocząstek przy pomocy SEM (**Rycina 13**).



Rycina 13. Elektronogram SEM nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}@SiO_2$ oraz histogram ich rozkładu wielkości.

Analiza TEM wykazała, że warstwa krzemionkowa, została z powodzeniem naniesiona na nanocząstki (**Rycina 14**). Nanocząstki pokryte ciągłą warstwą SiO₂ o grubości ~2 nm tworzą strukturę typu rdzeń/powłoka.



Rycina 14. Elektronogramy TEM nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ pokrytych warstwą SiO₂, wykonane na różnych powiększeniach (A, B). Wstawka - zaznaczona niebieską strzałką warstwa SiO₂ (B).

4.1.2. Potwierdzenie składu pierwiastkowego w uzyskanych nanocząstkach metodą spektroskopii dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego

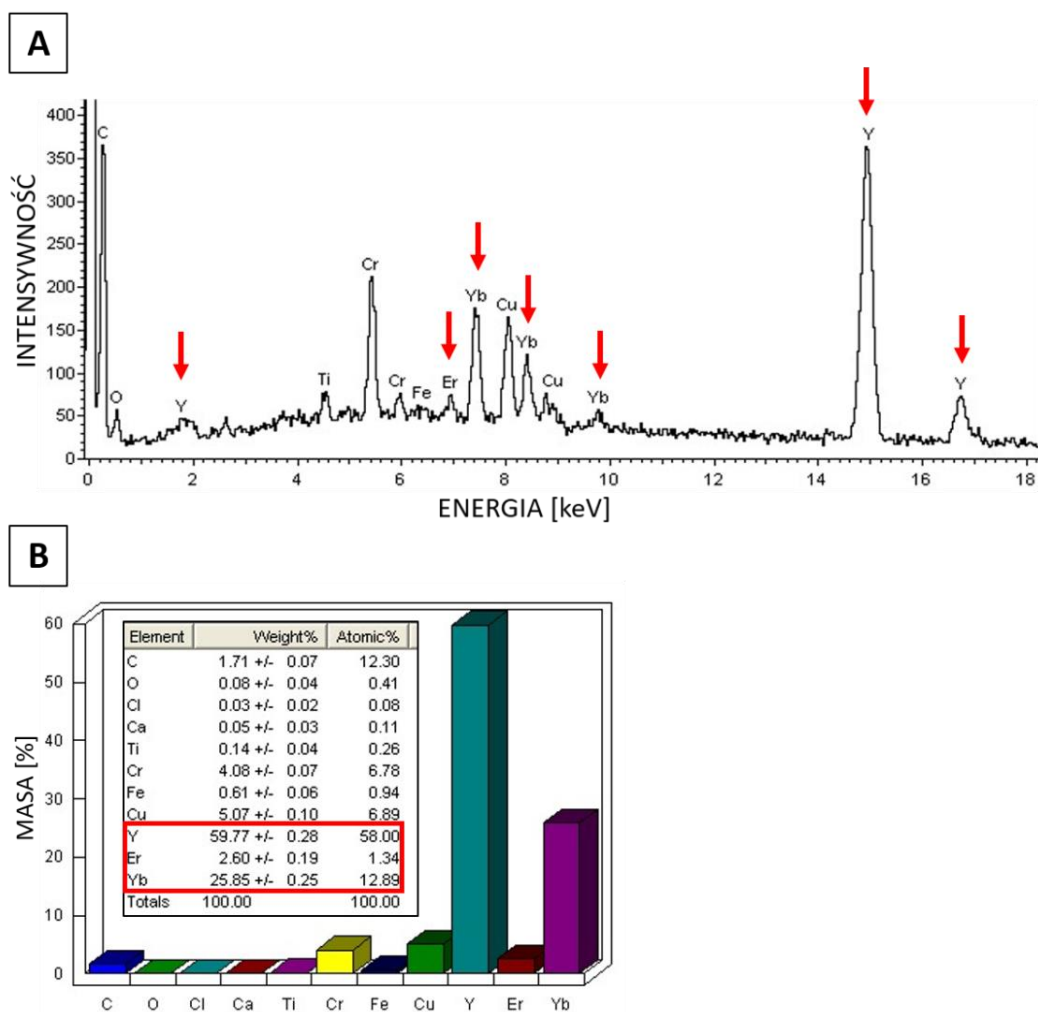
W celu potwierdzenia składu pierwiastkowego otrzymanych nanocząstek zastosowano metodę EDS. Wyniki analizy wykazały obecność charakterystycznych pierwiastków ziem rzadkich (Y, Yb, Er), wchodzących w skład otrzymanych nanocząstek. Stosunek procentowy

tych pierwiastków był spójny z ilościami substratów (prekursory soli trifluorooctanowych Y, Yb i Er) użytych w reakcji syntezy nanocząstek (**Tabela 8**).

Tabela 8. Stosunek poszczególnych jonów w badanych UCNP s β -NaYF $_4$:20%Yb $^{3+}$,2%Er $^{3+}$.

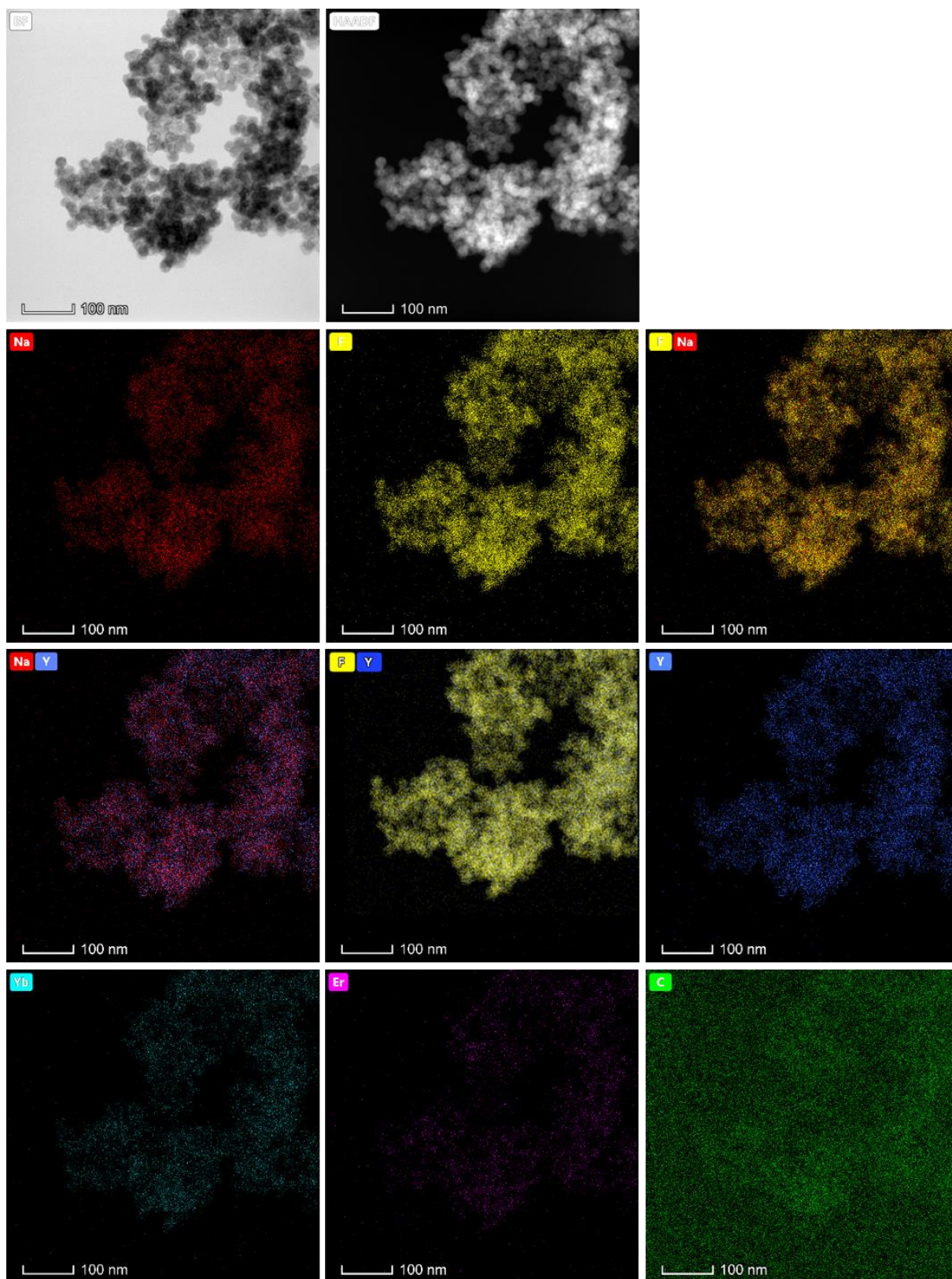
Stosunek jonów w UCNP s NaY $_{0,78}$ Yb $_{0,2}$ Er $_{0,02}$ F $_4$	Er/Y (0,02/0,78)	Er/Yb (0,02/0,2)	Yb/Y (0,2/0,78)
Teoretyczny	0,026	0,100	0,26
Eksperymentalny	0,023	0,104	0,22

Widmo EDS zbierane było bezpośrednio z obszaru oświetlonego wiązką światła. Obecność na wykresie pierwiastków takich jak chrom (Cr), miedź (Cu) i żelazo (Fe) związana jest z konstrukcją mikroskopu. Natomiast piki węgla (C) i chloru (Cl), pochodząły od błony formwarowej, którą była pokryta siatka niklowa. Wyniki przedstawiono na **Rycinie 15**.



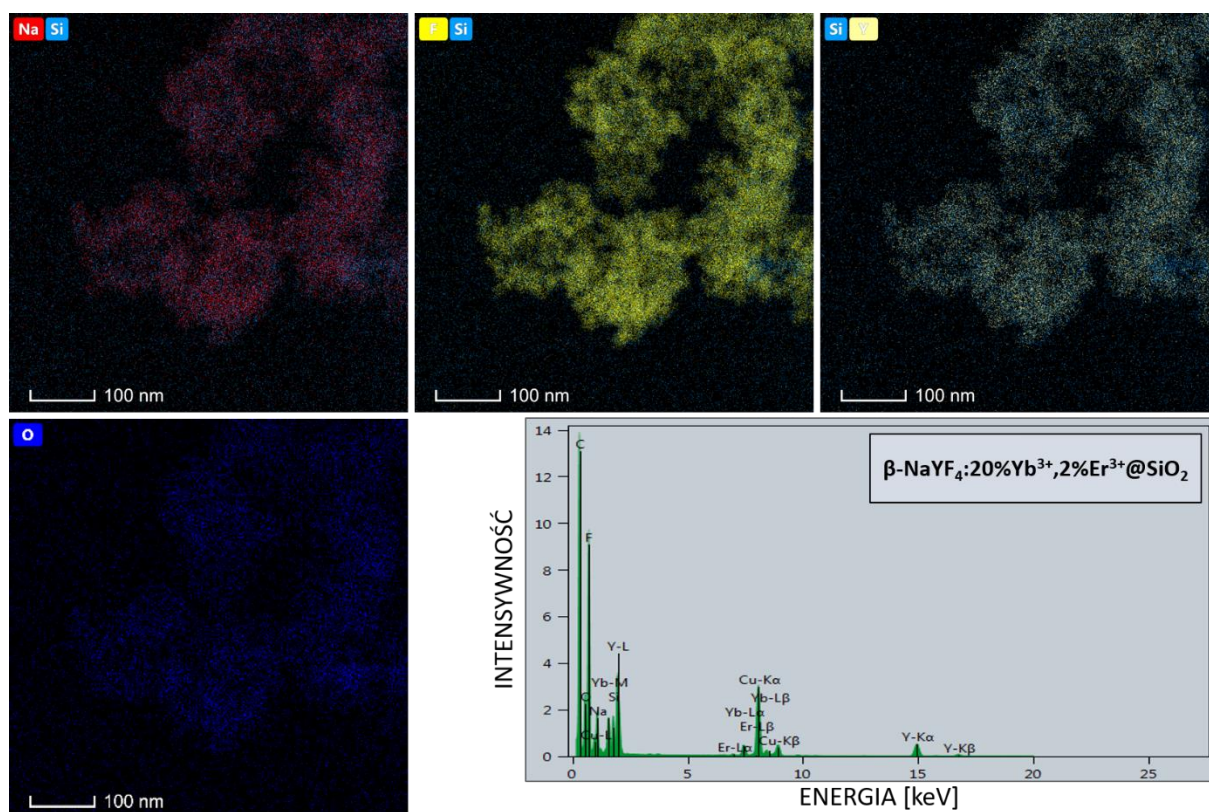
Rycina 15. Widmo EDS nanocząstek β -NaYF $_4$:20%Yb $^{3+}$,2%Er $^{3+}$ uzyskane przy pomocy pomiarów EDS. Czerwonymi strzałkami zaznaczone charakterystyczne pierwiastki ziem rzadkich wchodzące w skład nanocząstek (Y, Yb, Er) (A). Zawartość procentowa analizowanych pierwiastków (B).

Mapy EDS rozkładu pierwiastków chemicznych wykonane w trybie STEM przedstawiono na *Rycinie 16*.

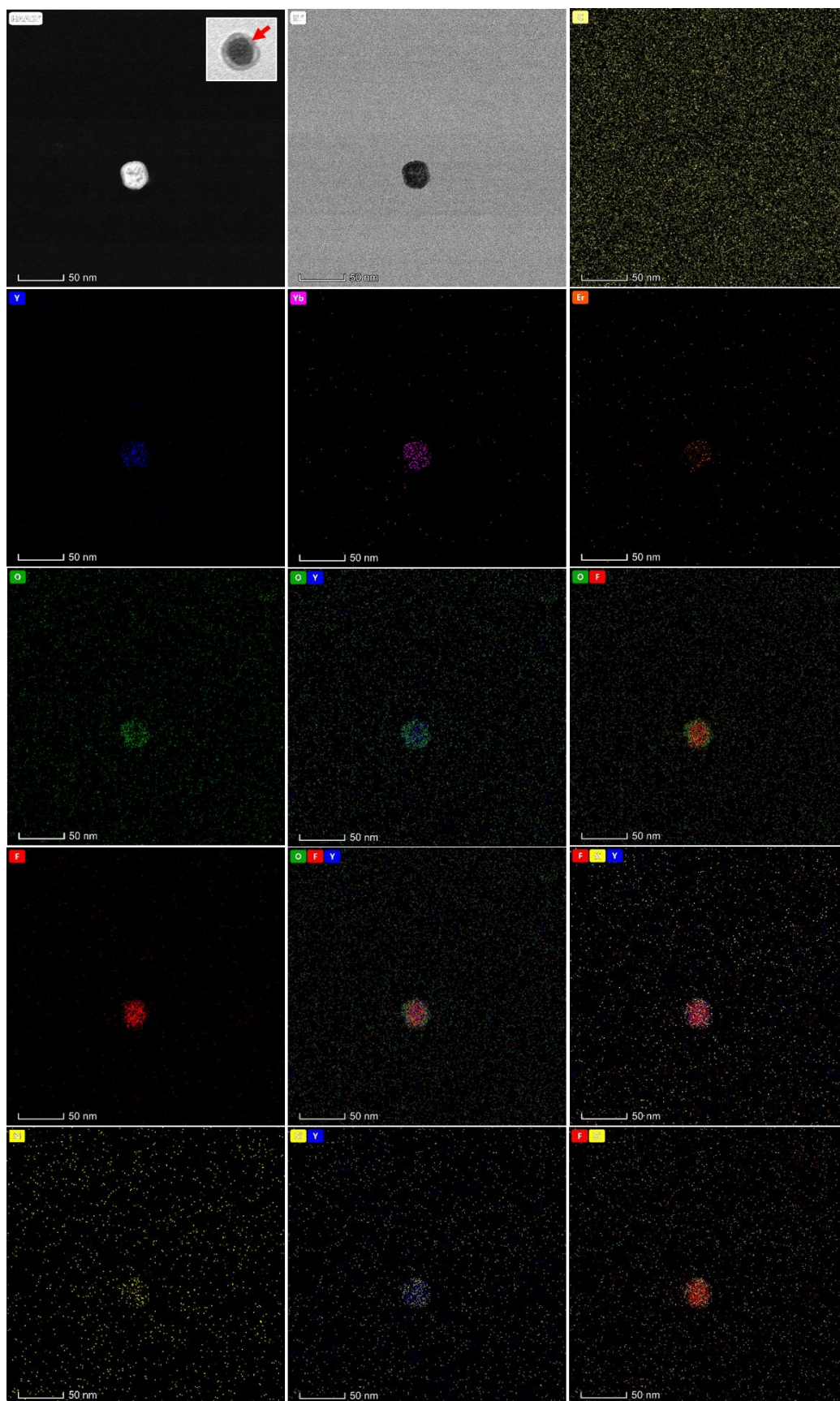


Rycina 16. Mapy rozkładu pierwiastków chemicznych wchodzących w skład nanocząstek β - $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+}, 2\%\text{Er}^{3+}$.

W celu uzyskania informacji, na temat rozkładu stężenia danego pierwiastka przeprowadzono tzw. mapowanie – mikroanalizę powierzchniową (powierzchniowa analiza jakościowa). Mikroanaliza EDS umożliwia tworzenie map pierwiastkowych obrazujących rozkład poszczególnych pierwiastków w analizowanej próbce. Taka mapa jest zbiorem plamek odpowiadających impulsom promieniowania rentgenowskiego, a stopień ich zagęszczenia odpowiada stężeniu danego pierwiastka. Mapy rozkładu pierwiastków chemicznych dla próbki nanocząstek przedstawiono na **Rycinie 17 i Rycinie 18**. Analiza pierwiastków dla otrzymanych nanomateriałów $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}@\text{SiO}_2$, przeprowadzona metodą EDS, potwierdziła skład pierwiastków otrzymanych nanocząstek oraz ich pokrycie zewnętrzną warstwą krzemionki.



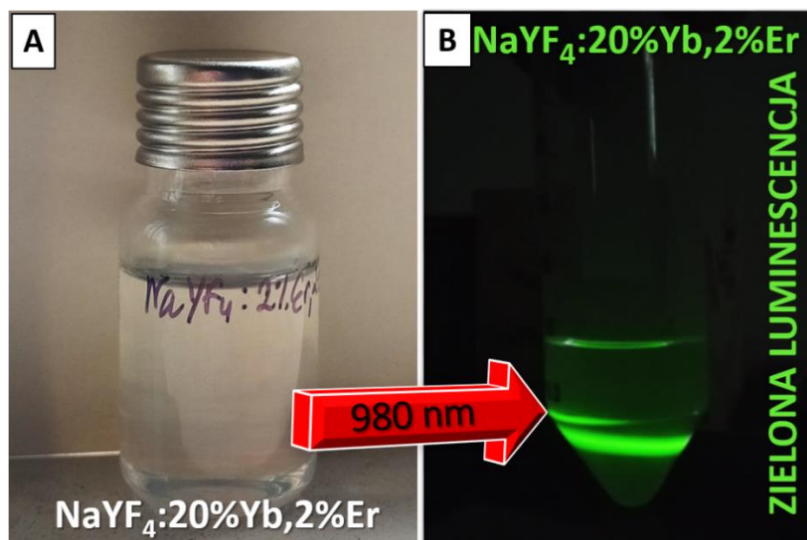
Rycina 17. Mikroanaliza EDS przedstawiająca mapy rozkładu pierwiastków Na, F, Y, Si i O na nanocząstkach $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}@\text{SiO}_2$ po kapsułkowaniu krzemionką oraz widmo EDS potwierdzające skład chemiczny analizowanych pierwiastków.



Rycina 18. Mikroanaliza EDS przedstawiająca rozkład poszczególnych pierwiastków na analizowanej pojedynczej nanocząstce pokrytej warstwą SiO_2 . Wstawka na pierwszym obrazie - elektronogram TEM przedstawiający nanocząstkę $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}@\text{SiO}_2$, czerwoną strzałką została zaznaczona otoczka SiO_2 .

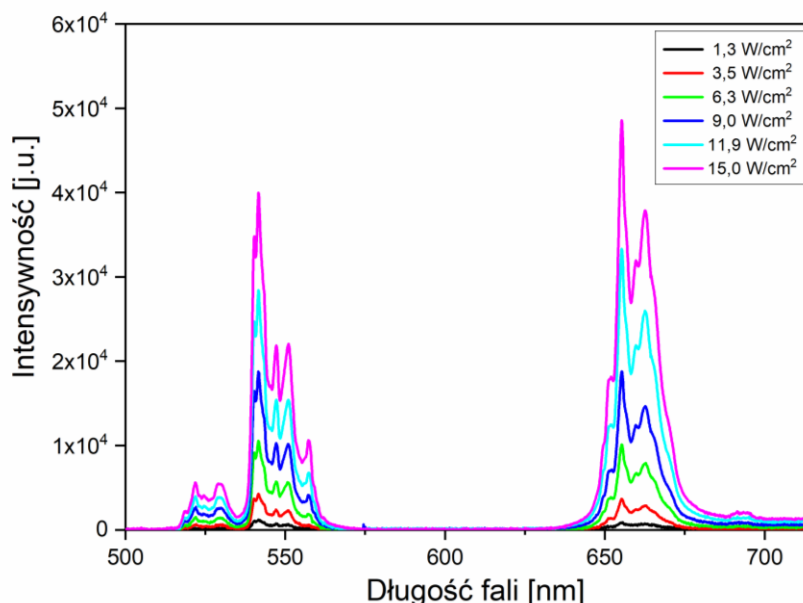
4.1.3. Właściwości luminescencyjne nanocząstek β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺

Właściwości spektroskopowe uzyskanych nanomateriałów analizowano poprzez pomiar widm emisji luminescencji pod wpływem naświetlania laserem podczerwonym o długości fali promieniowania 980 nm. Przeprowadzone pomiary wykazały, że nanocząstki β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ charakteryzują się wysoką wydajnością konwersji energii w górę, która przekłada się na ich intensywną, zieloną i czerwoną luminescencję (*Rycina 19*).



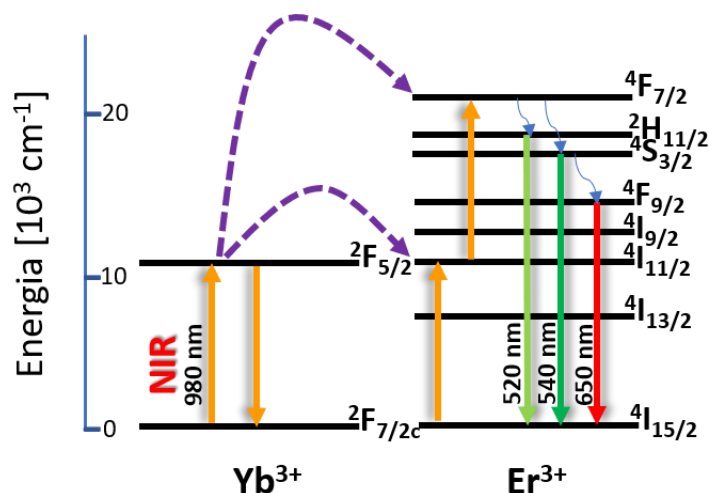
Rycina 19. Próbka z roztworem nanocząstek zawieszonych w cykloheksanie bezpośrednio po syntezie (A), oświetlana laserem podczerwonym 980 nm (wiązka lasera zaznaczona czerwoną strzałką) wykazująca zieloną luminescencję (B).

Widma trójwartościowych jonów domieszkujących w nanokryształach NaYF₄ charakteryzują się wąskimi pasmami emisji, o małej szerokości spektralnej (dla zielonej luminescencji: 520-560 nm i dla czerwonej luminescencji: 640-700 nm). Na uzyskanych widmach emisji, zarejestrowano dwa wyraźnie odrębne, charakterystyczne pasma dla pary pierwiastków Yb³⁺-Er³⁺, z maksimum intensywności przy długości fali ~520 nm i ~540 nm dla zielonej luminescencji, oraz ~650 nm dla czerwonej luminescencji. Przykładowe widma uzyskane z pomiarów luminescencji dla nanocząstek β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ przedstawiono na *Rycinie 20*.



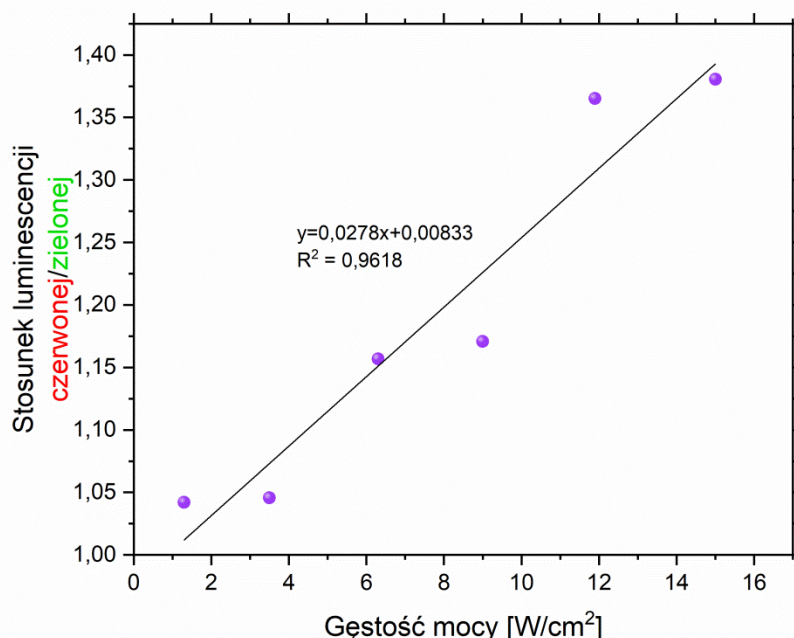
Rycina 20. Widma luminescencji konwersji energii w górę roztworu nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ zawieszonych w cykloheksanie o stężeniu 30 mg/ml zmierzone przy pobudzeniu laserem pracy ciągłej o długości fali 980 nm i o gęstości mocy od 1,3 – 15 W/cm².

Analiza intensywności pasm emisyjnych w zależności od energii promieniowania wzbudzającego wykazała, że za zachodzący transfer energii, a w jego wyniku zieloną i czerwoną emisję luminescencji nanokryształów $\beta\text{-NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ odpowiada mechanizm przeniesienia energii ETU. Pasma zorientowane przy długości fali ~520 nm oraz ~540 nm pochodzą odpowiednio z przejścia pomiędzy poziomami $^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ oraz $^2\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$. Emisja czerwona dla fali przy długości ~650 nm pochodzi z przejścia pomiędzy poziomami $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ (**Rycina 21**).



Rycina 21. Diagram energetyczny przedstawiający proces konwersji energii w górę w mechanizmie ETU zachodzący w parze jonów $\text{Yb}^{3+}\text{-Er}^{3+}$ przy pobudzeniu 980 nm. Oznaczenia: pomarańczowe strzałki - przejścia między stanami energetycznymi, przerywane fioletowe strzałki - transfer energii, niebieskie strzałki - przejścia bezpromienne, czerwona i zielone strzałki skierowane w dół - emisja promieniowania widzialnego (520 nm i 540 nm) oraz czerwonego (650nm). Opracowanie własne na podstawie [23,99].

Stosunek maksymalnej intensywności luminescencji czerwonej do luminescencji zielonej zwiększał się wprost proporcjonalnie wraz ze wzrostem gęstości mocy pobudzenia laserem. Przy czym zielona emisja miała wyższe wartości przy niższych gęstościach mocy, natomiast czerwona emisja wzrastała dla wyższych gęstości mocy (**Rycina 22**).



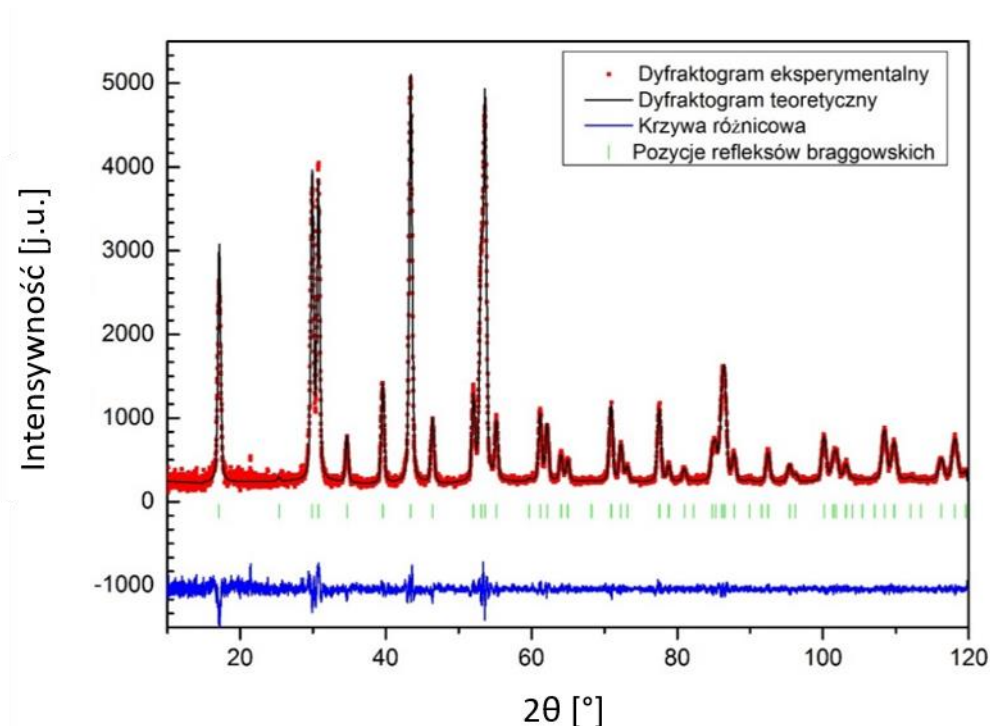
Rycina 22. Wykres przedstawiający stosunek luminescencji czerwonej do luminescencji zielonej, wyliczony na podstawie pomiaru pola powierzchni dla każdego widma luminescencji w zależności od użytej gęstości mocy naświetlania laserem 980 nm. Wykres wykonano w programie Origin.

4.1.4. Wartość potencjału zeta

Pomiary potencjału zeta dla nanocząstek przyjmowały wartość dodatnią, która wynosiła $\sim 44,74 \pm 1,5$ mV ($\zeta = 45$ mV). Jest to wartość bardzo wysoka i świadczy o bardzo dobrej stabilności nanocząstek w roztworze.

4.1.5. Właściwości strukturalne nanocząstek β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺

Wyniki uzyskane z dyfrakcji rentgenowskiej nanocząstek wykazały, że otrzymano jednofazowe nanokryształy NaYF₄ w fazie β świadczące o ich heksagonalnej strukturze. Widma XRD nanocząstek β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ zostały przedstawione na **Rycinie 23** i wskazują na ich regularną strukturę krystaliczną. Stałe sieci krystalicznej dla nanocząstek β -NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ uzyskano w oparciu o dane XRD uzyskane z obliczeń z wykorzystaniem metody Rietvelde, i wynoszą one: a [Å] = 5,9720(1), c [Å] = 3,5123(1).



Rycina 23. Widmo dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego dla nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4\text{:}20\%\text{Yb}^{3+}, 2\%\text{Er}^{3+}$.

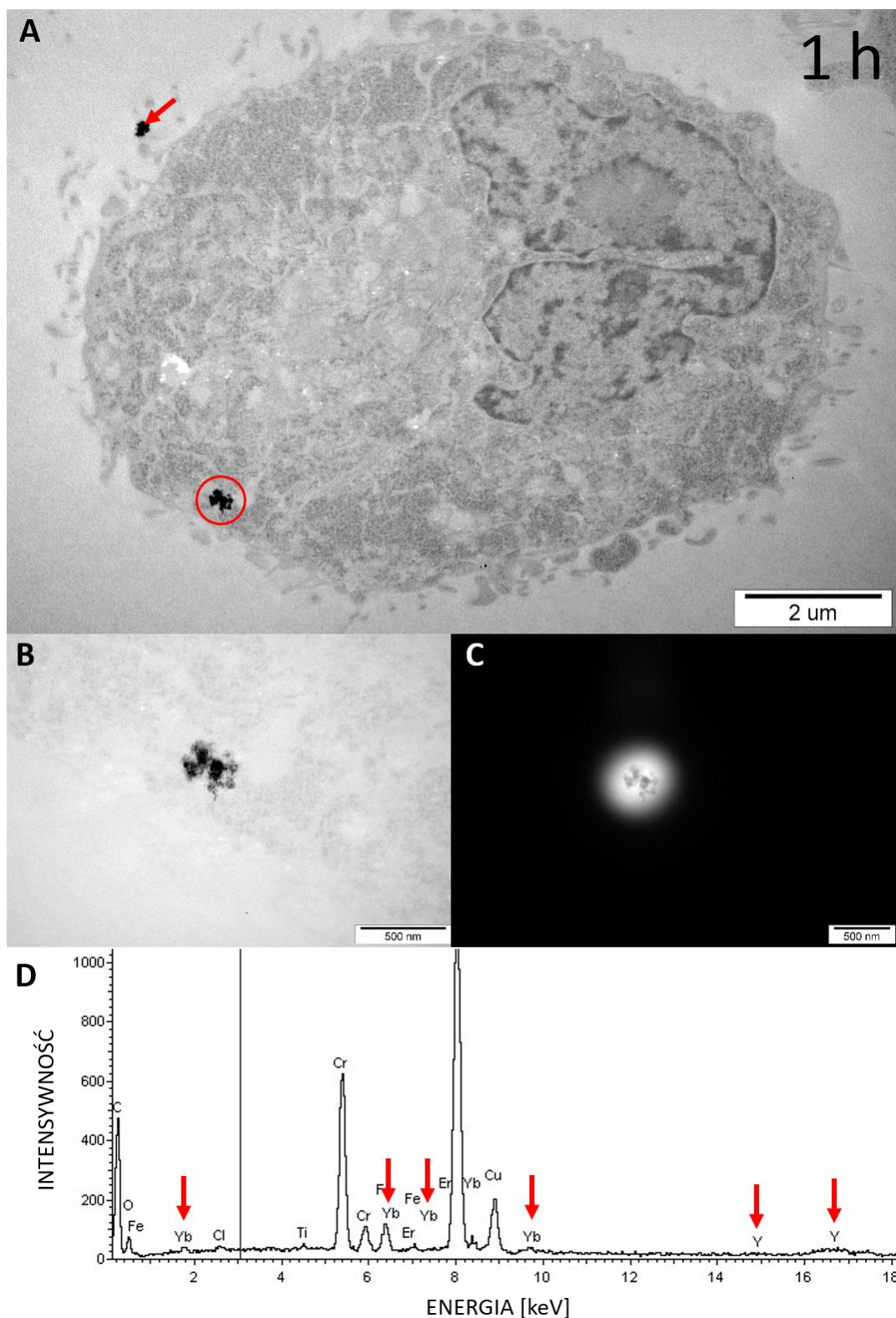
4.2. Wyniki badań biologicznych

4.2.1. Wpływ badanych nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4\text{:}20\%\text{Yb}^{3+}, 2\%\text{Er}^{3+}$ na komórki *in vitro*

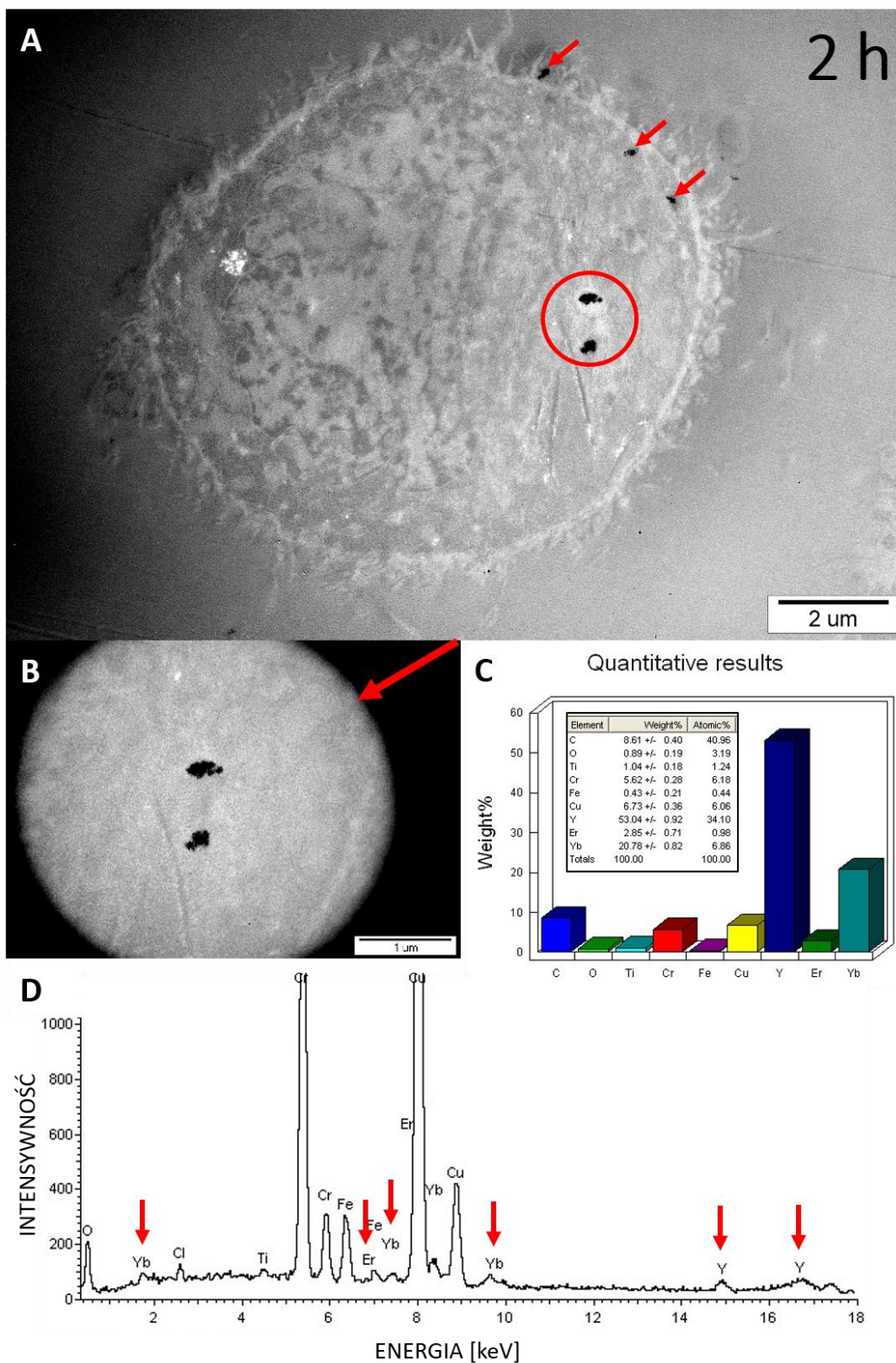
4.2.1.1. Potwierdzenie obecności nanocząstek i ich składu pierwiastkowego za pomocą spektroskopii dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego

Wykonano analizę EDS, która potwierdziła obecność UCNPs $\beta\text{-NaYF}_4\text{:}20\%\text{Yb}^{3+}, 2\%\text{Er}^{3+}$ we wnętrzu komórek HeLa oraz ich przewidywany skład chemiczny. Na *Rycinie 24* i *Rycinie 25* zaprezentowano elektronogramy, obrazujące komórki HeLa odpowiednio po 1 i 2 godzinach inkubacji z 1 $\mu\text{g/ml}$ nanocząstek.

Po 1 godzinie UCNPs znajdowały się poza komórką oraz w jej wnętrzu w bliskim sąsiedztwie błony komórkowej. Natomiast po 2 godzinach inkubacji, UCNPs obserwowane były głównie we wnętrzu komórki, w okolicy jądra komórkowego i w znacznie większej ilości, co wskazuje na ich dynamiczną internalizację i biodystrybucję. Ponadto, agregaty nanocząstek były bardzo wyraźnie widoczne w komórkach, a zebrane z nich widma EDS wykazały obecność charakterystycznych pierwiastków ziem rzadkich, z których się składały (Y, Yb, Er). Uzyskane wyniki są zatem bezpośrednim dowodem, że obserwowane agregaty były UCNPs znajdującymi się we wnętrzu komórek HeLa.



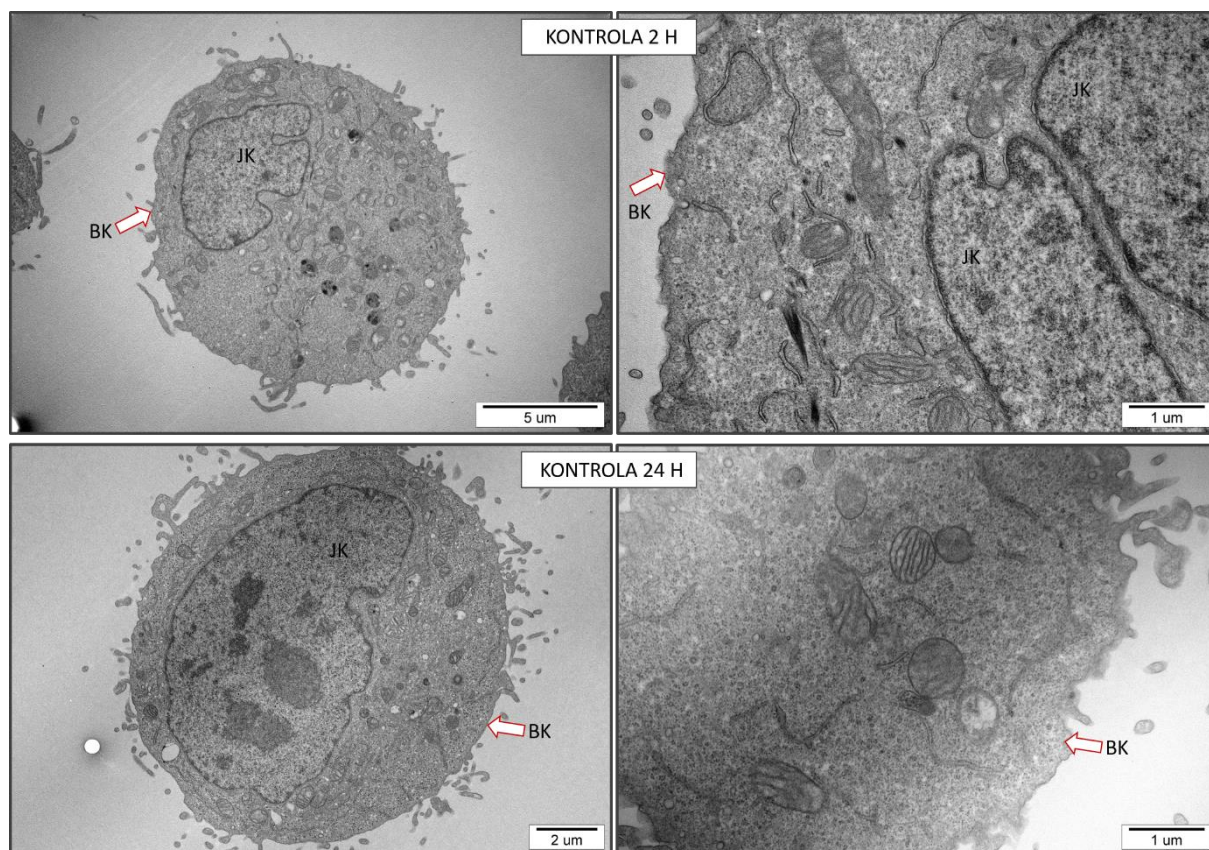
Rycina 24. Widmo EDS wykonane dla nanocząstek po 1 godzinie inkubacji z $1\mu\text{g/ml}$ nanocząstek. Elektronogram przedstawiający komórkę HeLa i agregat nanocząstek w jej wnętrzu (A), powiększenie analizowanego obszaru z nanocząstkami (czerwony obrys) (B), zakres wiązki skupionej na analizowanym obszarze (C). Widmo EDS -piki pochodzące od charakterystycznych pierwiastków (Y, Yb, Er) wchodzących w skład analizowanych nanocząstek zaznaczono na widmie czerwonymi strzałkami (D).



Rycina 25. Widmo EDS wykonane dla nanocząstek po 2 godzinach inkubacji. Elektronogram przedstawiający komórkę HeLa i agregaty nanocząstek w jej wnętrzu (A). Obszar, na którym skupiona była wiązka i zbierane było widmo (B). Wykres przedstawiający zawartość procentową pierwiastków z obszaru B (C). Widmo EDS - piki pochodzące od charakterystycznych pierwiastków (Y, Yb, Er) wchodzących w skład analizowanych nanocząstek zaznaczono na widmie czerwonymi strzałkami (D).

4.2.1.2. Ocena mikroskopowo-elektronowa oddziaływań UCNPs z komórkami

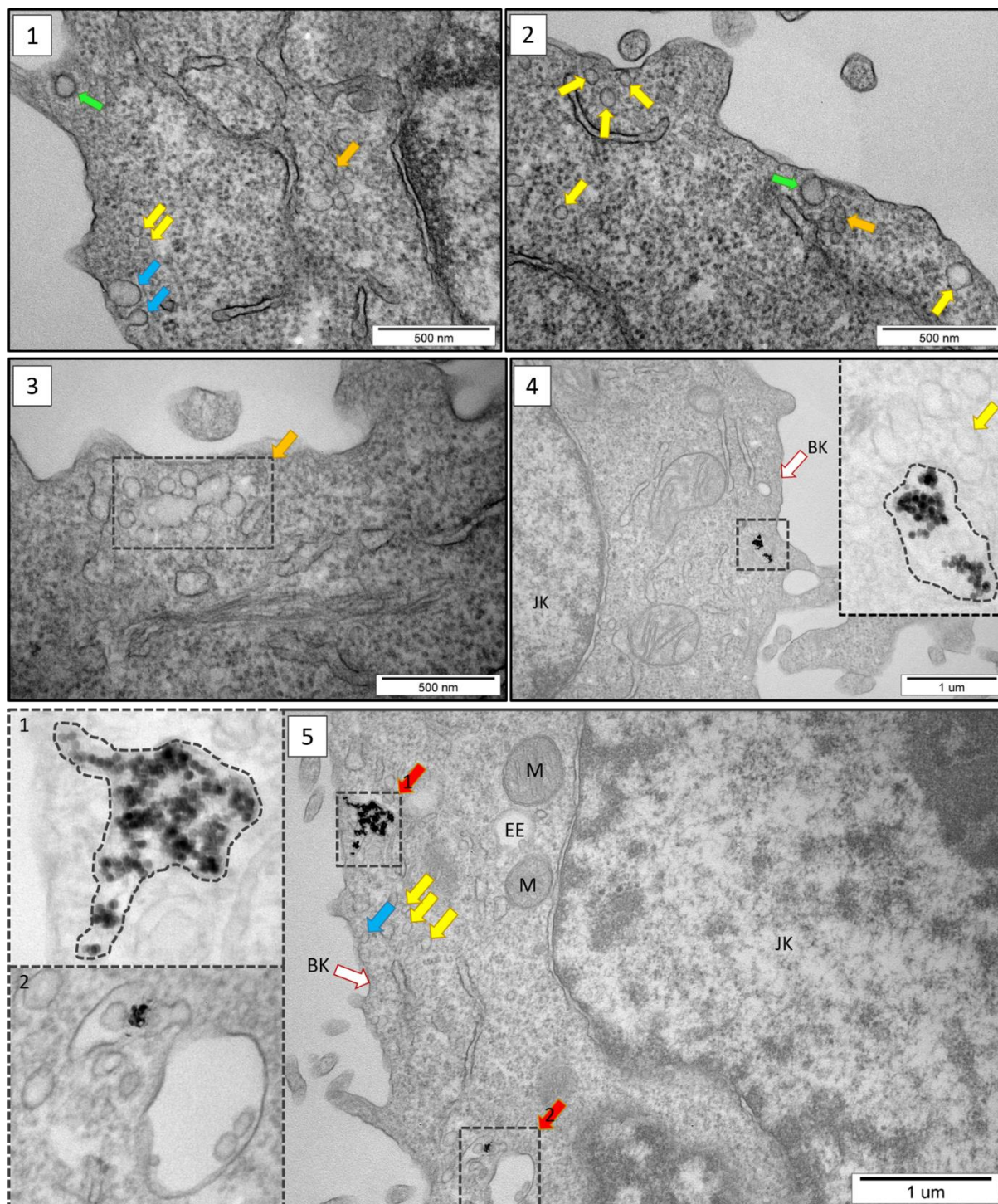
Analiza mikroskopowo-elektronowa umożliwiła ocenę internalizacji nanocząstek do komórek oraz zmian towarzyszących temu procesowi. Na elektronogramach potwierdzono obecność nanocząstek we wnętrzu komórek, co świadczyło o efektywnym procesie ich internalizacji. Aby ocenić, jak wpływa obecność uzyskanych nanocząstek na komórki *in vitro* dokonano analizy mikroskopowej ich morfologii i porównano uzyskane obrazy z komórkami kontrolnymi (bez podania nanocząstek) (**Rycina 26**).



Rycina 26. Panel przedstawiający wybrane elektronogramy komórek kontrolnych HeLa po 2 i 24 godzinach inkubacji bez nanocząstek. JK - jądro komórkowe, BK - błona komórkowa zaznaczona strzałką.

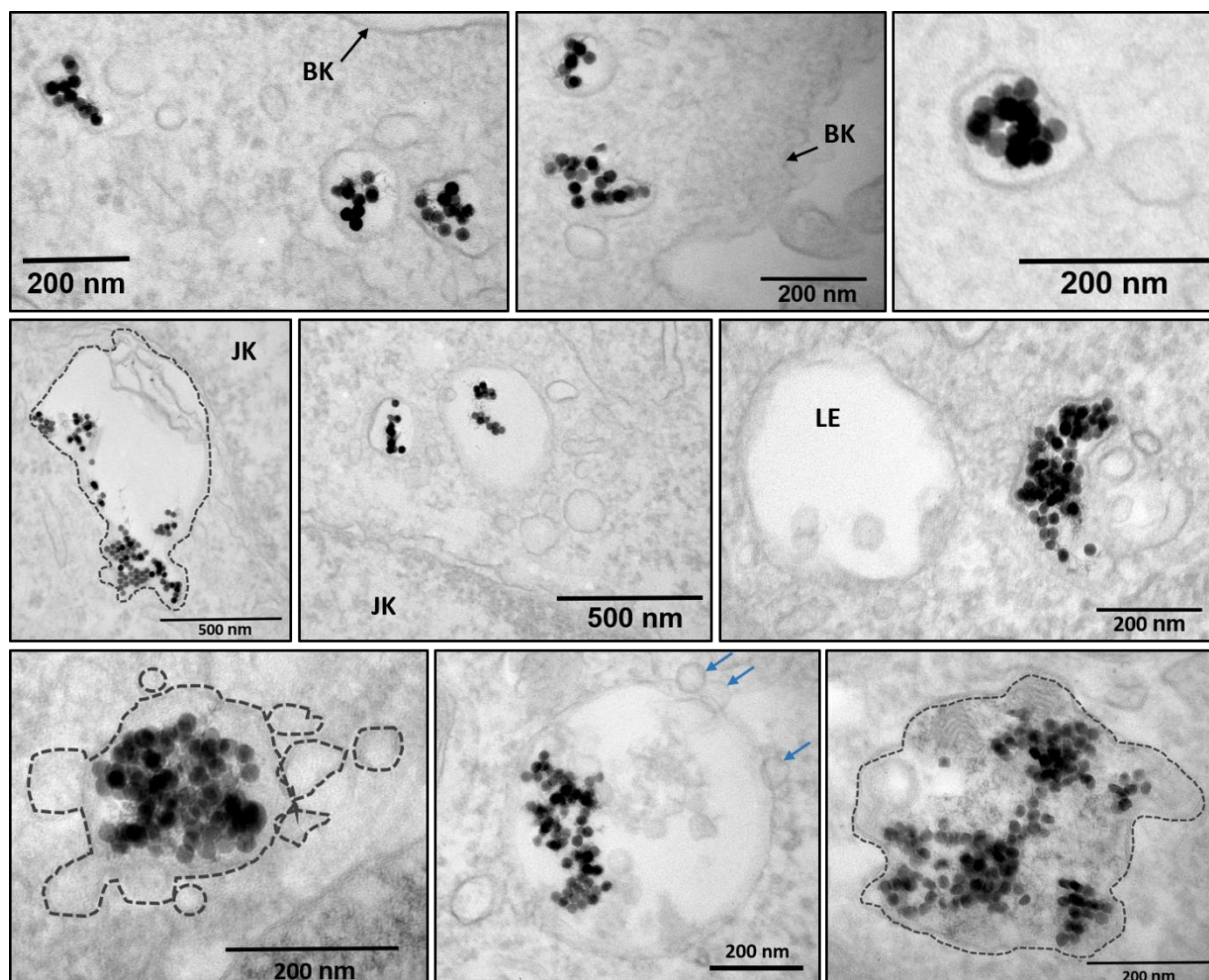
Proces pobierania nanocząstek przez komórki badano dwutorowo, w różnych interwałach czasowych przez 24 godziny i 2 godziny inkubacji z nanocząstkami. Obserwacje prowadzone 24 godziny od podania nanocząstek miały na celu określenie czasu niezbędnego do ich efektywnej internalizacji i miejsca ich lokalizacji w komórce, a także ocenę ich efektu cytotoksycznego. Badanie wykazało, że internalizacja nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ była procesem aktywnym i zachodziła w bardzo dynamiczny sposób. Dowodem na to była silnie pofałdowana powierzchnia błony komórkowej oraz licznie występujące w niej zagłębienia, świadczące o zachodzącym procesie endocytozy. Zagłębienia tworzące się poprzez wpuklenie fragmentu błony komórkowej do wnętrza komórki często pokryte były klatryną.

Ponadto, obserwowano licznie występujące pęcherzyki endocytarne, endosomy na różnym stopniu dojrzałości oraz lizosomy w komórkach. Pęcherzyki endocytarne ulegały fuzji, łącząc się ze sobą i tworzyły endosomy. Analiza morfologiczna nie wykazała cech uszkodzenia komórek (*Rycina 27*).



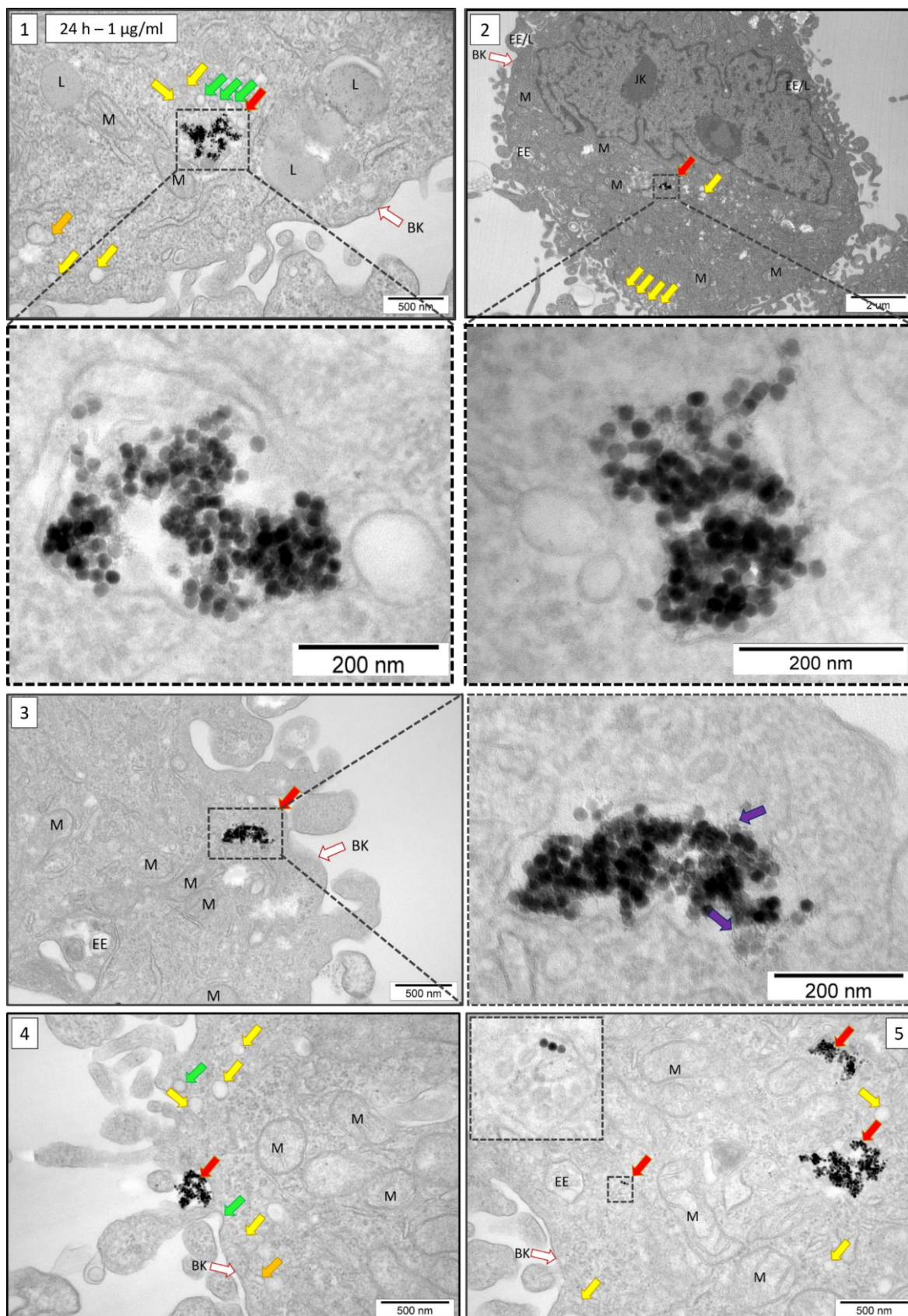
Rycina 27. Panel przedstawiający wpływ obecności nanocząstek na morfologię błony komórkowej po 24 godzinach inkubacji z 1 $\mu\text{g/ml}$ nanocząstek. BK – błona komórkowa (biała strzałka), JK- jądro komórkowe, M – mitochondrium, EE – wczesny endosom. Zielona strzałka – formujący się pęcherzyk klatrynowy, niebieska strzałka – formujący się pęcherzyk kaweołarny, żółta strzałka – uformowane pęcherzyki w cytoplazmie komórki, pomarańczowa strzałka – łączące się ze sobą pęcherzyki kaweołarne, czerwona strzałka - UCNPs we wnętrzu endosomów (elektronogram 5).

Ponadto, ocena mikroskopowo-elektronowa wykazała, że badane nanocząstki lokalizowały się wyłącznie w wybranych strukturach przedziału endosomalnego, takich jak endosomy wczesne, znajdujące się tuż pod błoną komórkową; endosomy późne o różnym stopniu dojrzałości, znajdujące się w głębi cytoplazmy i okolicy okołojądrowej; lub lizosomy (endolizosomy) (*Rycina 28*).



Rycina 28. Wybrane elektronogramy przedstawiające kolokalizację nanocząstek (1µg/ml) z endosomami po 24 godzinach inkubacji z komórkami HeLa. Oznaczenia: BK – błona komórkowa, JK- jądro komórkowe, EE – endosom wczesny, LE – endosom późny, L – lizosom/endolizosom. Niektóre z endosomów zostały dla ułatwienia zaznaczone obrysem (przerwana szara linia), w celu pokazania dokładnych granic endosomów oraz otaczających pęcherzyków endocytarnych, ulegających fuzji z endosomem, również oznaczonych niebieskimi strzałkami.

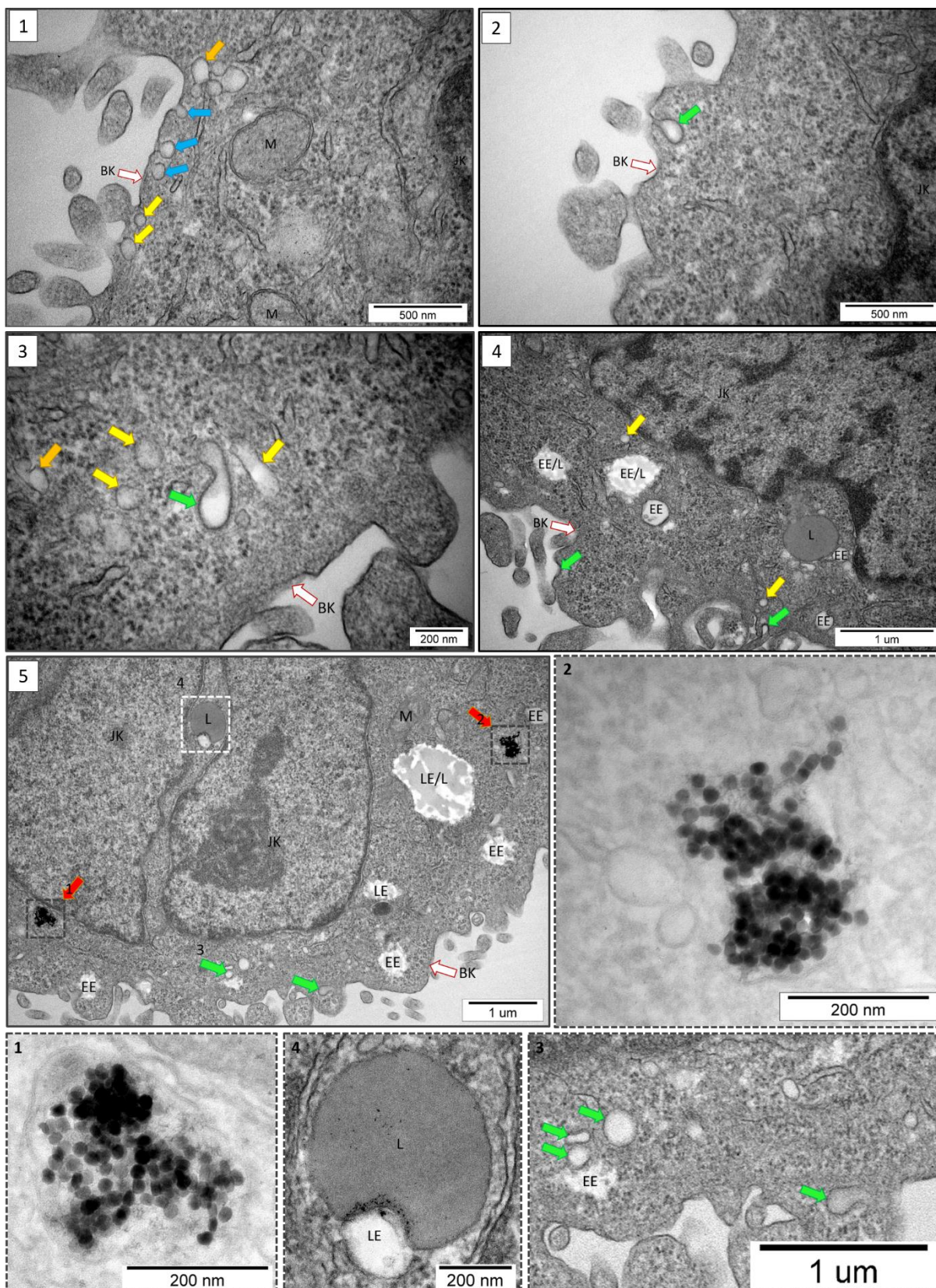
Ich obecności nie potwierdzono w innych strukturach wewnątrzkomórkowych, nie przekraczały podwójnej błony mitochondrialnej ani otoczki jądrowej. Po tym czasie nie obserwowano również zmian w morfologii komórek (*Rycina 29*).



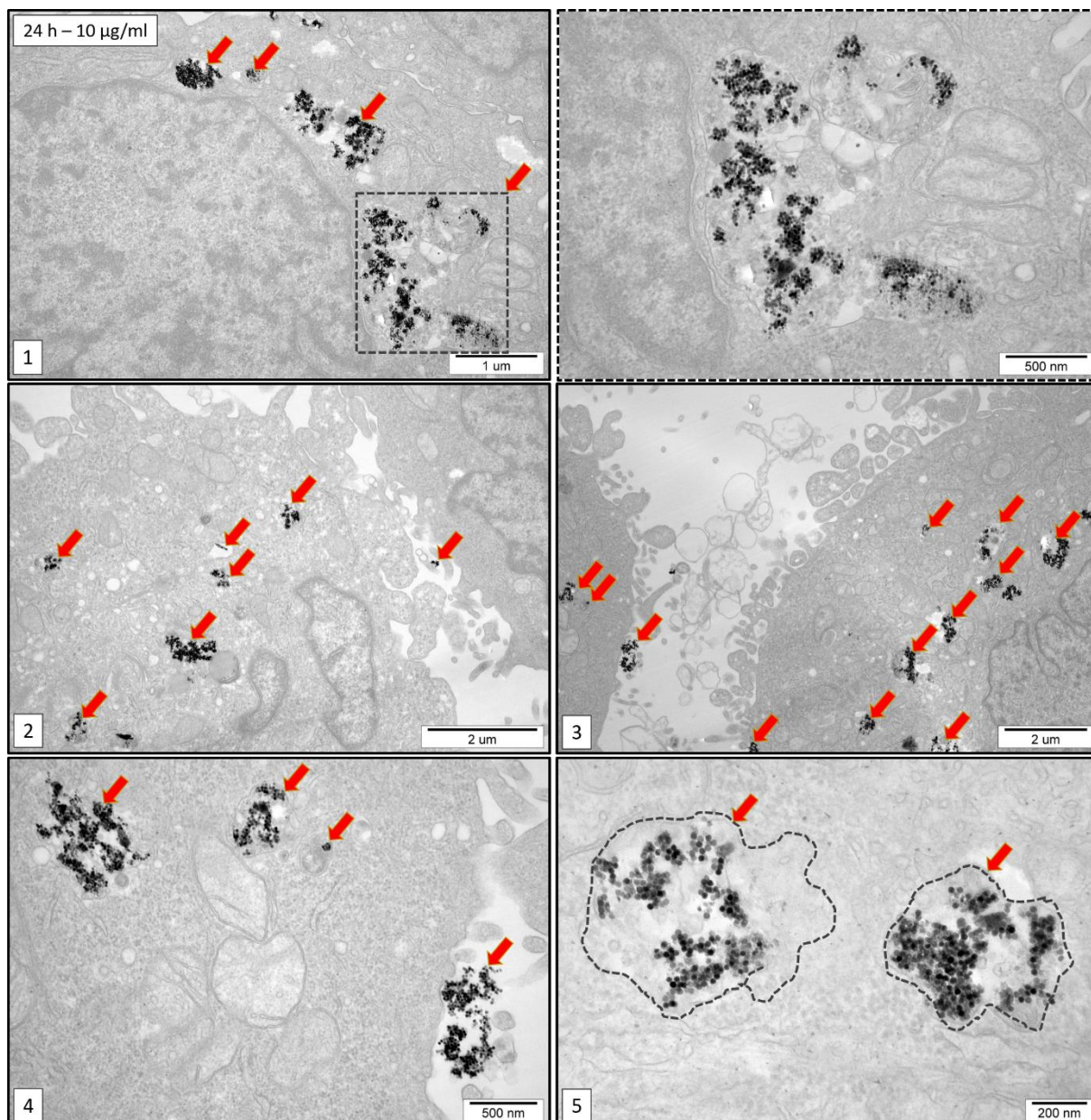
Rycina 29. Wybrane elektronogramy przedstawiające komórki Hela po 24-godzinnej inkubacji z 1µg/ml nanocząstek. BK – błona komórkowa (biała strzałka), JK- jądro komórkowe, M – mitochondrium, EE – wczesny endosom. Zielone strzałki – formujący się pęcherzyk klatrynowy, żółte strzałki – pęcherzyki endocytarne na terenie cytoplazmy komórki, pomarańczowa strzałka – łączące się ze sobą pęcherzyki, fioletowe strzałki – korona białkowa, czerwonymi strzałki - nanocząstki we wnętrzu endosomów, znajdujących się w komórkach.

Po 24 godzinach ekspozycji na wybrane stężenia nanocząstek (do 10 $\mu\text{g}/10^5$ komórek włącznie), nie obserwowano widocznych zmian ultrastrukturalnych w organellach komórkowych, które mogłyby wskazywać na ich potencjalną toksyczność. W komórkach obecne były niezmienione morfologicznie organelle komórkowe takie jak jądro komórkowe, mitochondria, siateczka śródplazmatyczna czy aparat Golgiego. Brak było również cech obrzęku komórki (*Rycina 30-31*).

We wnętrzu komórek obserwowano licznie formujące się pęcherzyki endocytarne, powstałe poprzez wpuklające się do wewnątrz fragmenty błony komórkowej. Pęcherzyki te stanowiły zarówno kaweole (butelkowate wgłębienia błony komórkowej) oraz pęcherzyki pokryte klatryną (pęcherzyki z charakterystyczną ciemną otoczką widoczną na elektronogramach – białko klatryna). W komórkach obserwowano również liczne endosomy o różnym stopniu zróżnicowania/dojrzałości oraz lizosomy. Obserwowano także endosomy ulegające fuzji z lizosomami, przekazując im swoją zawartość do degradacji (*Rycina 30, elektronogram 5, wstawka 4*).



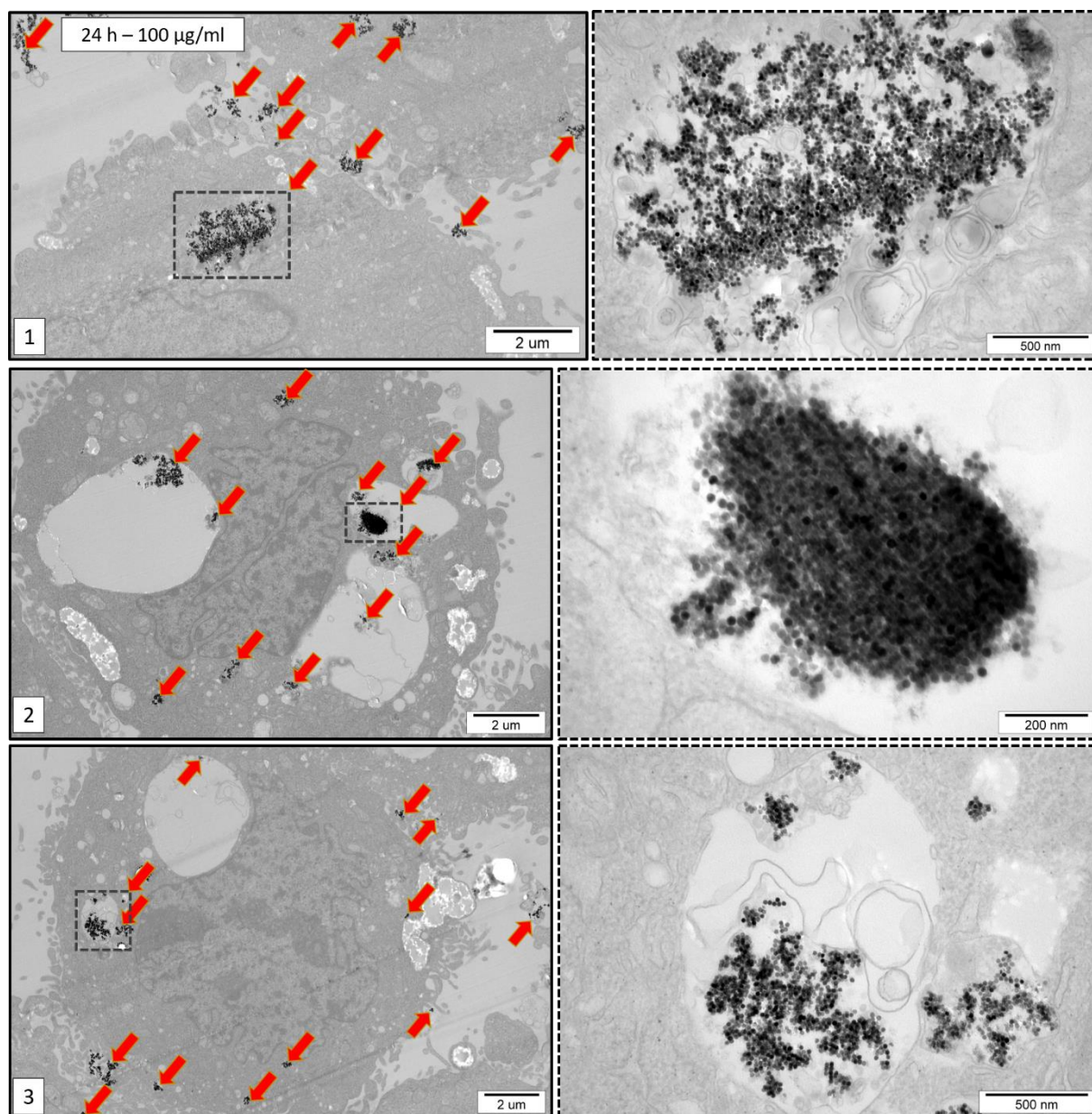
Rycina 30. Wybrane elektronogramy przedstawiające komórki HeLa po 24 godzinach inkubacji z 1 µg/ml nanocząstek. Obraz morfologiczny błony komórkowej po długotrwałej ekspozycji na nanocząstki (elektronogram 1 i 2). Oznaczenia: BK - błona komórkowa (biała strzałka), JK- jądro komórkowe, M - mitochondrium, EE - wczesny endosom, LE - późny endosom, L - lizosom, zielona strzałka - pęcherzyki klatrynowe, żółta strzałka - pęcherzyki endocytarne, pomarańczowa strzałka - łączące się ze sobą pęcherzyki, niebieska strzałka - formujące się kaweole, czerwona strzałka - nanocząstki we wnętrzu endosomów.



Rycina 31. Wybrane elektronogramy przedstawiające komórki HeLa po 24 godzinach inkubacji z 10 µg/ml nanocząstek. Nanocząstki zaznaczone są czerwonymi strzałkami (we wnętrzu endosomów późnych, zaznaczonych obrysem przerywaną linią - elektronogram 5).

Po tym czasie, oceniono również morfologię samych nanocząstek narażonych na zmienne pH środowiska komórki (endosomy wczesne, endosomy późne, lizosomy). Wyniki wykazały, że nanocząstki we wnętrzu struktur endosomów zachowywały się stabilnie oraz nie ulegały rozpadowi. UCNPs we wnętrzu komórek występowały w większych skupiskach w rozległych endosomach, a przy bardzo wysokich stężeniach nanocząstek (100 µg/ml) w autofagolizosomach (**Rycina 32**). Tak duża ilość UCNPs zgromadzonych w jednej strukturze, może sugerować, że zinternalizowane UCNPs były transportowane w mniejszych endosomach do jednego miejsca. Endosomy biorące udział w tym transporcie ulegały fuzji

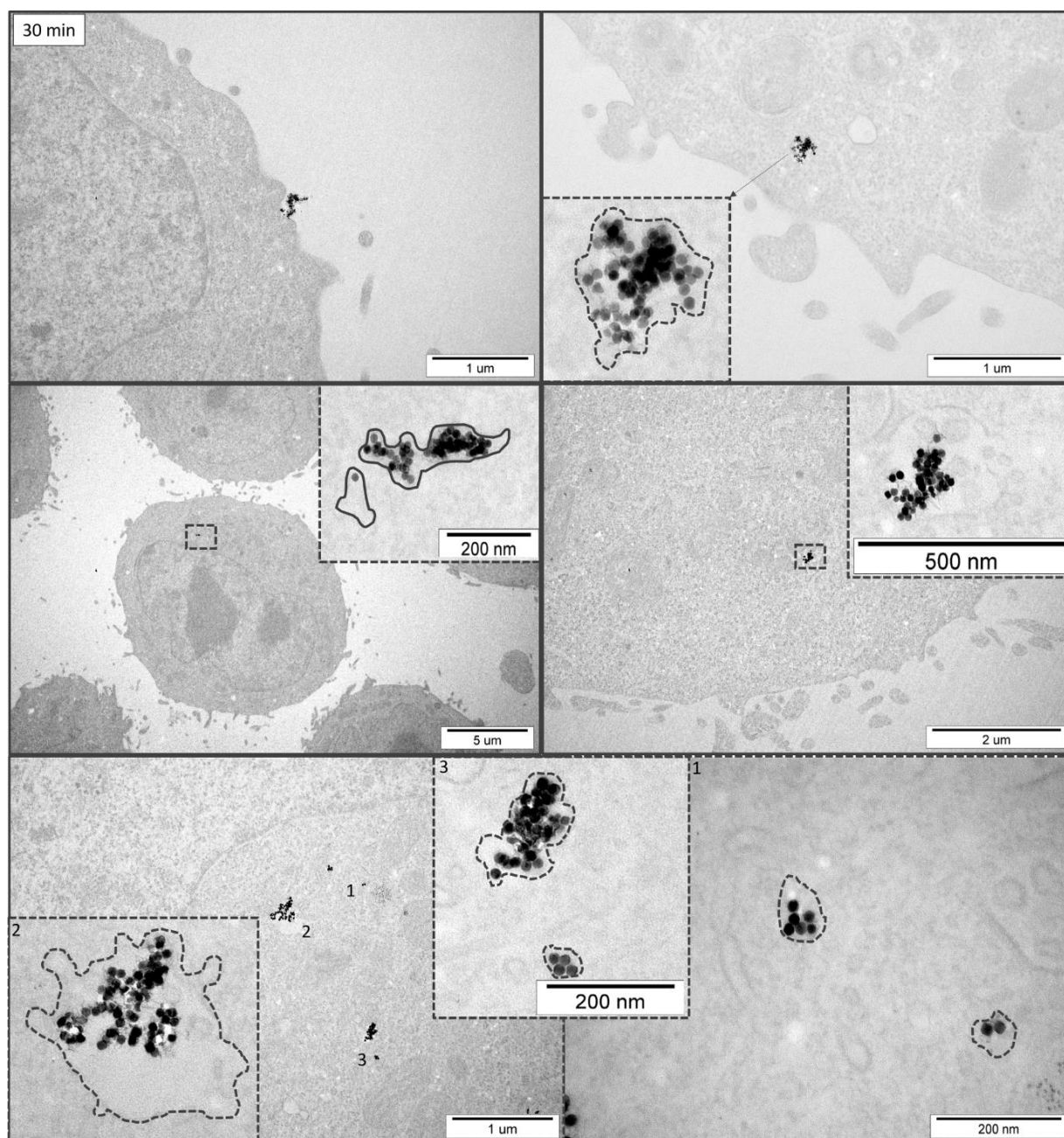
w jedną dużą strukturę w celu ich późniejszego przekazania do lizosomów, a następnie usunięcia z komórki.



Rycina 32. Wybrane elektronogramy przedstawiające komórki HeLa po 24 godzinach inkubacji z 100 µg/ml nanocząstek (1-3), z wybranymi powiększeniami dużych skupisk nanocząstek zgromadzonych w strukturach endosomów (2) oraz autofagolizosomów (powiększenie elektronogramu 3). Nanocząstki zaznaczone są czerwonymi strzałkami.

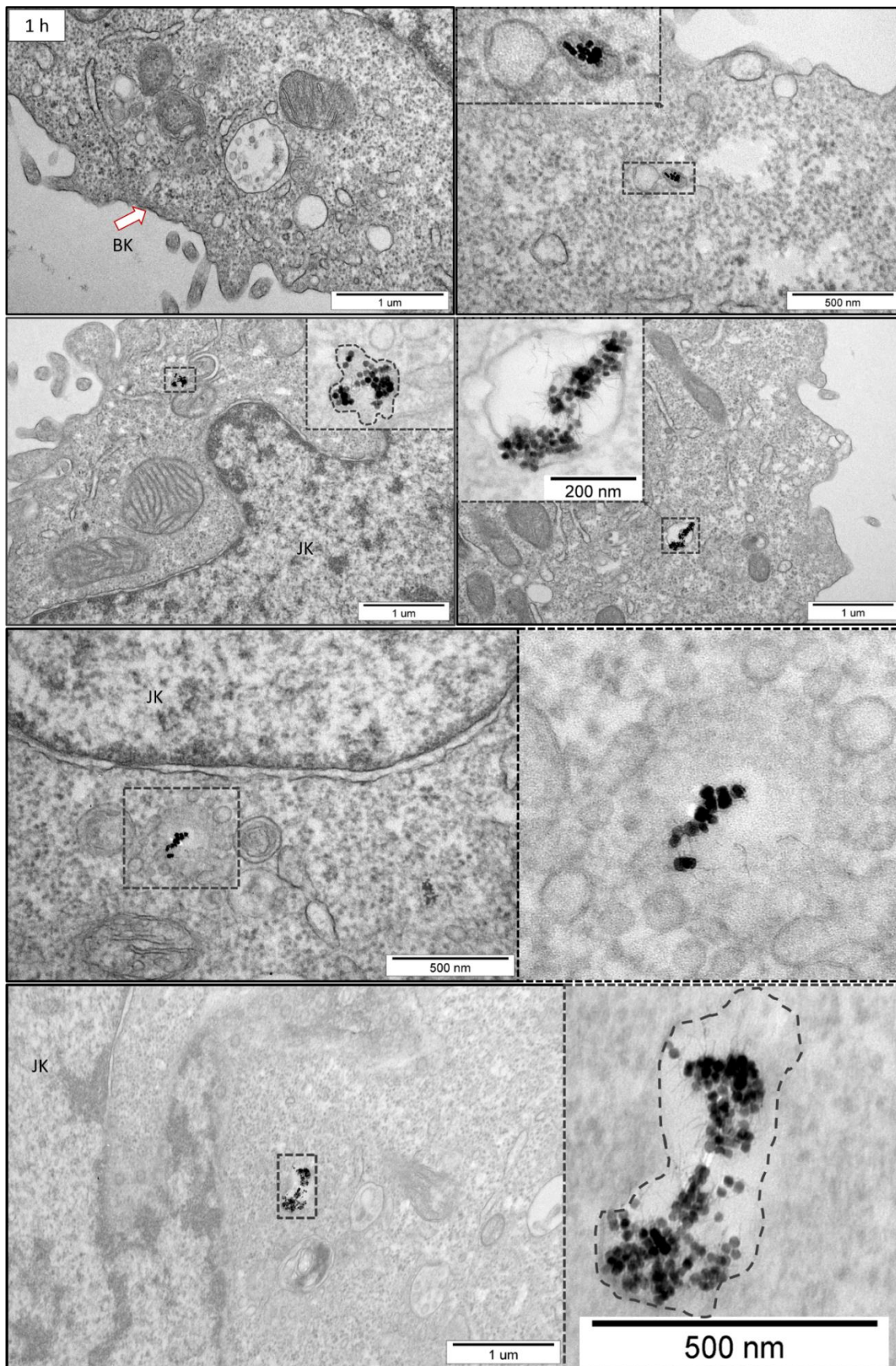
Wykazano, że do osiągnięcia efektywnej internalizacji nie jest konieczna długotrwała (tj. 24-godzinna) ekspozycja na nanocząstki. Dlatego, aby szczegółowo określić mechanizmy internalizacji dalsze obserwacje prowadzono po 30 minutowej, 1- i 2-godzinnej ekspozycji komórek ($1 \mu\text{g}/10^5$ komórek) na nanocząstki. Już po 30 minutach od podania nanocząstek do hodowli, wykrywano ich obecność w komórkach HeLa (**Rycina 33**). Po tym czasie, UCNPs znajdowały się w różnych miejscach w cytoplazmie komórki (przy błonie komórkowej oraz

w głębi cytoplazmy, w okolicy jądra komórkowego), co wskazuje, że ich internalizacja rozpoczynała się już od momentu podania do pożywki hodowlanej i zachodziła w sposób nieprzerwany.

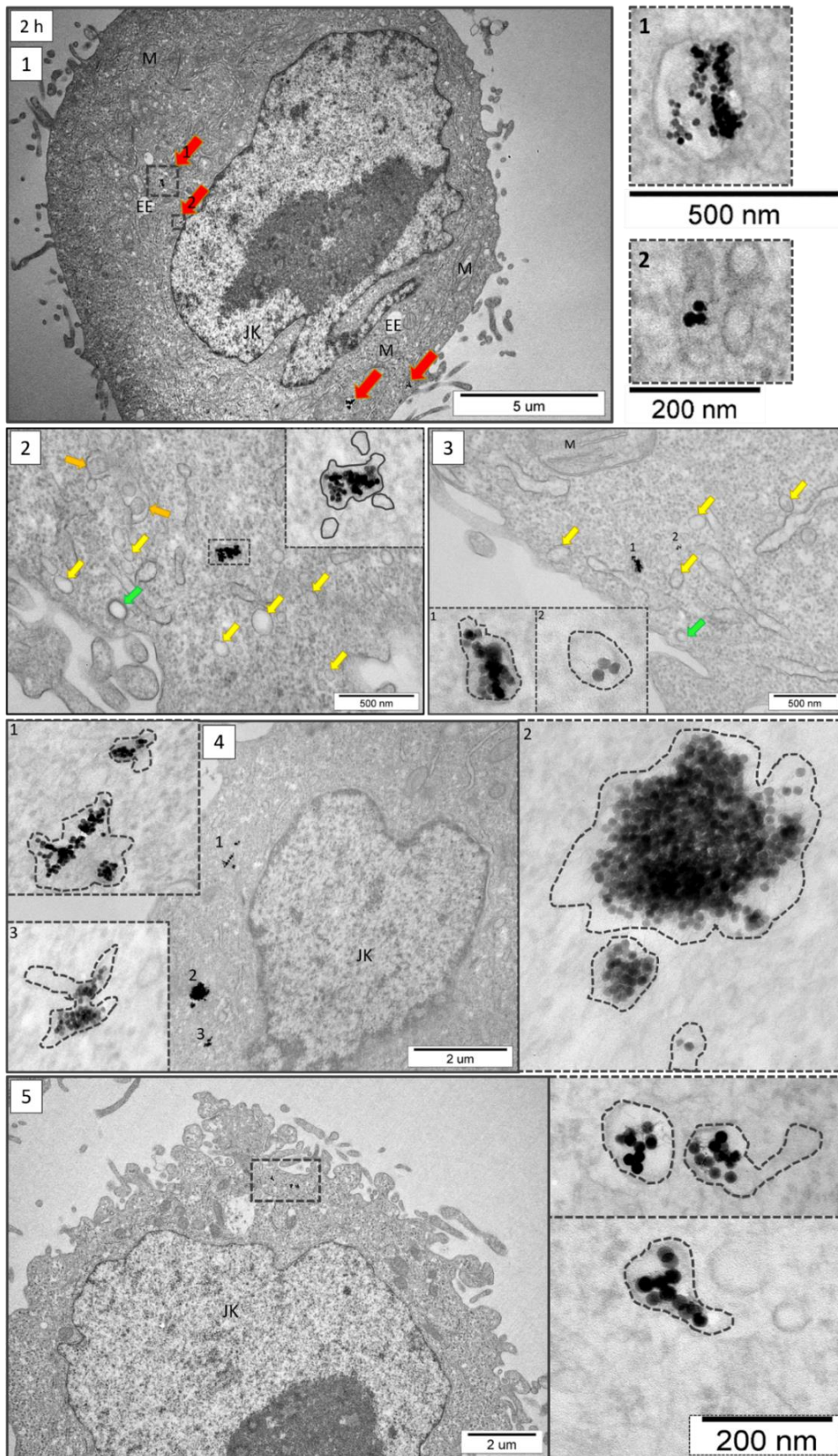


Rycina 33. Panel przedstawiający wybrane elektronogramy komórek kontrolnych HeLa po 30 minutach inkubacji z 1 µg/ml nanocząstek. Agregaty nanocząstek w pęcherzykach obrysowane ciemnoszarą przerywaną linią.

Po 1-godzinnej inkubacji, obserwowano większą liczbę zinternalizowanych UCNPów oraz liczne zagłębienia w błonie komórkowej, które tworzyły głównie pęcherzyki bez klatryny (**Rycina 34**). Natomiast, po 2-godzinnej inkubacji komórek z UCNPami (**Rycina 35**) obserwowano również liczne pęcherzyki z klatryną.

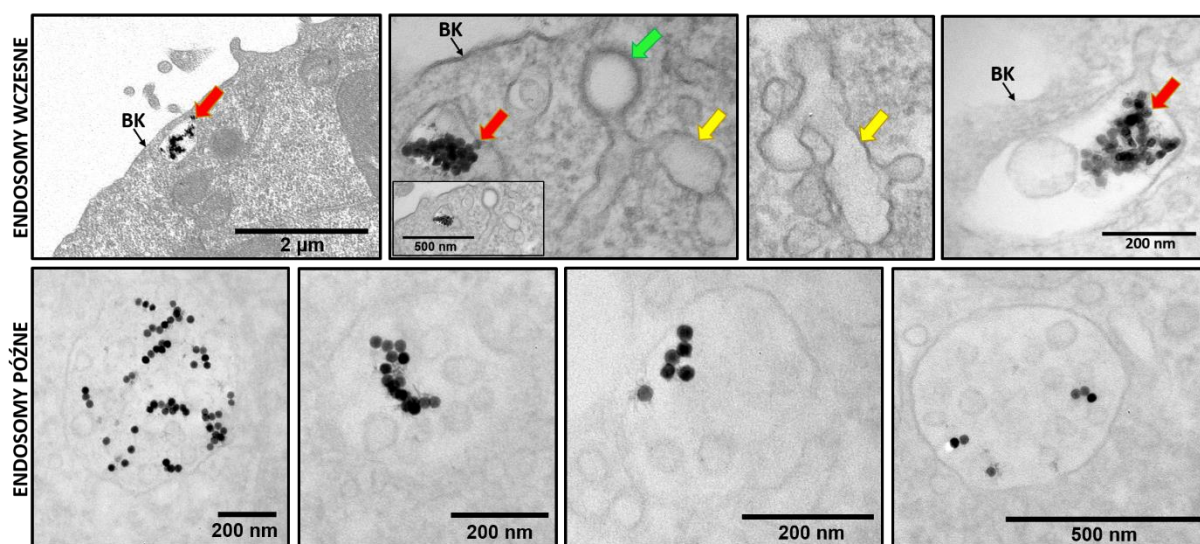


Rycina 34. Panel przedstawiający wybrane elektronogramy komórek HeLa po 1 godzinie inkubacji z $1\mu\text{g/ml}$ nanocząstek. Agregaty nanocząstek w pęcherzykach obrysowane ciemnoszarą przerywaną linią i we wstawkach. (1) Fragment błony komórkowej, bardzo duże nagromadzenie pęcherzyków endocytarnych w cytoplazmie komórki. Oznaczenia: BK – błona komórkowa, JK- jądro komórkowe.



Rycina 35. Panel przedstawiający wybrane elektronogramy komórek HeLa po 2 godzinach inkubacji z 1 µg/ml nanocząstek. Oznaczenia: UCNPs w endosomach zaznaczone obrysem przerywaną czarną linią, JK- jądro komórkowe, M - mitochondrium, EE - wczesny endosom, L - lizosom. Zielona strzałka –pęcherzyki klatrynowe, żółta strzałka - pęcherzyki endocytarne/kaweolarnie, pomarańczowa strzałka – łączące się ze sobą pęcherzyki endocytarne, czerwona strzałka - nanocząstki we wnętrzu endosomów (również zaznaczone obrysem przerywaną szarą linią).

Po 2-godzinnej inkubacji komórek HeLa z nanocząstkami, obserwowano je głównie w endosomach wczesnych oraz endosomach późnych. Na **Rycinie 36** zostały zaprezentowane elektronogramy przedstawiające nanocząstki zgromadzone we wnętrzu endosomów wczesnych, znajdujących się pod błoną komórkową oraz we wnętrzu endosomów późnych wraz z licznymi pęcherzykami transportowymi. W rejonie błony komórkowej obserwowano liczne pęcherzyki endocytarne ulegające fuzji w endosomy wczesne.

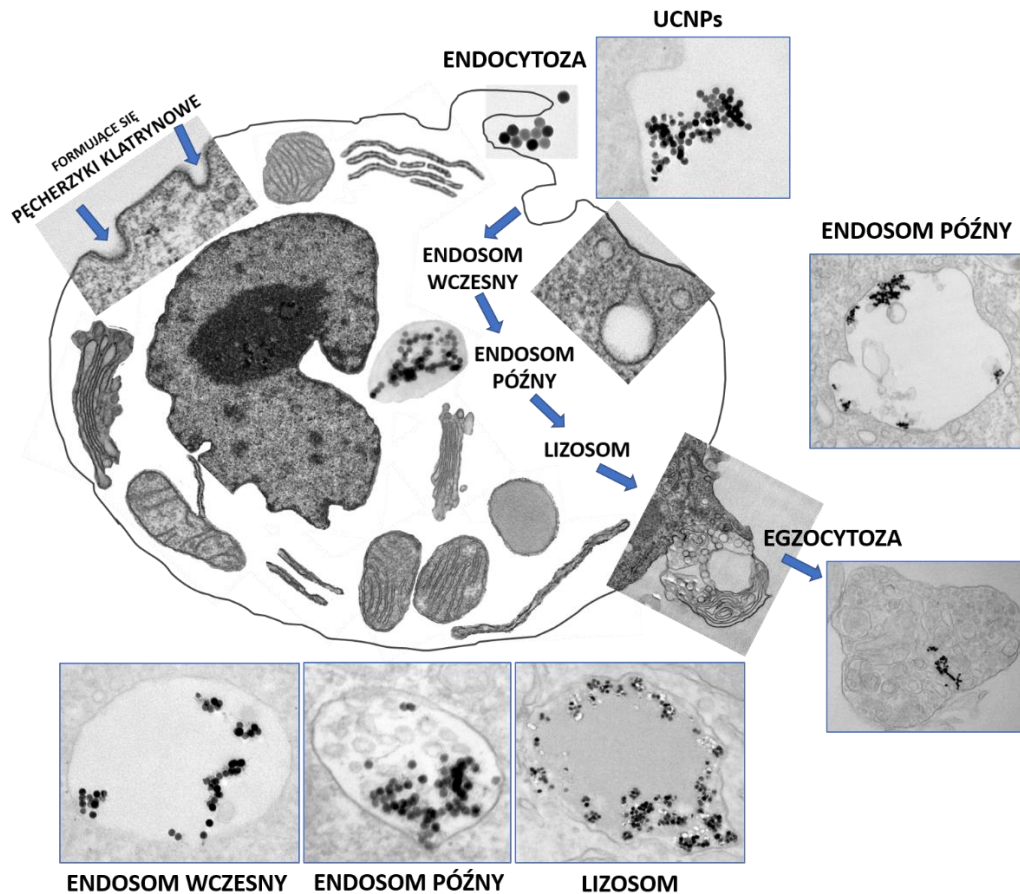


Rycina 36. Wybrane elektronogramy przedstawiające kolokalizację nanocząstek ($1\mu\text{g/ml}$) z endosomami wczesnymi oraz endosomami późnymi po 2 godzinach inkubacji z komórkami HeLa. Oznaczenia: BK - błona komórkowa, czerwona strzałka - UCNPs w endosomach wczesnych, zielona strzałka - pęcherzyk klatrynowy, żółta strzałka - pęcherzyki endocytarne ulegające fuzji w endosomy wczesne.

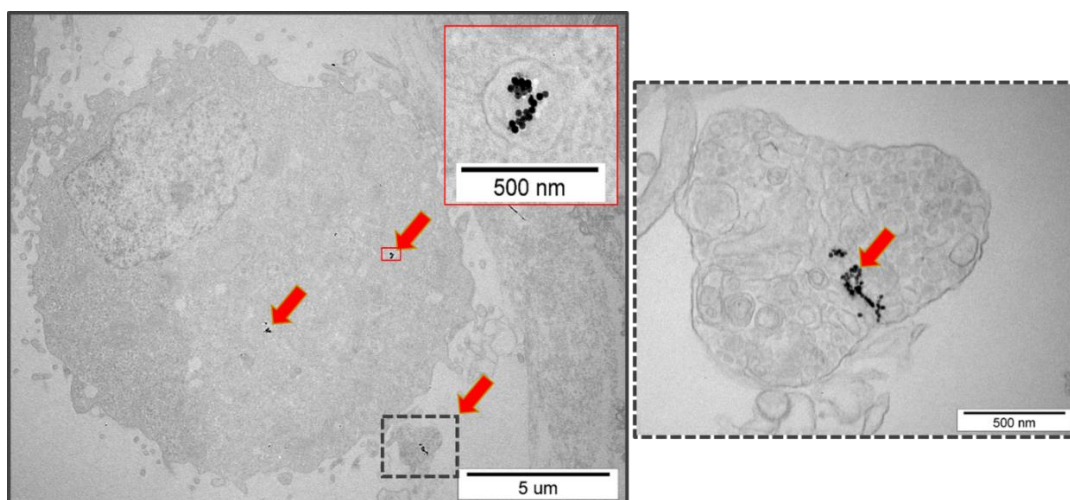
Analiza TEM dostarczyła wielu bardzo cennych informacji na temat zachowania UCNPs w komórkach. Potwierdzono ich obecność i określono lokalizację w komórkach. Nie towarzyszyły temu negatywne zmiany w morfologii komórek ani nanocząstek.

Podsumowując, zweryfikowano schemat w jaki sposób nanocząstki $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ oddziaływały z komórkami HeLa. Transport wewnątrzkomórkowy zinternalizowanych UCNPs przebiegał zgodnie ze schematem zaproponowanym na **Rycinie 37**. Najpierw, podane do pożywki hodowlanej UCNPs grupowały się przy powierzchni błony komórkowej. W tych obszarach błony komórkowej pod wpływem ich obecności formowane były liczne zagłębienia (tzw. dołki). Następnie te fragmenty błony komórkowej (z klatryną bądź bez klatryny, od strony cytoplazmatycznej) wpuklały się do wnętrza cytoplazmy komórki tworząc pęcherzyki endocytarne, które zawierały zinternalizowane UCNPs. Kolejne pęcherzyki ulegały fuzji włączając się do endosomów wczesnych znajdujących się tuż pod błoną komórkową. Endosomy wczesne transportowały UCNPs w głąb cytoplazmy, w okolicy okołojądrową. W tym rejonie endosomy wczesne ulegały stopniowemu przekształceniu

(dojrzewaniu) w endosomy późne lub łączyły się z endosomami późnymi. Endosomy późne łączyły się kolejno z lizosomami (w endolizosomy lub autofagolizosomy) przekazując im swoją zawartość. Po tym etapie, nanocząstki były transportowane do błony komórkowej i usuwane z komórek HeLa na drodze egzocytozy (*Rycina 38*).

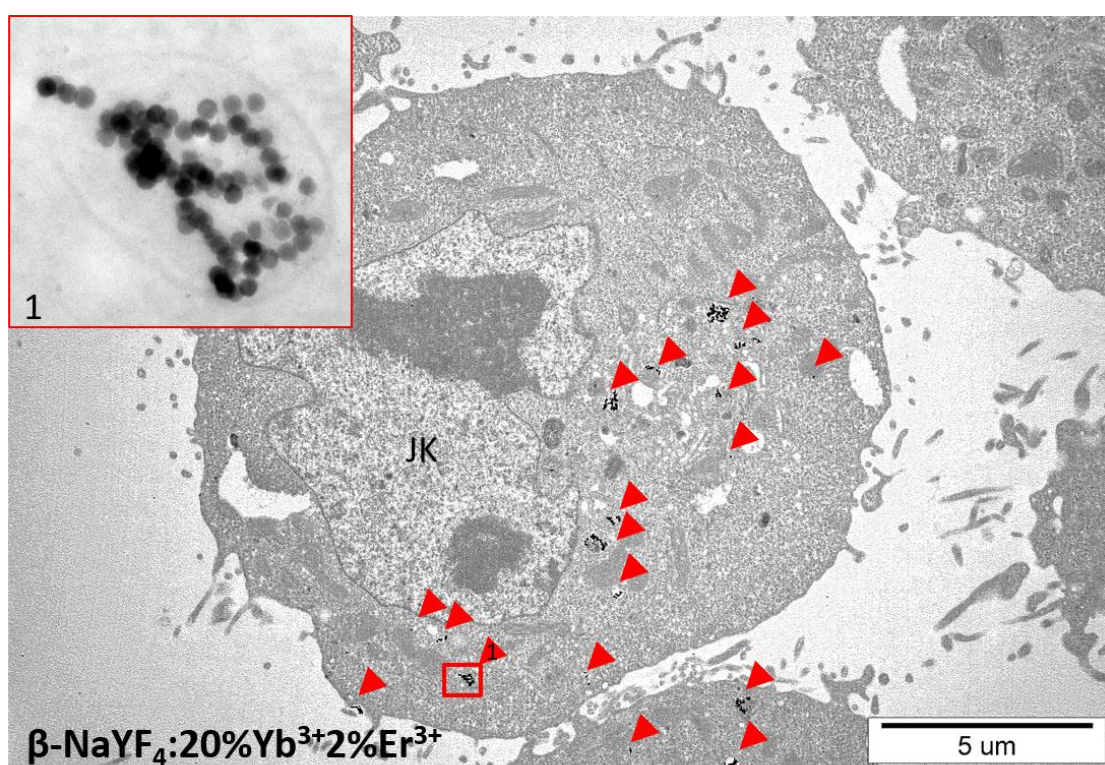


Rycina 37. Uproszczony schemat przedstawiający oddziaływanie nanocząstek z komórkami HeLa.



Rycina 38. Elektronogramy przedstawiające komórki HeLa po 24 godzinach inkubacji z 1 µg/ml nanocząstek. UCNPs we wnętrzu endosomu (wstawka z czerwonym obrzeżem). Pęcherzyk zawierający nanocząstki, który został usunięty z komórki na drodze egzocytozy (szary obris przerywaną linią). Nanocząstki zaznaczone są czerwonymi strzałkami.

Wzmocniona aktywność błony komórkowej, charakteryzująca się obecnością licznych wpukleń oraz licznie występujących w jej sąsiedztwie pęcherzyków endocytarnych (często pokrytych klatryną), a także lokalizacja nanocząstek w strukturach endosomów i w lizosomach, skłoniła mnie do prowadzenia dalszych badań nad mechanizmami internalizacji nanocząstek w komórkach. Zgodnie ze schematem (*podrozdział 3.4.10.*), komórki HeLa eksponowano przez 30 minut na inhibitory procesu endocytozy i w niskiej temperaturze (4°C), a następnie inkubowano przez 2 godziny z 1 µg/ml nanocząstek lub poddano działaniu niskiej temperatury w obecności nanocząstek przez 1 godzinę. W obrazie mikroskopowo-elektronowym komórek inkubowanych tylko z nanocząstkami, potwierdzono ich obecność w licznych strukturach endosomów (*Rycina 39*).

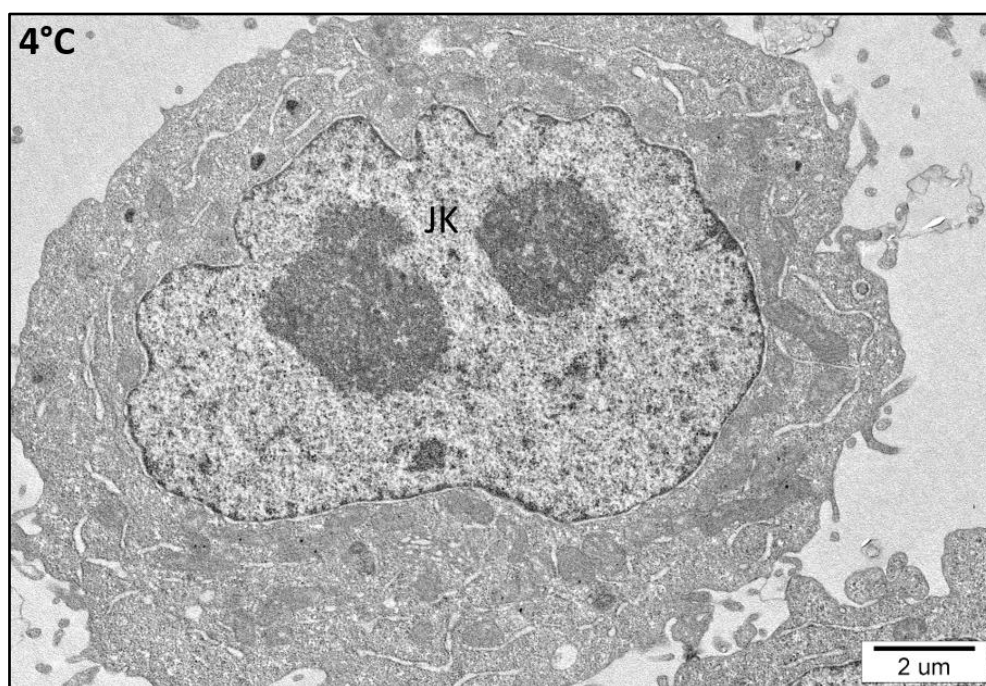


Rycina 39. Elektronogram przedstawiający komórki HeLa po 2 godzinach inkubacji z 1 µg/ml nanocząstek. Nanocząstki znajdujące się w endosomach zaznaczono czerwonymi strzałkami. JK - jądro komórkowe.

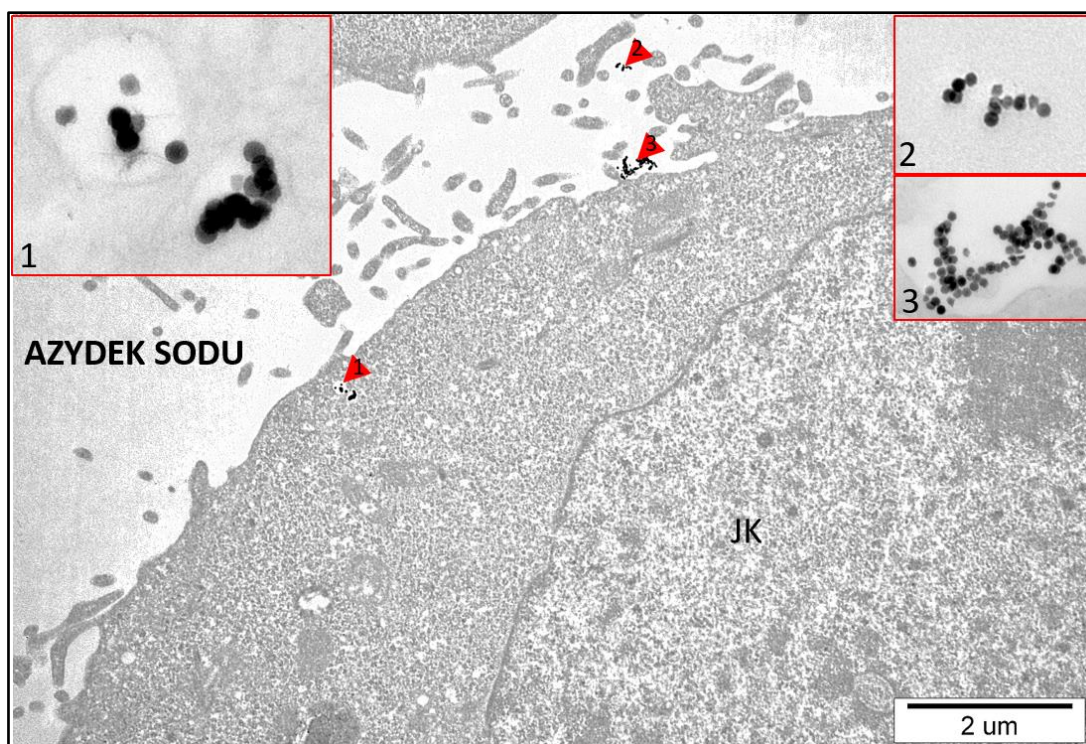
W zaprezentowanych elektronogramach wykazano, że obecność każdego z zastosowanych inhibitorów obniżała internalizację UCNPs w porównaniu do kontroli, którą stanowiły komórki z UCNPs bez obecności inhibitora (*Ryciny 40-47*). Przeanalizowanych zostało kilkanaście elektronogramów, zebranych dla każdej z co najmniej 10 komórek, w każdym wariancie eksperymentalnym. Na tej podstawie wytypowano jeden reprezentatywny obraz. Technika mikroskopii elektronowej nie jest jednak metodą ilościową, która pozwoliłaby na dokładne określenie liczby zinternalizowanych nanocząstek. Niemniej jednak, zebrane obserwacje dostarczyły cennych informacji na temat zachowania UCNPs pod wpływem

działania określonych inhibitorów w komórce. Nie potwierdzono również zmian w obrazie morfologicznym komórek.

Największe zahamowanie procesu endocytozy obserwowano po inkubacji komórek z nanocząstkami w niskiej temperaturze przez 1 godzinę (UCNPs praktycznie nie obserwowano we wnętrzu komórek), co wyraźnie wskazuje, że pobieranie nanocząstek w komórkach HeLa było procesem zależnym od energii (*Rycina 40*). Podobnie, internalizacja UCNPs po 30-minutowej inkubacji z azydkiem sodu również była znacznie obniżona w porównaniu do innych inhibitorów odpowiedzialnych za blokowanie endocytozy receptorowej (endocytoza klatrynowa, kaweolarna). Proces endocytozy mógł przebiegać bez nakładu energii, nawet w niskiej temperaturze 4°C. Natomiast transport pęcherzyków endocytarnych z zinternalizowanymi nanocząstkami w głąb cytoplazmy był już procesem zależnym od energii i wymagał obecności ATP. Potwierdza to obecność zinternalizowanych UCNPs w pęcherzykach endocytarnych bardzo blisko błony komórkowej lub UCNPs, które znajdują się w formującym się zagłębieniu błony komórkowej, ale jeszcze nie zostały zinternalizowane do wnętrza komórek (*Rycina 41*, wstawka 3). Wpływ niskiej temperatury (1 h) hamował internalizację UCNPs w większym stopniu, niż działanie chemicznego inhibitora azydku sodu przez 30 min przed podaniem UCNPs. Niemniej jednak, 30-minutowa inkubacja komórek w 4°C, a następnie 2-godzinna inkubacja z UCNPs nie wpływały hamująco na proces ich internalizacji.

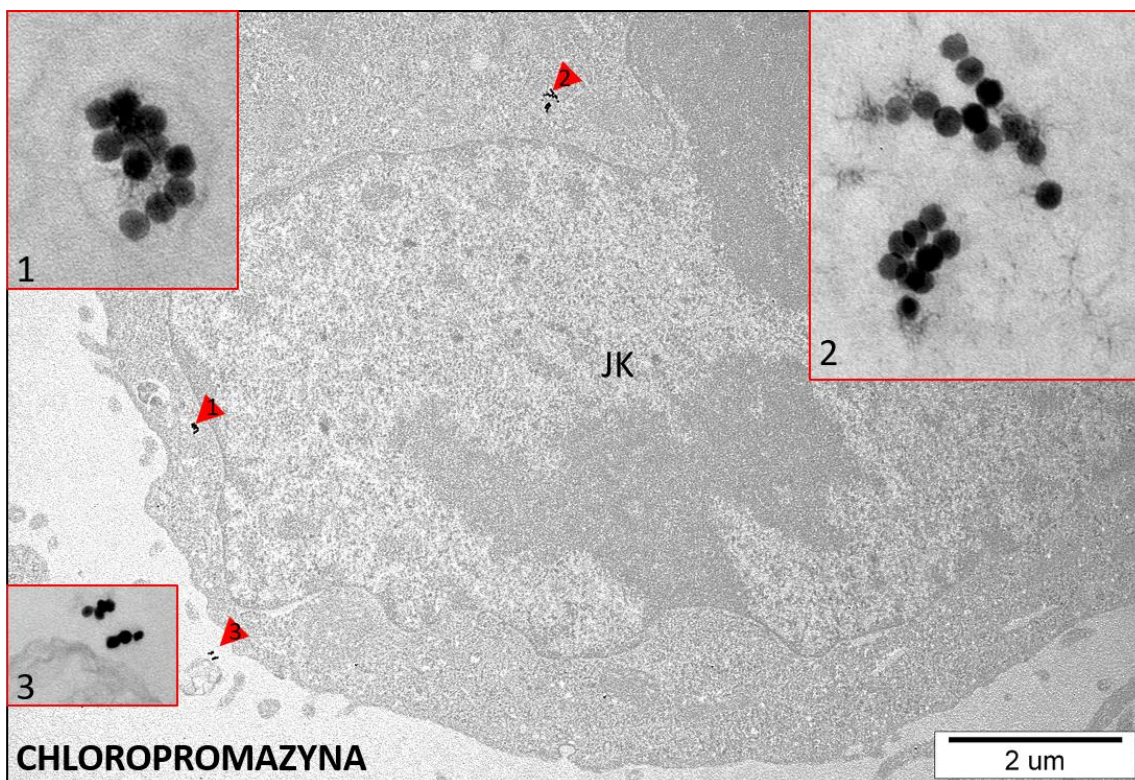


Rycina 40. Elektronogram przedstawiający komórkę HeLa po 1 godzinie inkubacji z 1 µg/ml nanocząstek w niskiej temperaturze. JK - jądro komórkowe.

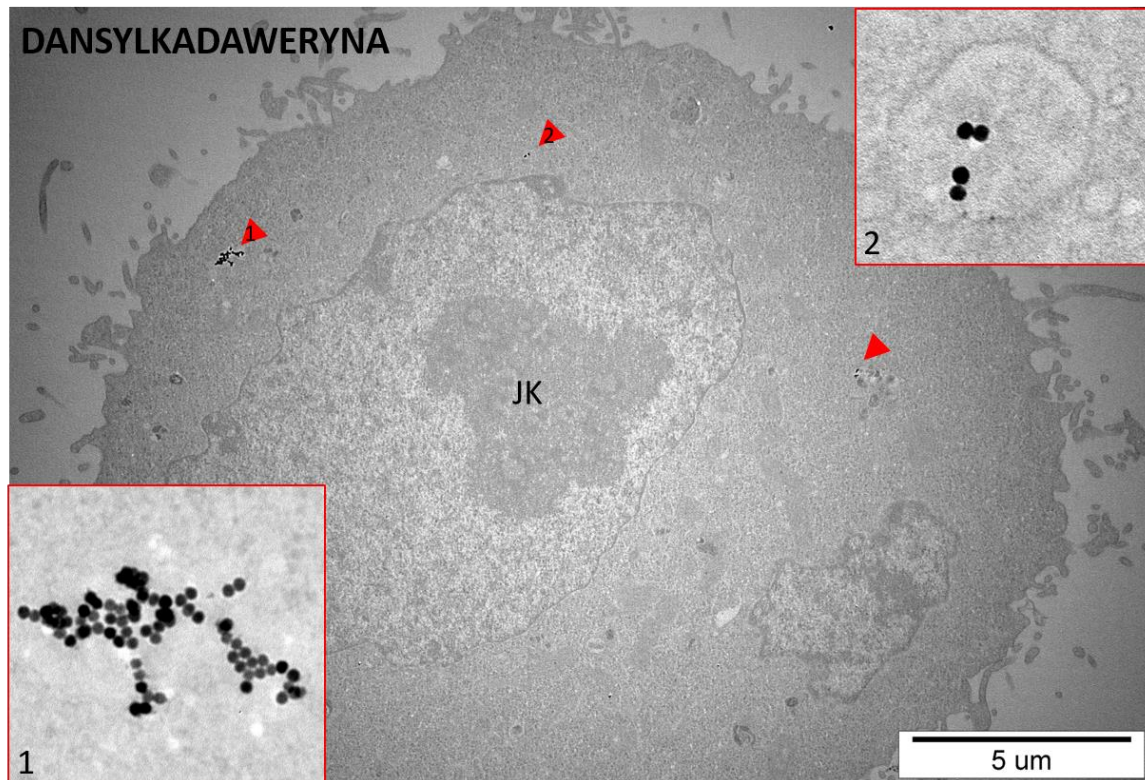


Rycina 41. Elektronogram przedstawiający komórkę HeLa po 30 minutach inkubacji z roztworem azydku sodu, a następnie przez 2 godziny z 1 $\mu\text{g/ml}$ nanocząstek. Nanocząstki zaznaczono czerwonymi strzałkami. Oznaczenia: wstawka 1 – UCNPs znajdujące się w endosomach wczesnych, wstawka 2- UCNPs znajdujące się przy powierzchni błony komórkowej, w formującym się zagłębieniu, wstawka 3 – UCNPs znajdujące się pomiędzy komórkami, JK- jądro komórkowe.

Ponadto, obecność nanocząstek obserwowano w komórkach ekspozycyjnych na działanie chlorpromazyny (**Rycina 42**) oraz dansylkadaweryny (**Rycina 43**), które odpowiadają za mechanizm endocytozy z udziałem klatryny. W obu przypadkach, UCNPs były widoczne w endosomach w okolicy okołojądrowej. Potwierdziło to, nie do końca specyficznie działanie inhibitorów endocytozy oraz wskazało na internalizację UCNP, zachodzącą również na drodze innych mechanizmów, niezależnych od udziału klatryny. Z obserwacji wynika, że UCNPs, aby wejść do komórek mogły wykorzystywać kilka szlaków endocytarnych jednocześnie. Liczba nanocząstek obecnych w endosomach nie była tak znaczna w porównaniu z komórkami inkubowanymi z UCNP, ale bez udziału inhibitorów. Na elektronogramach można zaobserwować wyraźnie widoczne, pojedyncze nanocząstki. W obu przypadkach zahamowanie endocytozy klatrynowej przebiegało na podobnym poziomie, a wyniki obserwacji mikroskopowo-elektronowych są zbieżne ze sobą. Ciężko znaleźć różnice, który inhibitor działał bardziej specyficznie na komórki i w większym stopniu zahamował internalizację UCNP.

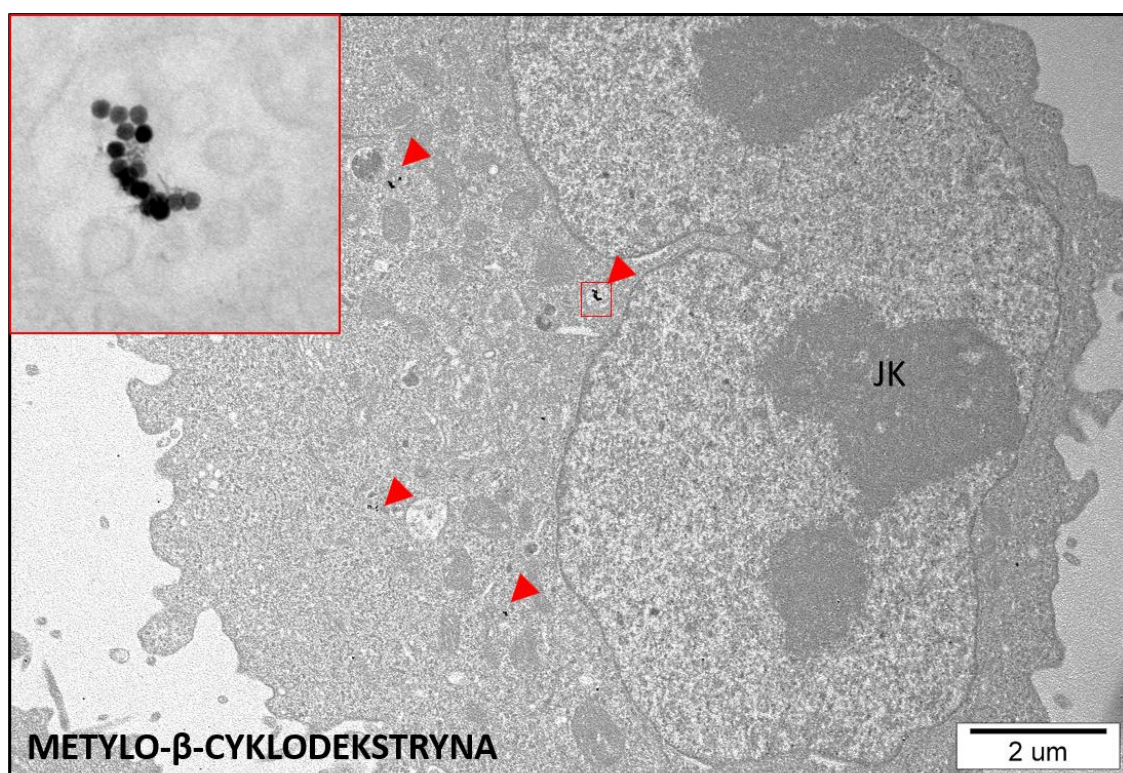


Rycina 42. Elektronogram przedstawiający komórkę HeLa po 30 minutach inkubacji z chlorpromazyną, a następnie przez 2 godziny z 1 µg/ml nanocząstek. Nanocząstki zaznaczono czerwonymi strzałkami. Oznaczenia: wstawka 1 i 2 - UCNPs znajdujące się w endosomach w okolicy okołojądrowej, wstawka 3- UCNPs poza komórką, JK - jądro komórkowe.

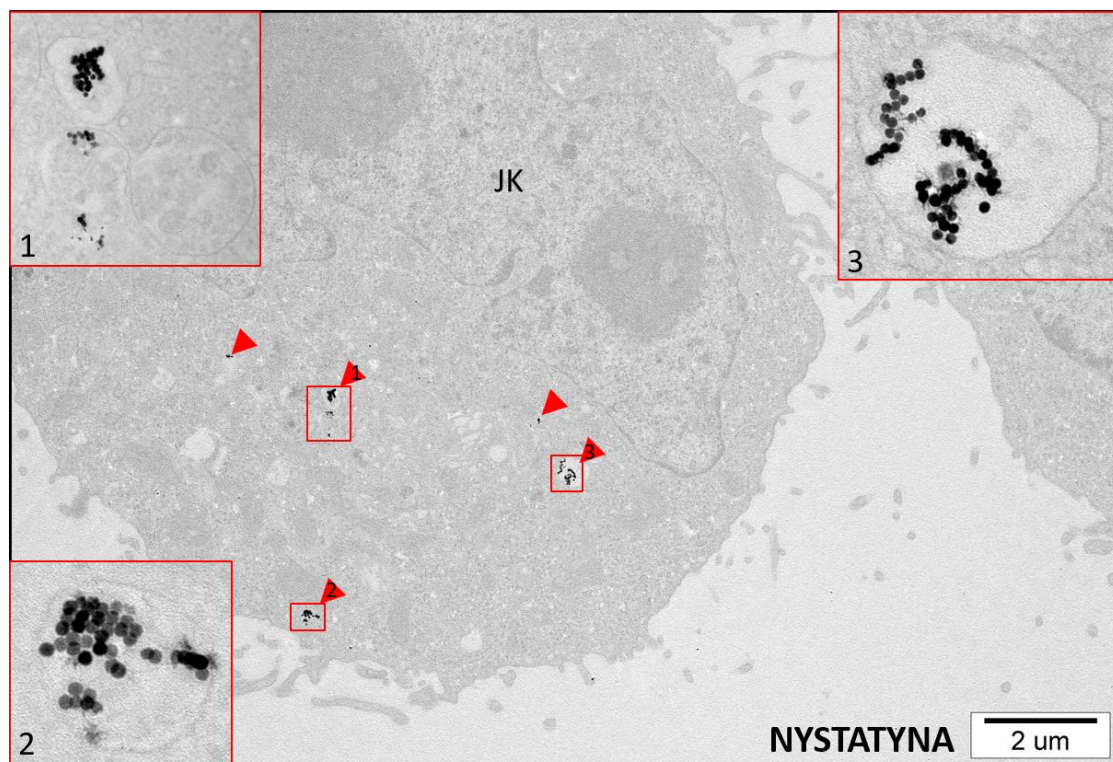


Rycina 43. Elektronogram przedstawiający komórkę HeLa po 30 minutach inkubacji z dansylkadaweryną, a następnie przez 2 godziny z 1 µg/ml nanocząstek. Nanocząstki znajdujące się w endosomach zaznaczono czerwonymi strzałkami. JK - jądro komórkowe.

Zahamowanie endocytozy za pośrednictwem kaweoli z udziałem metylo- β -cyklodekstryny i nystatyny wpłynęło na obniżenie internalizacji UCNPs. Metylo- β -cyklodekstryna w większym stopniu zahamowała pobieranie komórek, a w endosomach widoczne były pojedyncze UCNPs lub ich niewielkie skupiska (**Rycina 44**). Działanie nystatyny było mniej specyficzne. Przemawia za tym większa liczba UCNPs obecnych w pęcherzykach endocytarnych i endosomach wczesnych. Natomiast obecność endosomów wczesnych świadczy o nadal zachodzącym procesie endocytozy (**Rycina 45**).



Rycina 44. Elektronogram przedstawiający komórkę HeLa po 30 minutach inkubacji z metylo- β -cyklodekstryną, a następnie przez 2 godziny z 1 $\mu\text{g/ml}$ nanocząstek. Nanocząstki znajdujące się w endosomach zaznaczono czerwonymi strzałkami. Wstawka zaznaczona czerwonym obrysem przedstawia UCNPs w endosomie w okolicy okołojądrowej, JK - jądro komórkowe.

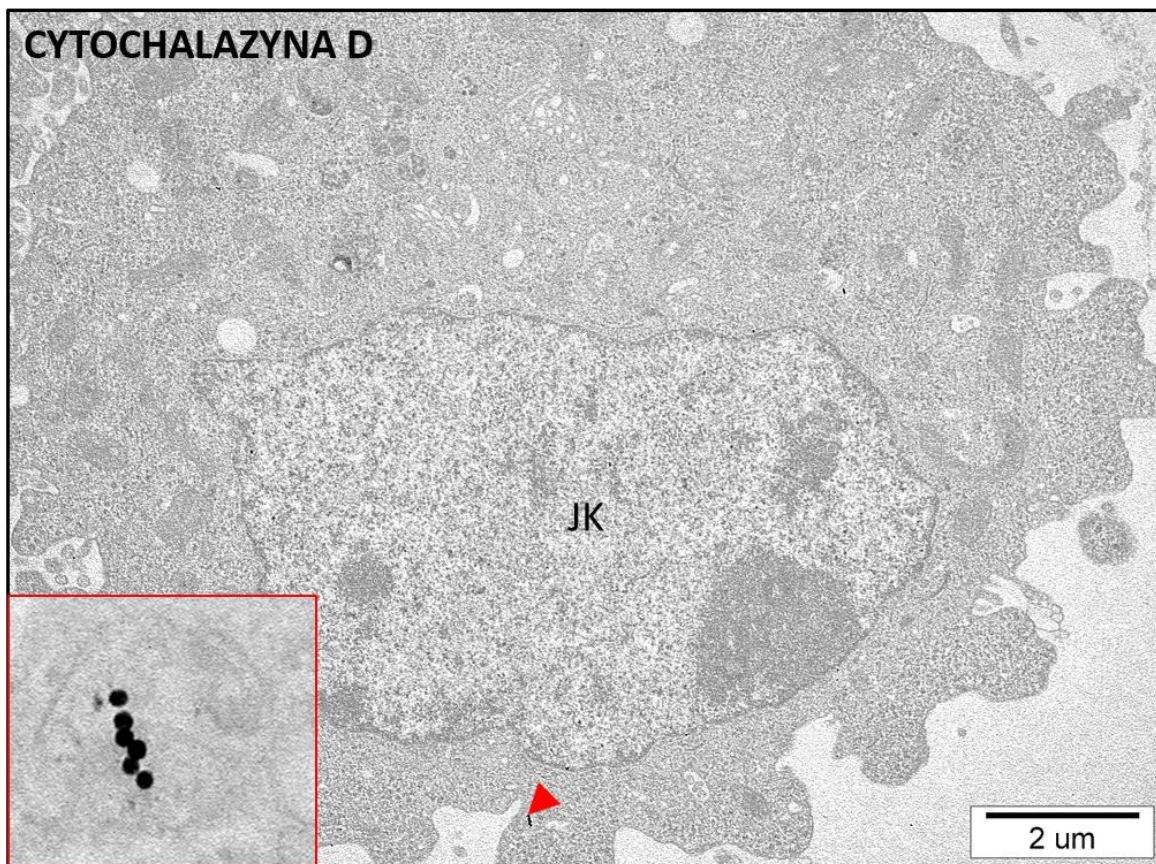


Rycina 45. Elektronogram przedstawiający komórkę HeLa po 30 minutach inkubacji z nystatyną, a następnie przez 2 godziny z 1 $\mu\text{g/ml}$ nanocząstek. Nanocząstki znajdujące się w endosomach zaznaczono czerwonymi strzałkami. JK - jądro komórkowe.

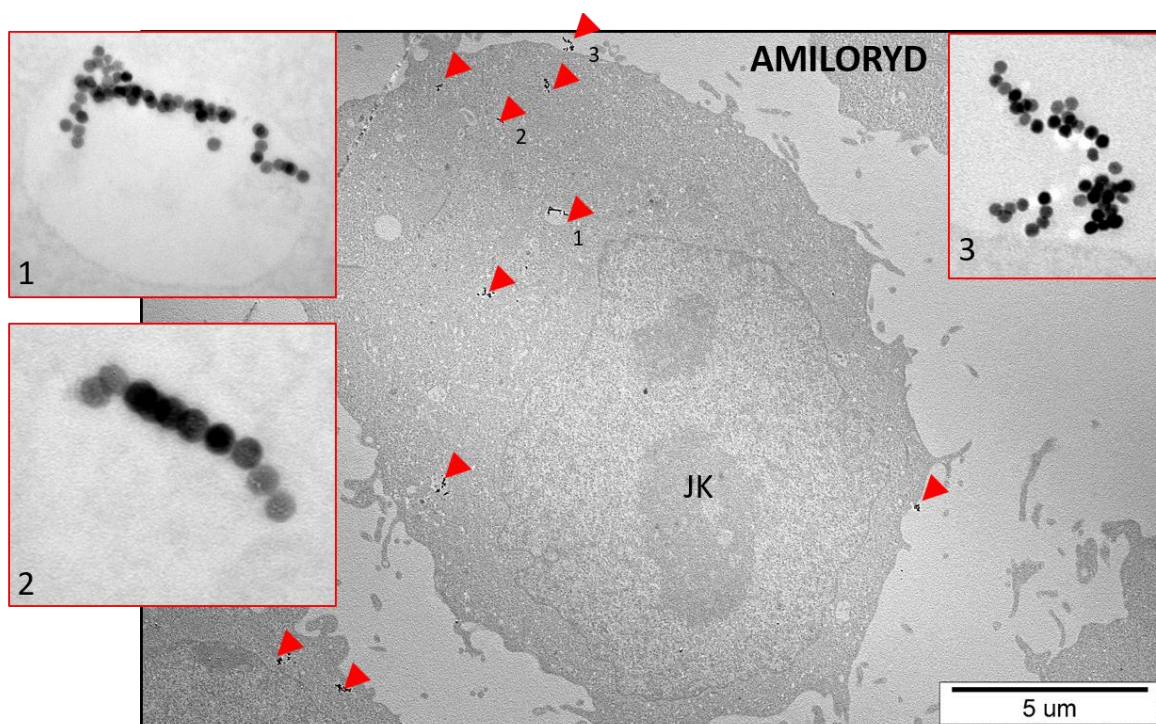
Analiza morfologiczna szlaków endocytarnych związanych z makropinocytozą wykazała znaczne obniżenie internalizacji UCNPs z użyciem cytochalazyny D. UCNPs były obecne w endosomie, znajdującym się przy błonie komórkowej. We wnętrzu zaobserwowanego endosomu znajdowało się zaledwie kilka UCNPs (**Rycina 46**).

Z dalszych obserwacji wynika, że amiloryd nie miał znaczącego wpływu na obniżenie internalizacji UCNPs. Endosomy zawierające UCNPs były widoczne zarówno przy błonie komórkowej, jak i w głębi cytoplazmy, a także okolicach jądra komórkowego (**Rycina 47**).

Interesującą obserwacją, po działaniu obu inhibitorów jest bardzo uporządkowane ułożenie w jednej linii UCNPs, znajdujących się we wnętrzu endosomów.

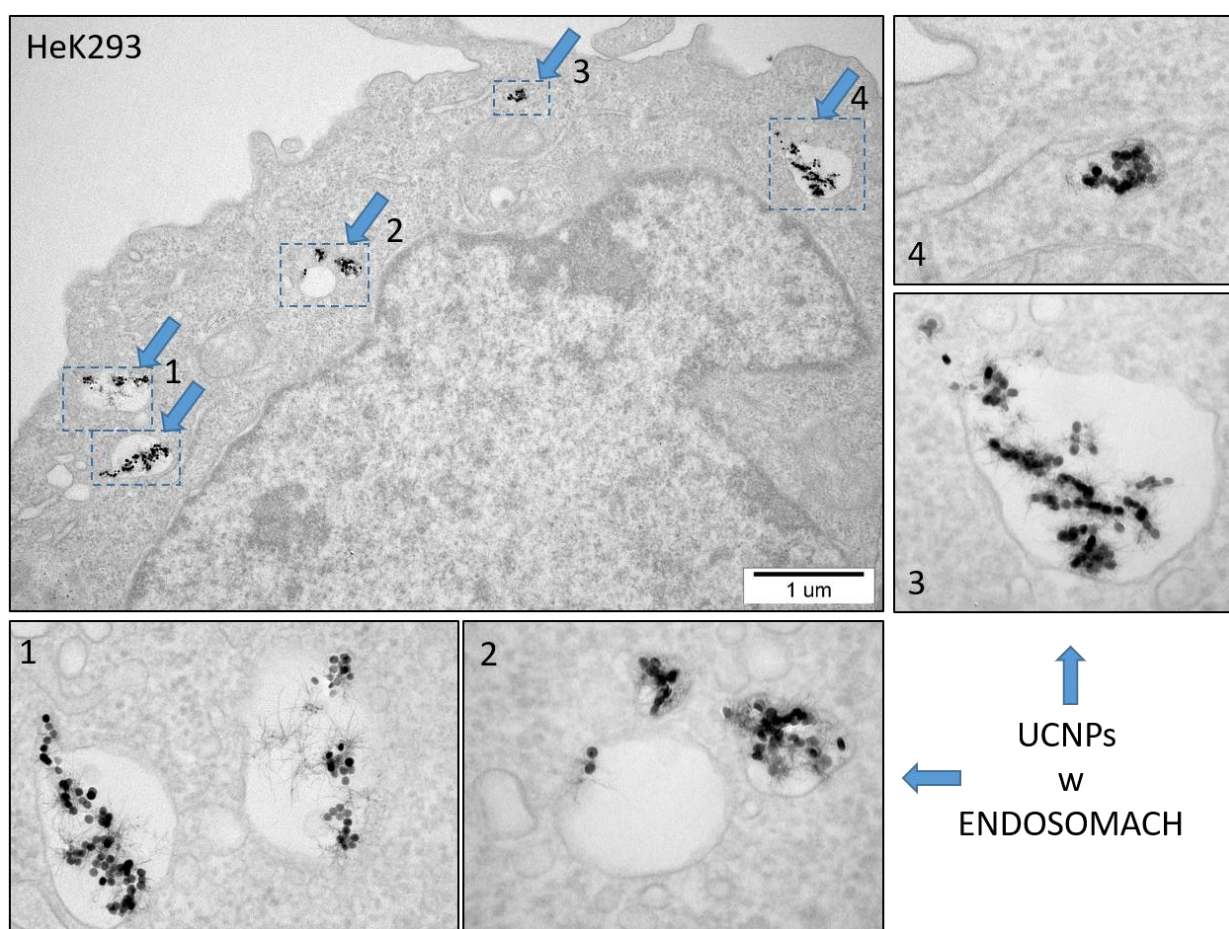


Rycina 46. Elektronogram przedstawiający komórkę HeLa po 30 minutach inkubacji z cytochalazyną D, a następnie przez 2 godziny z 1 μg/ml nanocząstek. Nanocząstki znajdujące się w endosomie oznaczono czerwoną strzałką oraz we wstawce. JK - jądro komórkowe.

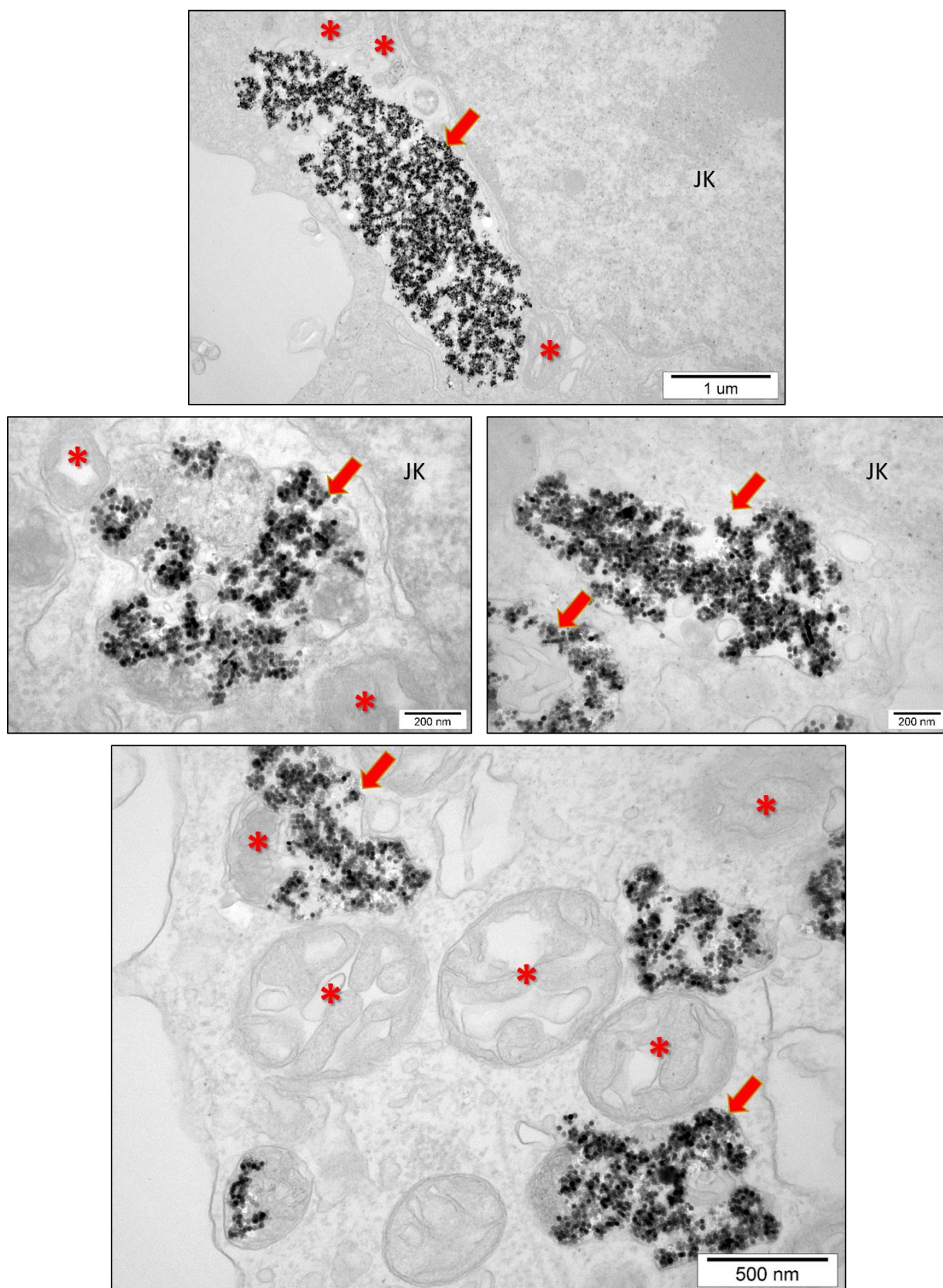


Rycina 47. Elektronogram przedstawiający komórki HeLa po 30 minutach inkubacji z amilorydem, a następnie przez 2 godziny z 1 μg/ml nanocząstek. Nanocząstki znajdujące się w endosomach oznaczono czerwonymi strzałkami. Wybrane powiększenia UCNP przedstawiono na wstawkach. JK - jądro komórkowe.

Obecność UCNP_s NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ oceniano również w komórkach prawidłowej linii HeK293. Po 2 godzinach inkubacji z 1 µg/ml UCNP_s NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺, elektronogramy potwierdziły ich efektywną internalizację w komórkach. Nie obserwowano zmian w morfologii komórek wywołanych obecnością nanocząstek (**Rycina 48**). Podanie bardzo wysokiego stężenia UCNP_s, wynoszącego 100 µg/ml, skutkowało przeładowaniem komórek nanocząstkami (ogromne autofagolizosomy) i wywoływało zmiany ultrastrukturalne w komórkach HeK293. Negatywne zmiany dotyczyły głównie morfologii mitochondriów, wskazując na zachodzący proces ich degeneracji pod wpływem obecności UCNP_s po 24 godzinach w komórkach (**Rycina 49**).

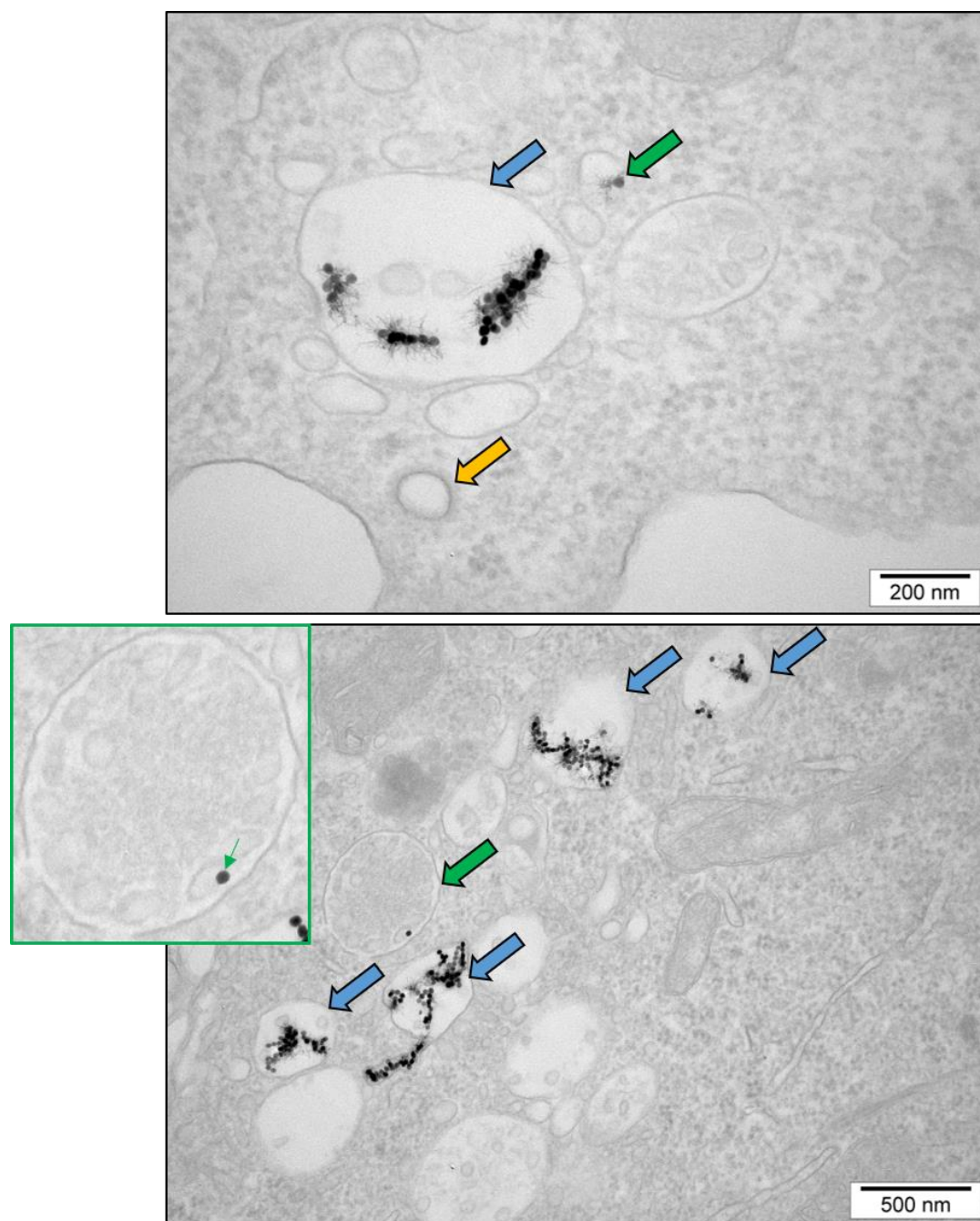


Rycina 48. Elektronogramy przedstawiające komórki Hek293 po 2 godzinach inkubacji z 1 µg/ml nanocząstek. Nanocząstki znajdujące się w endosomach zaznaczono niebieskim obrysem i strzałkami (oraz na wstawkach na większym powiększeniu).



Rycina 49. Elektronogramy przedstawiające komórki Hek293 po 24 godzinach inkubacji z 100 µg/ml nanocząstek. Nanocząstki znajdujące się w autofagolizosomach zaznaczono czerwonymi strzałkami. Widoczne zmiany ultrastrukturalne w mitochondriach (zaznaczone *), ulegających degeneracji.

Potwierdzono również wewnątrzkomórkową lokalizację UCNPs, w endosomach wczesnych i endosomach późnych. Internalizacja nanocząstek podobnie jak w komórkach HeLa, odbywała się na drodze procesu endocytozy, o czym świadczy obecność UCNPs w strukturach endosomów. W sąsiedztwie endosomów zawierających UCNPs, występowały liczne pęcherzyki endocytarne oraz pęcherzyki pokryte klatryną, co może wskazywać na udział mechanizmu endocytozy zależnej od klatryny w pobieraniu nanocząstek przez komórki HeK293 (*Rycina 50*).

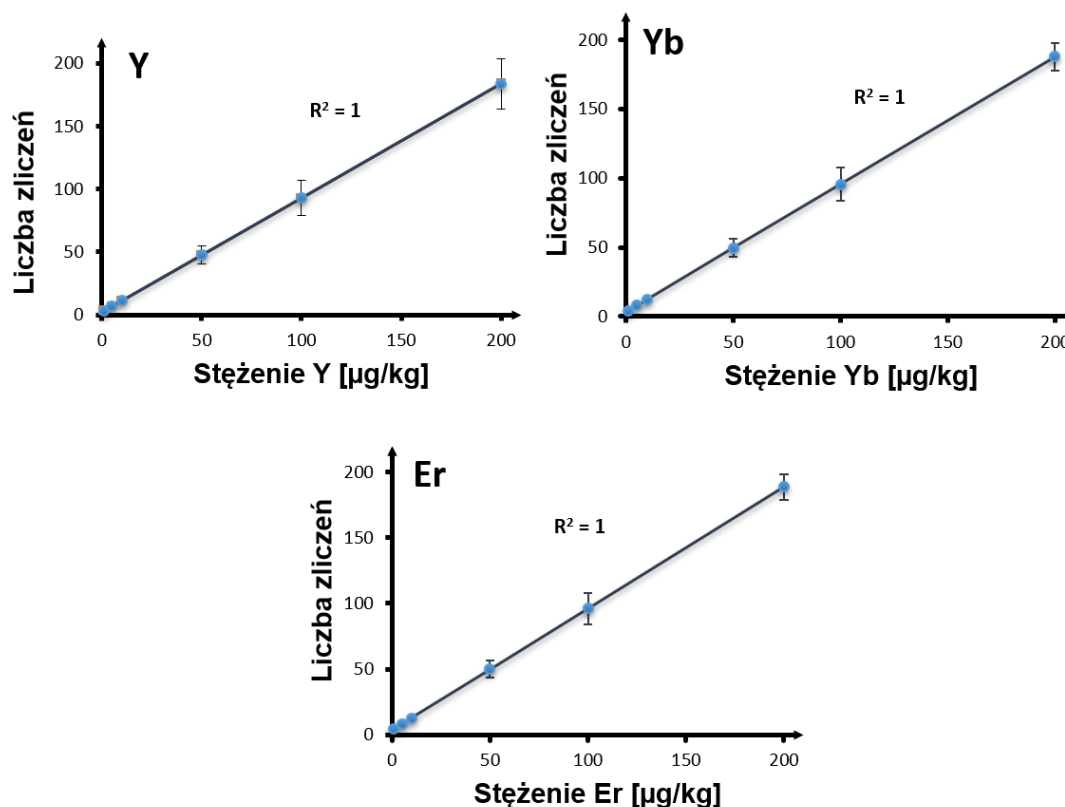


Rycina 50. Elektronogramy przedstawiające komórki Hek293 po 2 godzinach inkubacji z 1 µg/ml nanocząstek oraz ich wewnątrzkomórkową kolokalizację z endosomami wczesnymi (zaznaczone niebieską strzałką) oraz z endosomami późnymi (zaznaczone zieloną strzałką i zielonym obrysem na wstawce). Pęcherzyk endocytarny pokryty klatryną zaznaczono żółtą strzałką.

4.2.1.3. Wpływ inhibitorów endocytozy na efektywność procesu internalizacji UCNP's na podstawie spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie

Zawartość UCNP's $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ w komórkach HeLa (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ UCNP's podany na 100 000 komórek) eksponowanych na wybrane inhibitory endocytozy oznaczano ilościowo techniką ICP-MS. Uzyskane niskie wartości granic wykrywalności dla wszystkich oznaczanych pierwiastków umożliwiły ich oznaczenie na poziomie śladowym. Granica wykrywalności dla itru wynosiła $^{89}\text{Y} = 0,032$, dla iterbu $^{172}\text{Yb} = 0,029$ i $^{174}\text{Yb} = 0,028$ oraz dla erbu $^{166}\text{Er} = 0,029$ i $^{167}\text{Er} = 0,027$ [$\mu\text{g}/\text{kg}$].

Sporządzono krzywe wzorcowe dla poszczególnych pierwiastków poprzez wyznaczenie zależności pomiędzy powierzchnią pików chromatograficznych dla danej substancji, a jej stężeniem w próbce wprowadzanej do urządzenia pomiarowego (*Rycina 51*).



Rycina 51. Krzywe wzorcowe wyznaczone dla pierwiastków Y, Yb i Er.

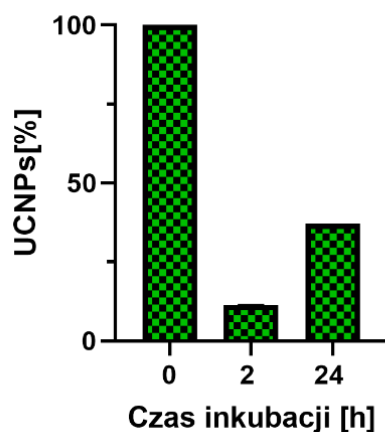
Analiza składu pierwiastkowego UCNP's $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ wykazała zgodny z przewidywaniem teoretycznym stosunek zawartości pierwiastków Y, Yb i Er (*Tabela 9*).

Tabela 9. Zawartość procentowa pierwiastków Y, Yb i Er w badanych UCNP_s NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ (dla n=8, w dwóch powtórzeniach). SD- odchylenie standardowe.

Zawartość pierwiastków w UCNP _s	Y	Yb	Er
Średnia zawartość procentowa (%)	66,9	29,6	3,4
SD (%)	9,7	2,6	0,3
Teoretyczna zawartość pierwiastków (%)	78	20	2

Następnie, określono ilość zinternalizowanych UCNP_s (%) na podstawie zawartości procentowej Y (Y był pierwiastkiem o największym stężeniu) w komórkach HeLa po 2 i 24 godzinach inkubacji z 1 μg/ml UCNP_s (wartość wyjściowa traktowana jako 100% podanych UCNP_s). Zawartość Y (%) została wyliczona w oparciu o jego masę otrzymaną w μg/kg po mineralizacji próbki (**Załącznik nr 3**).

Po 2 godzinach inkubacji komórki zinternalizowały ~11% (n=3) z podanego stężenia UCNP_s. Natomiast, po 24 godzinach obserwowano internalizację na poziomie ~37% (n=2), czyli trzykrotnie większą ilość nanocząstek w porównaniu do 2 godzin inkubacji (**Rycina 52**). Wskazuje to na nieliniowy wzrost internalizacji nanocząstek w czasie inkubacji. Z wyników można wysunąć wniosek, że nanocząstki na początku pobierane są szybko, po czym po osiągnięciu swojego maksimum wysycenia, pobierane są dużo wolniej lub wcale. W przypadku liniowego przebiegu internalizacji po 24 godzinach w komórkach znajdowałyby się prawie 100% podanych nanocząstek.

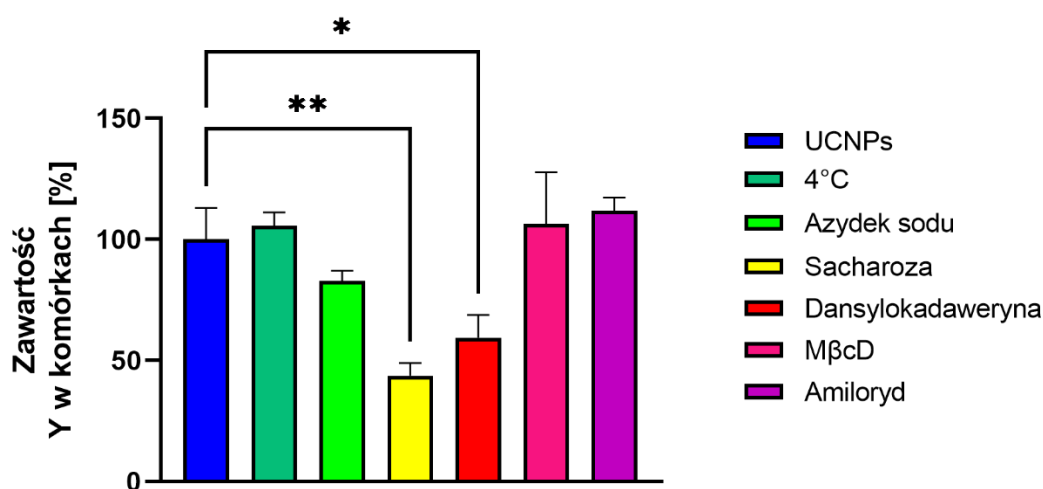


Rycina 52. Zawartość procentowa zinternalizowanych UCNP_s (na podstawie zawartości Y) po 2 i 24 godzinach inkubacji w komórkach HeLa. Czas 0 h – 100% podanych UCNP_s (1 μg/ml).

W pierwszej kolejności, przeprowadzono badania mające na celu określenie sposobu transportu UCNP_s do wnętrza komórek. Aby określić sposób pobierania (transport aktywny czy też dyfuzja bierna) hodowle komórkowe inkubowano równolegle w 37°C (normalne warunki) z dodatkiem inhibitorów lub w niskiej temperaturze (4°C) przed podaniem UCNP_s.

Internalizacja UCNPs po 30-minutowej inkubacji z wybranymi inhibitorami wykazała, że pobieranie UCNPs zostało najefektywniej zahamowane, o ponad 50% ($p < 0,01$) po ekspozycji komórek na hipertoniczny roztwór sacharozy (żółty słupek na **Rycinie 53**). Istotny statystycznie wpływ na obniżenie internalizacji UCNPs o ~40% wykazała dansylokadaweryna ($p < 0,05$), odpowiedzialna również za hamowanie transportu z udziałem klatryny (czerwony słupek na **Rycinie 53**). Stwierdzono, że 30-minutowa preinkubacja w temperaturze 4°C nie wpływała na obniżenie internalizacji UCNPs. Inkubacja z azydkiem sodu obniżyła internalizację UCNPs o ~20%, ale nie był to wynik istotny statystycznie. Ponadto, internalizacja UCNPs pod wpływem działania M β cD (endocytoza kaweolarna/usuwanie tratw lipidowych z błony komórkowej) oraz amilorydu (makropinocytoza), utrzymywała się na podobnym poziomie, jak w komórkach nietraktowanych inhibitorami (**Rycina 53**).

Wartości na wykresach przedstawiono jako % zawartości Y w komórkach HeLa eksponowanych najpierw na działanie wybranych inhibitorów endocytozy przez 30 minut, a następnie inkubowanych z 1 μ g/ml UCNPs przez 2 godziny. Kontrolę (komórki HeLa inkubowane przez 2 godziny z 1 μ g/ml) traktowano jako 100%.



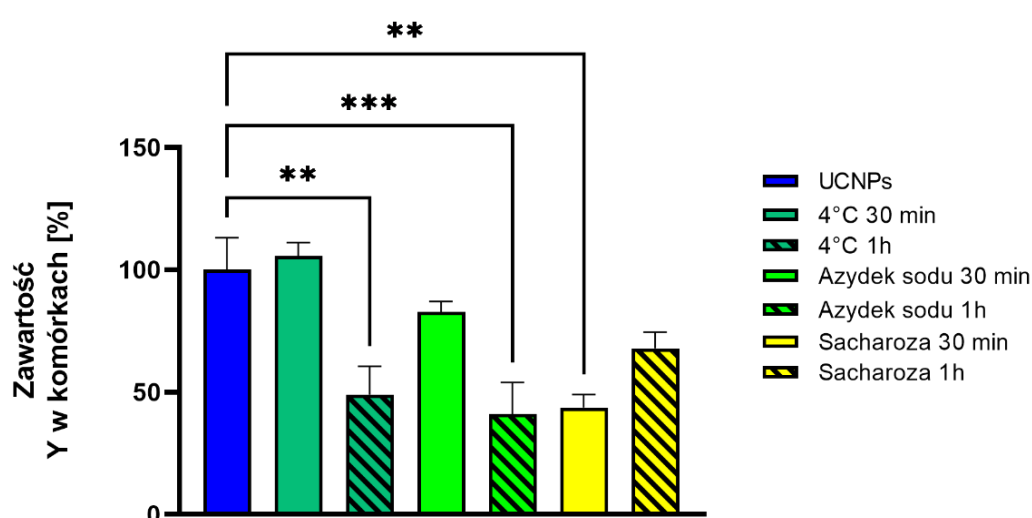
Rycina 53. Zawartość procentowa Y w komórkach eksponowanych na wybrane inhibitory endocytozy przez 30 min przed inkubacją z UCNPs. Kontrolę stanowiły komórki poddane 2-godzinnej ekspozycji na 1 μ g/ml. * - kontrola vs dansylokadaweryna ($p < 0,05$), ** - kontrola vs sacharoza ($p < 0,01$). Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism 8 przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Dunnetta'a, dla $n=3$.

Uzyskane wyniki stały się pretekstem do analizy wpływu wybranych inhibitorów, w szczególności inhibitorów zależnych od energii, po 1-godzinnej inkubacji z komórkami i UCNPs (**Rycina 54**).

Najefektywniejsze zahamowanie procesu endocytozy obserwowano w obecności roztworu azydku sodu (inhibitor metaboliczny) oraz pod wpływem działania niskiej temperatury. Po tym czasie ilość zinternalizowanych UCNPs była obniżona ponad ~50%

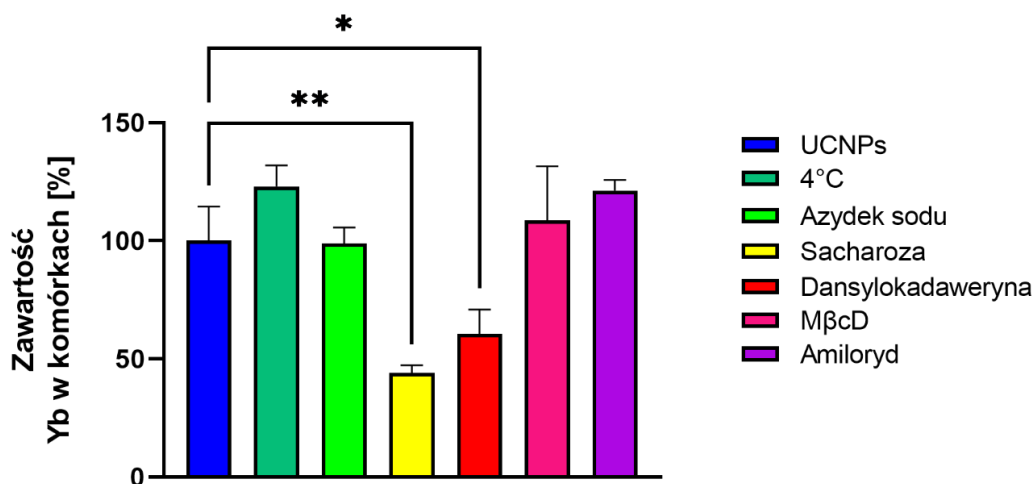
(odpowiednio, zielony prążkowany słupek $p < 0,01$ i turkusowy prążkowany słupek $p < 0,001$ na **Rycinie 54**) w porównaniu z komórkami kontrolnymi (nietraktowanymi inhibitorami) w 37°C .

Godzinna inkubacja komórek z UCNPs i w obecności roztworu sacharozy obniżyła internalizację o $\sim 30\%$ w porównaniu do komórek kontrolnych. Wpływ sacharozy na obniżenie internalizacji UCNPs w komórkach HeLa wydaje się mieć znaczący udział, jednak nie udało się zaobserwować istotności statystycznej. Wyniki jednoznacznie wskazują, że pobieranie nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ było procesem zależnym od energii, a jego zahamowanie znacząco ograniczało ich pobieranie przez komórki HeLa.

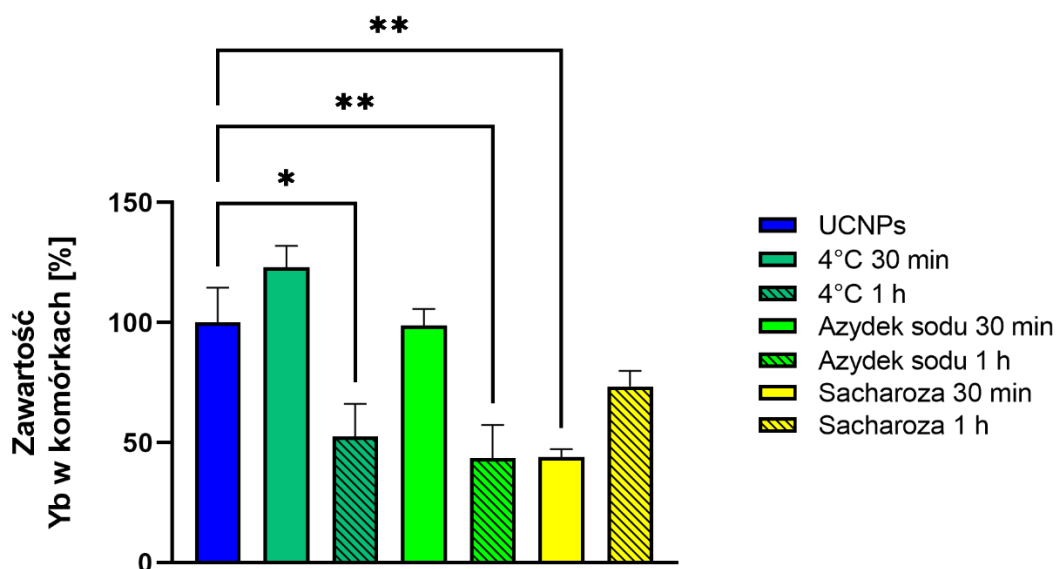


Rycina 54. Zawartość procentowa Y w komórkach eksponowanych na wybrane inhibitory endocytozy przez 30 minut przed inkubacją z UCNPs lub przez 1 godzinę z inhibitorem i UCNPs. Kontrolę stanowiły komórki poddane 2-godzinnej ekspozycji na $1 \mu\text{g/ml}$. ** - kontrola vs 4°C 1 h oraz kontrola vs sacharoza 30 min ($p < 0,01$), *** - kontrola vs azydek sodu 1 h ($p < 0,001$). Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism 8 przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Dunnetta'a, dla $n=3$.

We wszystkich wariantach eksperymentalnych uzyskano podobne wartości dla Yb (zawartość % Yb w komórkach HeLa) po 30 minutach (**Rycina 55**) oraz po 1 godzinie inkubacji z panelem wybranych inhibitorów (**Rycina 56**). Stosunek Y/Yb był podobny, jak w materiale wyjściowym (próbka UCNPs) i wynosił $\sim 2,5$ (**Tabela 10**). Uzyskany wynik potwierdził, że UCNPs nie ulegały rozkładowi, ani też nie uwalniały ze swojej struktury jonów pierwiastków lantanowców po internalizacji przez komórki HeLa. Wartości dla Er (nie przedstawiono na wykresie) były poniżej poziomu ich wykrywalności.



Rycina 55. Zawartość procentowa Yb w komórkach eksponowanych na wybrane inhibitory endocytozy przez 30 min przed inkubacją z UCNPs. Kontrolę stanowiły komórki poddane 2-godzinnej ekspozycji na 1 µg/ml. * - kontrola vs dansylokadaweryna ($p < 0,05$), ** - kontrola vs sacharoza ($p < 0,01$). Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism 8 przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Dunnetta'a, dla $n=3$.

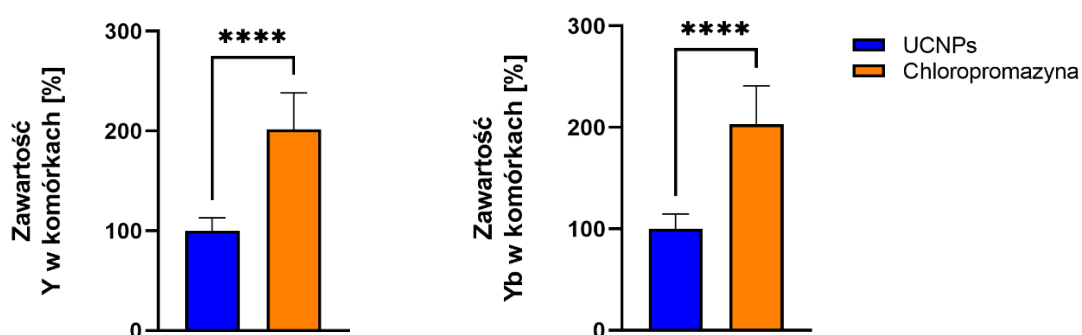


Rycina 56. Zawartość procentowa Yb w komórkach eksponowanych na wybrane inhibitory endocytozy przez 30 min przed inkubacją z UCNPs lub przez 1 godzinę z inhibitorem i UCNPs. Kontrolę stanowiły komórki poddane 2-godzinnej ekspozycji na 1 µg/ml. * - kontrola vs 4°C 1 h ($p < 0,05$), ** - kontrola vs azydek sodu 1 h oraz kontrola vs sacharoza 30 min ($p < 0,01$). Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism 8 przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Dunnetta'a, dla $n=3$.

Tabela 10. Stosunek zawartości Y/Yb w UCNPs oraz analizowanych wariantach eksperymentalnych.

Stosunek Y/Yb	
Teoretyczny UCNPs	3,9
Eksperymentalny UCNPs (n=8)	2,3
Eksperymentalny UCNPs w komórkach po 2 h (n=4)	2,5
Eksperymentalny UCNPs - warianty z inhibitorami (n=3):	
4°C 30 min i UCNPs 2 h	2,1
4°C i UCNPs przez 1 h	2,3
Azydek sodu 30 min i UCNPs 2 h	2,1
Azydek sodu i UCNPs przez 1 h	2,4
Sacharoza 30 min i UCNPs 2 h	2,5
Sacharoza i UCNPs przez 1 h	2,3
Dansylokadaweryna 30 min i UCNPs 2 h	2,5
MβcD 30 min i UCNPs 2 h	2,4
Amiloryd 30 min i UCNPs 2 h	2,3
Chloropromazyna 30 min i UCNPs 2 h	2,5

Znaczny udział w internalizacji UCNPs miał również proces endocytozy z udziałem klatryny. Bardziej efektywne działanie w hamowaniu tego procesu wykazywała dansylokadaweryna, niż powszechnie stosowana chloropromazyna. Inkubacja komórek z chloropromazyną ($p < 0,0001$) pokazała natomiast prawie dwukrotnie wyższy poziom zinternalizowanych UCNPs, niż dla komórek kontrolnych (**Rycina 57**). Jest to bardzo nietypowy wynik, który nie znalazł potwierdzenia w literaturze i wymaga dalszej analizy. Prawdopodobnie, mogło to być związane z reakcją obronną komórek na toksyczne działanie chloropromazyny i przez to, pobraniem większej ilości UCNPs z pożywką hodowlaną, w celu zrekompensowania jej negatywnego działania.

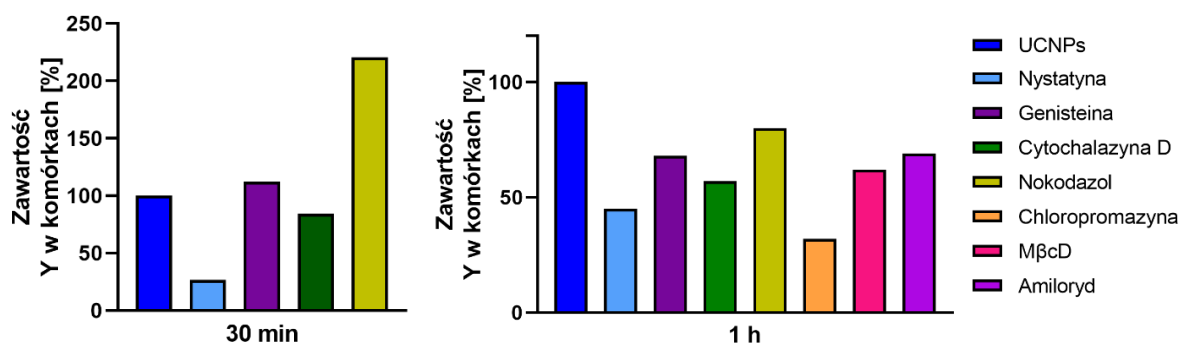


Rycina 57. Zawartość procentowa Y i Yb w komórkach eksponowanych na chloropromazynę przez 30 minut przed 2-godzinną inkubacją z UCNPs. Kontrolę stanowiły komórki poddane 2-godzinnej ekspozycji na 1 µg/ml. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism 8 przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a, dla $n=3$, **** - kontrola vs chloropromazyna ($p < 0,0001$).

Prowadzono również badania wpływu inhibitorów takich jak: nystatyna, cytochalazyna D, genisteina i nokodazol na internalizację UCNPs. Nystatyna w ~50% hamowała endocytozę z udziałem kaweoli (okres inkubacji 30 minut) (**Rycina 58**), co potwierdza udział tego mechanizmu w internalizacji badanych nanostruktur. Podobnie, wyniki uzyskane dla genisteiny (inhibitora endocytozy kaweolarniej), nie potwierdziły jej wpływu na obniżenie internalizacji. Udział makropinocytozy oceniany był za pomocą dwóch inhibitorów: nokodazolu oraz cytochalazyny D. Cytochalazyna D nie wpływała na obniżenie internalizacji. Nokodazol, który jest inhibitorem endocytozy z udziałem klatryny oraz makropinocytozy wpływał podobnie na internalizację UCNPs jak chloropromazyna - internalizacja była zwiększona ponad dwukrotnie.

Istotnym wynikiem było obniżenie internalizacji UCNPs w komórkach po 1-godzinnej inkubacji z nystatyną, genisteiną, MβcD, chloropromazyną, nokodazolem, cytochalazyną D oraz amilorydem. Nystatyna i chloropromazyna wykazały największy wpływ na zahamowanie procesu endocytozy z udziałem klatryny, o ponad połowę, w stosunku do komórek kontrolnych. Cytochalazyna D również znacznie obniżała internalizację o ~40%.

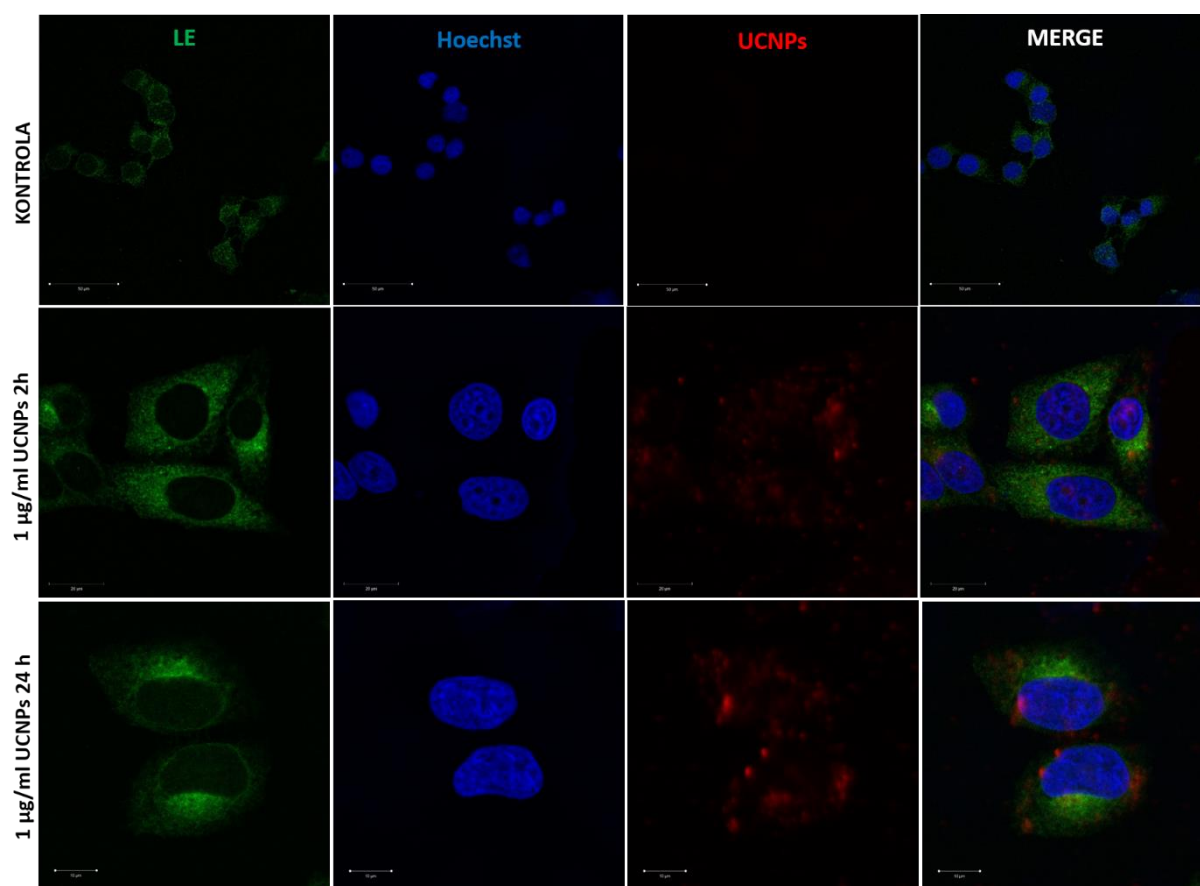
Wyniki te powinny być jednak używane tylko jako wartości orientacyjne. Nie wykonano wystarczającej liczby powtórzeń ($n < 3$), aby uznać je za wiarygodne. Nie mniej jednak, te przybliżone wartości są nadal bardzo cenne, w kontekście lepszego zrozumienia losów nanocząstek w komórkach.



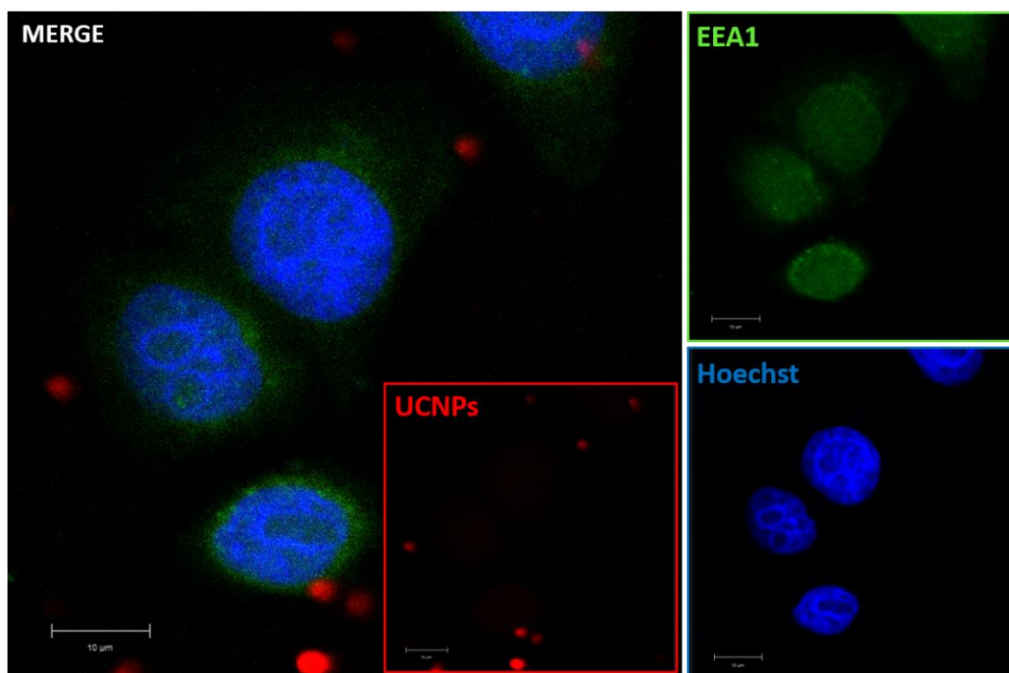
Rycina 58. Zawartość procentowa Y w komórkach eksponowanych na wybrane inhibitory endocytozy przez 30 min przed inkubacją z UCNPs lub przez 1 godzinę z inhibitorem i UCNPs. Kontrolę stanowiły komórki poddane 2-godzinnej ekspozycji na 1 μg/ml, dla $n < 3$.

4.2.1.4. Potwierdzenie obecności UCNPów i ich właściwości luminescencyjnych za pomocą mikroskopu konfokalnego

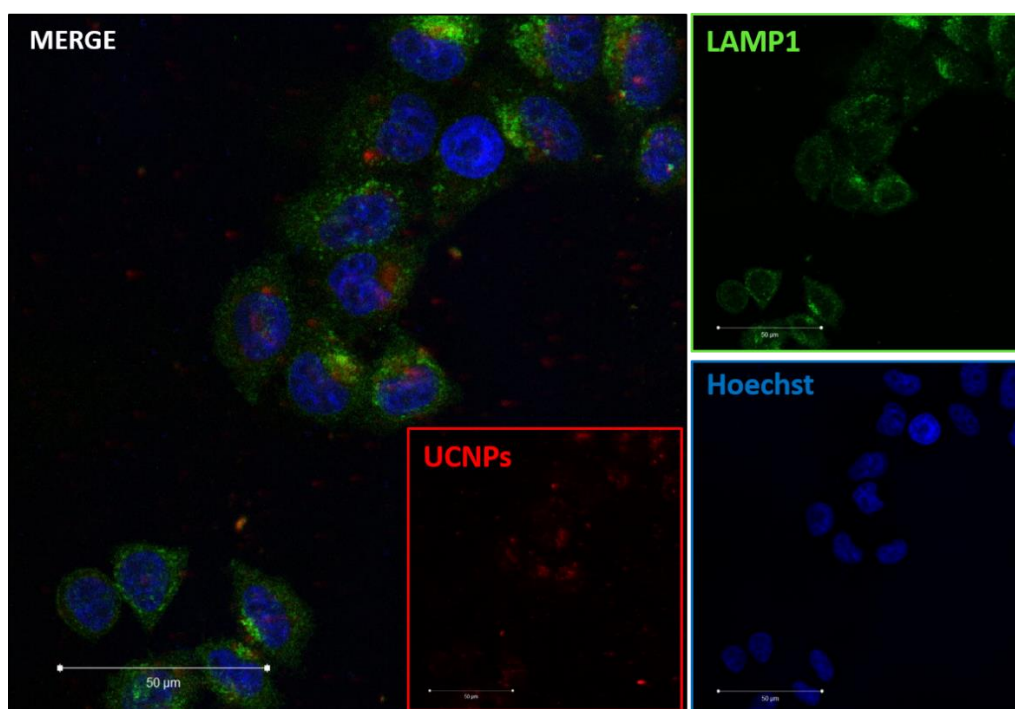
Obecność nanocząstek we wnętrzu komórek HeLa z uwzględnieniem ich subkomórkowej kolokalizacji potwierdzono przy pomocy mikroskopu konfokalnego. Uzyskane obrazy konfokalne wykazały efektywny proces internalizacji badanych nanocząstek oraz ich właściwości luminescencyjne. Na *Rycinach 59-61*, przedstawiono reprezentatywne, trójkolorowe scalone obrazy konfokalne po 2- i 24-godzinnej ekspozycji komórek HeLa na ustalone, optymalne stężenie UCNPów (1 $\mu\text{g/ml}$), które potwierdziły lokalizację UCNPów w strukturach endosomów wczesnych (*Rycina 60*), endosomów późnych (*Rycina 59*) oraz lizosomów (*Rycina 61*). Największą kolokalizację obserwowano z późnymi endosomami, co było spójne z przeprowadzonymi obserwacjami mikroskopowo-elektronowymi.



Rycina 59. Obrazy konfokalne komórek HeLa z nanocząstkami, po 2 i 24 godzinach inkubacji. UCNPów pobudzano laserem femtosekundowym o długości fali 980 nm (kanał czerwony), LE - późne endosomy (EPR13272) pobudzano laserem argonowym o długości fali 488 nm (kanał zielony), jądra komórkowe wybarwiono barwnikiem Hoechst 33342 i pobudzano laserem femtosekundowym o długości fali 690 nm (kanał niebieski). Prezentowany obraz MERGE jest złożeniem obrazów pochodzących z luminescencji nanocząstek (UCNPów), wybarwionych późnych endosomów (LE) oraz jąder komórkowych (Hoechst). Kontrole stanowiły komórki bez UCNPów. Skala dla kontroli - 50 μm , dla komórek z UCNPów - 20 μm .



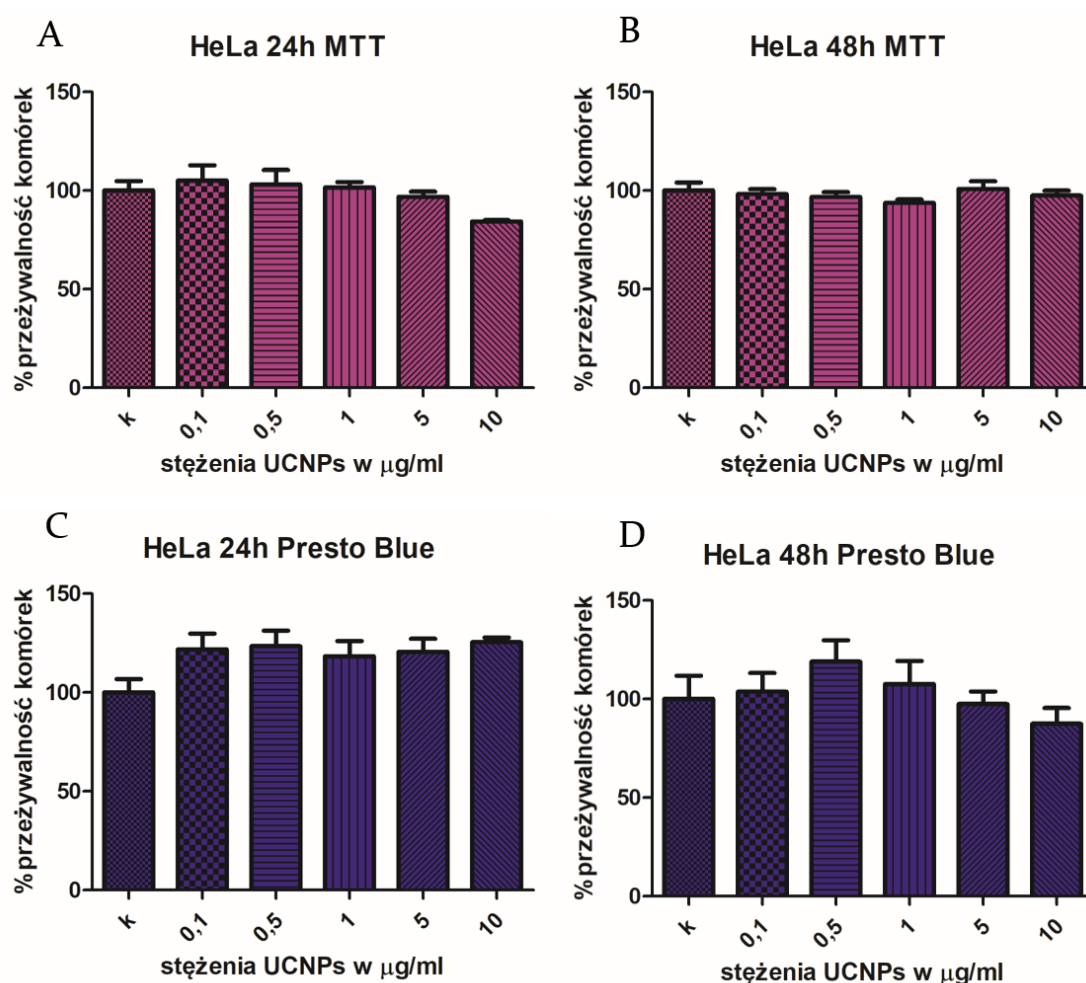
Rycina 60. Obrazy konfokalne komórek HeLa z nanocząstkami, po 2 godzinach inkubacji. UCNPs pobudzano laserem femtosekundowym o długości fali 980 nm (kanał czerwony), wczesne endosomy (EEA1) pobudzano laserem argonowym o długości fali 488 nm (kanał zielony), jądra komórkowe wybarwiono barwnikiem Hoechst 33342 i pobudzano laserem femtosekundowym o długości fali 690 nm (kanał niebieski). Prezentowany obraz MERGE jest złożeniem obrazów pochodzących z luminescencji nanocząstek, wybarwionych wczesnych endosomów oraz jąder komórkowych. Skala - 10 μm .



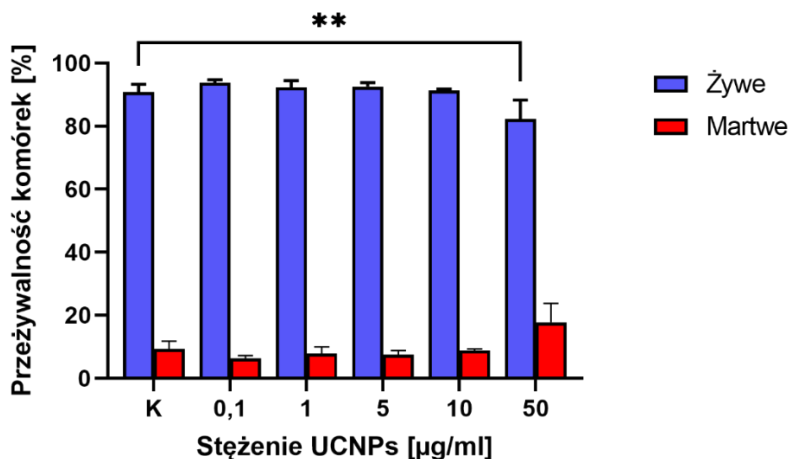
Rycina 61. Obrazy konfokalne komórek HeLa z nanocząstkami, po 2 godzinach inkubacji. UCNPs pobudzano laserem femtosekundowym o długości fali 980 nm (kanał czerwony), lizosomy (LAMP1) pobudzano laserem argonowym o długości fali 488 nm (kanał zielony), jądra komórkowe wybarwiono barwnikiem Hoechst 33342 i pobudzano laserem femtosekundowym o długości fali 690 nm (kanał niebieski). Prezentowany obraz MERGE jest złożeniem obrazów pochodzących z luminescencji nanocząstek, wybarwionych lizosomów oraz jąder komórkowych. Skala - 50 μm .

4.2.1.5. Ocena cytotoksyczności nanocząstek NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺

Analiza cytotoksyczności oparta o ocenę żywotności komórek (przeprowadzona przy pomocy testu MTT oraz PB), wykazała brak istotnego statystycznie wpływu na komórki HeLa w zakresie testowanych stężeń nanocząstek NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ po 24 i 48 godzinach inkubacji (**Rycina 62**). Podobnie, wyniki testu Live/Dead po 2 godzinach inkubacji z nanocząstkami NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺ nie wykazały istotnego wpływu na żywotność komórek HeLa w zakresie stężeń 0,1-10 µg/ml. Żywotność komórek obniżyła się o ~17,6% przy najwyższym stosowanym stężeniu nanocząstek NaYF₄:20%Yb³⁺,2%Er³⁺, które wynosiło 50 µg/ml i efekt ten był istotny statystycznie (**- p<0,01) (**Rycina 63**).



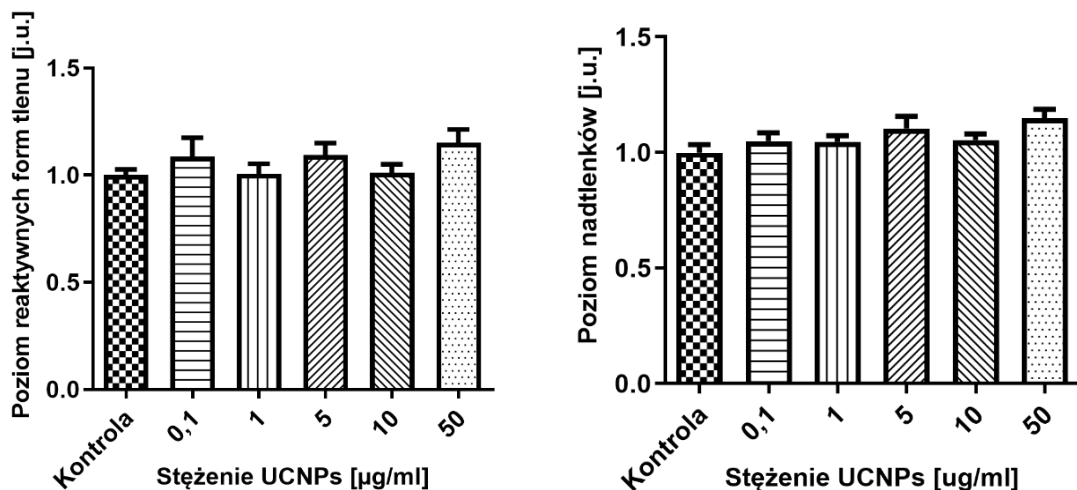
Rycina 62. Żywotność komórek HeLa oceniano przy pomocy testu MTT po 24 godzinach (A) i 48 godzinach (B), oraz testu Presto Blue po 24 godzinach (C) i 48 godzinach (D). Do określenia istotności statystycznej użyto testów one-way ANOVA i testu Tukey'a. Nie wykazały one statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami ($p > 0,05$). Wyniki przedstawiono w postaci średniej \pm SD ($n=8$).



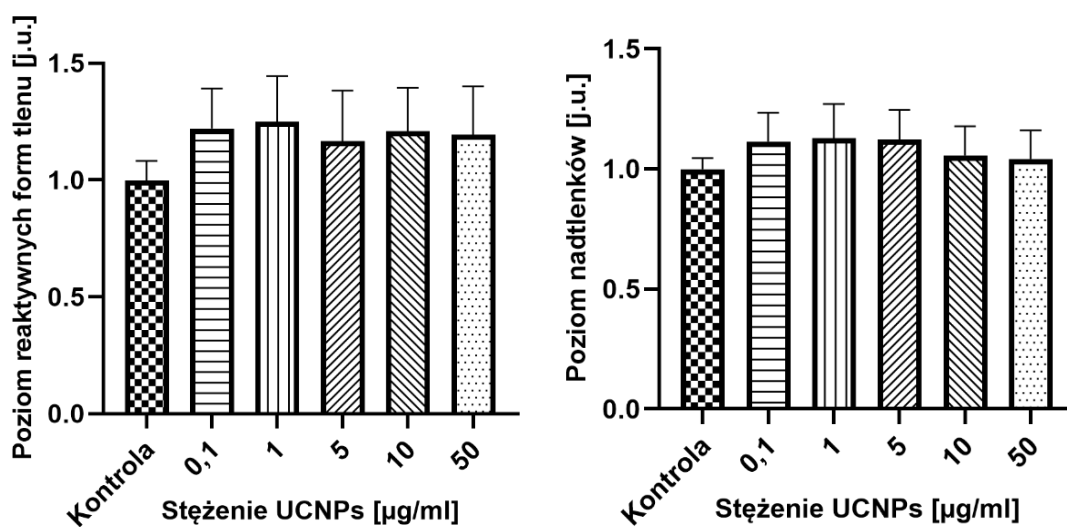
Rycina 63. Analiza przeżycia komórek HeLa po 2 godzinach inkubacji z wybranymi stężeniami UCNPs wykonana przy pomocy testu Live/Dead. Na niebiesko oznaczone są żywe komórki, na czerwono komórki martwe. Do określenia istotności statystycznej użyto testów one-way ANOVA i testu Dunnett'a ** - Kontrola vs 50 µg/ml ($p < 0,01$). Wyniki przedstawiono w postaci średniej \pm SD ($n=8$).

Pomimo, braku znaczących różnic w testach cytotoksyczności, optymalne stężenie 1 µg/ml, wybrano na podstawie wyników, pochodzących z analizy mikroskopowo-elektronowej. Takie stężenie było zawsze obserwowane na elektronogramach (elektronogram to pojedynczy obraz z przekroju całej komórki) - agregaty nanocząstek widoczne były w co najmniej kilku strukturach przedziału endosomalnego. W związku z powyższym, większe przeładowywanie komórek nanocząstkami nie było zasadne.

Analiza wybranych markerów stresu oksydacyjnego, wykazała, że wpływ analizowanych nanocząstek NaYF₄:20% Yb³⁺, 2% Er³⁺ na indukcję reaktywnych form tlenu (ROS) oraz nadtlenków jest nieznaczny. Nie zaobserwowano istotnych zmian pomiędzy komórkami nowotworowymi HeLa (**Rycina 64**) a prawidłowymi linii HEK293 (**Rycina 65**).



Rycina 64. Wykresy przedstawiające pomiar reaktywnych form tlenu i nadtlenków po 24-godzinnej inkubacji komórek HeLa z wybranymi stężeniami nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$. Do określenia istotności statystycznej ($*p<0,05$) użyto testów one-way ANOVA i testu Tukey'a. Wyniki przedstawiono w postaci średniej $\pm\text{SD}$ ($n=8$).



Rycina 65. Wykresy przedstawiające pomiar reaktywnych form tlenu i nadtlenków (ROS i Superoxide) po 24-godzinnej inkubacji komórek Hek293 z wybranymi stężeniami nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$. Do określenia istotności statystycznej ($*p<0,05$) użyto testów one-way ANOVA i testu Tukey'a. Wyniki przedstawiono w postaci średniej $\pm\text{SD}$ ($n=8$).

4.2.2. Model organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura *ex vivo*

4.2.2.1. Ocena obecności UCNPs w skrawkach oraz analiza zmian ultrastrukturalnych z wykorzystaniem obrazowania TEM

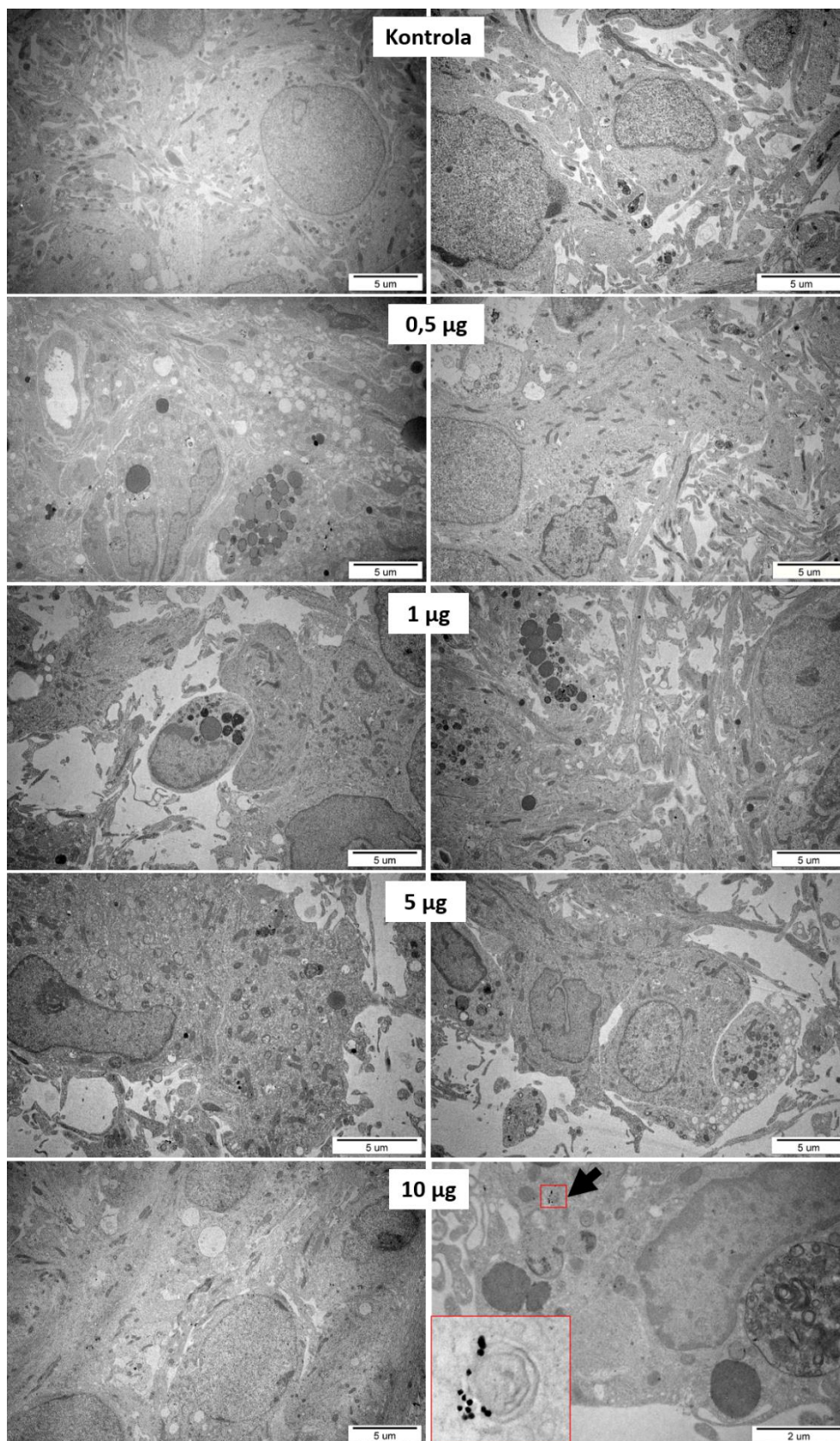
W celu określenia zdolności UCNPs do wnikania do innych typów komórek niż HeLa i HEK293, a także oceny ich wpływu na inne komórki przeprowadzono analizę mikroskopowo-elektronową w modelu organotypowej hodowli skrawków hipokampa (OHSC). Obecność nanocząstek testowano podając je do hodowli skrawków na trzy sposoby: 1) nanocząstki dodano do pożywki hodowlanej znajdującej się pod membraną, na którą nałożone są skrawki (inkubacja 24 godziny); 2) nanocząstki dodano do pożywki hodowlanej, skrawki były zanurzone w pożywce (inkubacja 1 godzina); 3) nanocząstki nałożono w formie kropli bezpośrednio na górną powierzchnię skrawka (inkubacja 2 godziny) (zgodnie z opisem w *podrozdziale 3.5.2.*).

W wariancie 1 obecność nanocząstek obserwowano w komórkach hipokampa jedynie przy bardzo wysokich stężeniach tj. 10 $\mu\text{g/ml}$ (*Rycina 66*). W skrawkach zanurzonych w pożywce (wariant 2), nie wykazano obecności nanocząstek w komórkach. Analiza ultrastrukturalna materiału wykazała jedynie obecność dużych skupisk nanocząstek w przestrzeni zewnątrzkomórkowej przy zastosowanym stężeniu UCNPs 10 $\mu\text{g/ml}$ (*Rycina 67*). Na podstawie uzyskanych wyników uznano, że zastosowane metody podania nanocząstek do hodowli skrawków są nieskuteczne. Natomiast, w wariancie 3 tj. podanie nanocząstek bezpośrednio na skrawek, obserwowano efektywną internalizację badanych nanocząstek w zakresie wszystkich testowanych stężeń (*Rycina 68*).

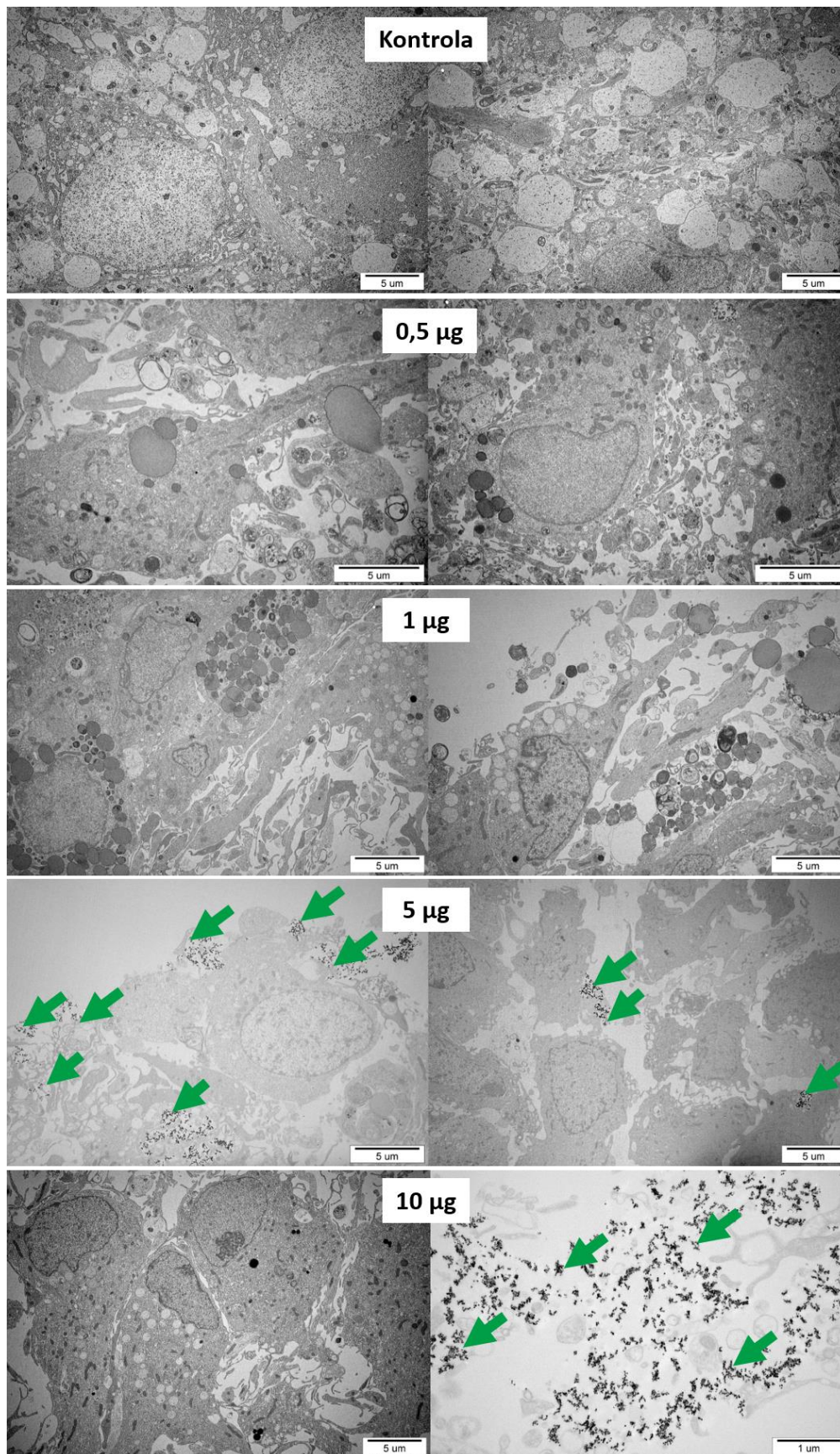
W kolejnym etapie eksperymentu została oceniona morfologia i cechy ultrastrukturalne organelli komórkowych po ekspozycji skrawków na wybrane stężenia nanocząstek w wariancie 3. Obecność UCNPs obserwowano przede wszystkim w komórkach nerwowych. W błonie komórkowej neuronów obserwowano liczne zagłębienia w miejscach kontaktu z nanocząstkami (*Rycina 69*). Elektronogramy potwierdziły również występowanie dużych agregatów UCNPs zamkniętych wewnątrz endosomów obecnych w komórkach nerwowych. Nanocząstki występowały w endosomach wczesnych i endosomach późnych, ich obecność wykazano również wewnątrz lizosomów oraz dużych autofagolizosomów (*Rycina 70*). Podobnie, jak w komórkach HeLa i komórkach linii HEK293 nie obserwowano UCNPs występujących „wolno” w cytoplazmie, ani w innych strukturach wewnątrzkomórkowych, czy też jądrze komórkowym. Przy wyższych stężeniach nanocząstek (10 μg), obserwowano w neuronach zwiększoną liczbę lizosomów, co sugeruje, że ich duże stężenie może wpływać na indukcję procesów autofagii w komórkach. Nie można jednak o tym jednoznacznie

wyrokować, ponieważ inkubacja z UCNPs trwała zbyt krótko. Obserwacje wykazały, że obecność wysokich stężeń UCNPs nie wpływała na reakcję komórek. UCNPs nie zmieniały swojej lokalizacji w komórkach ani nie były uwalniane do cytoplazmy. Nanocząstki $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ we wnętrzu komórek hipokampa zachowywały się stabilnie i nie obserwowano zmian w ich morfologii.

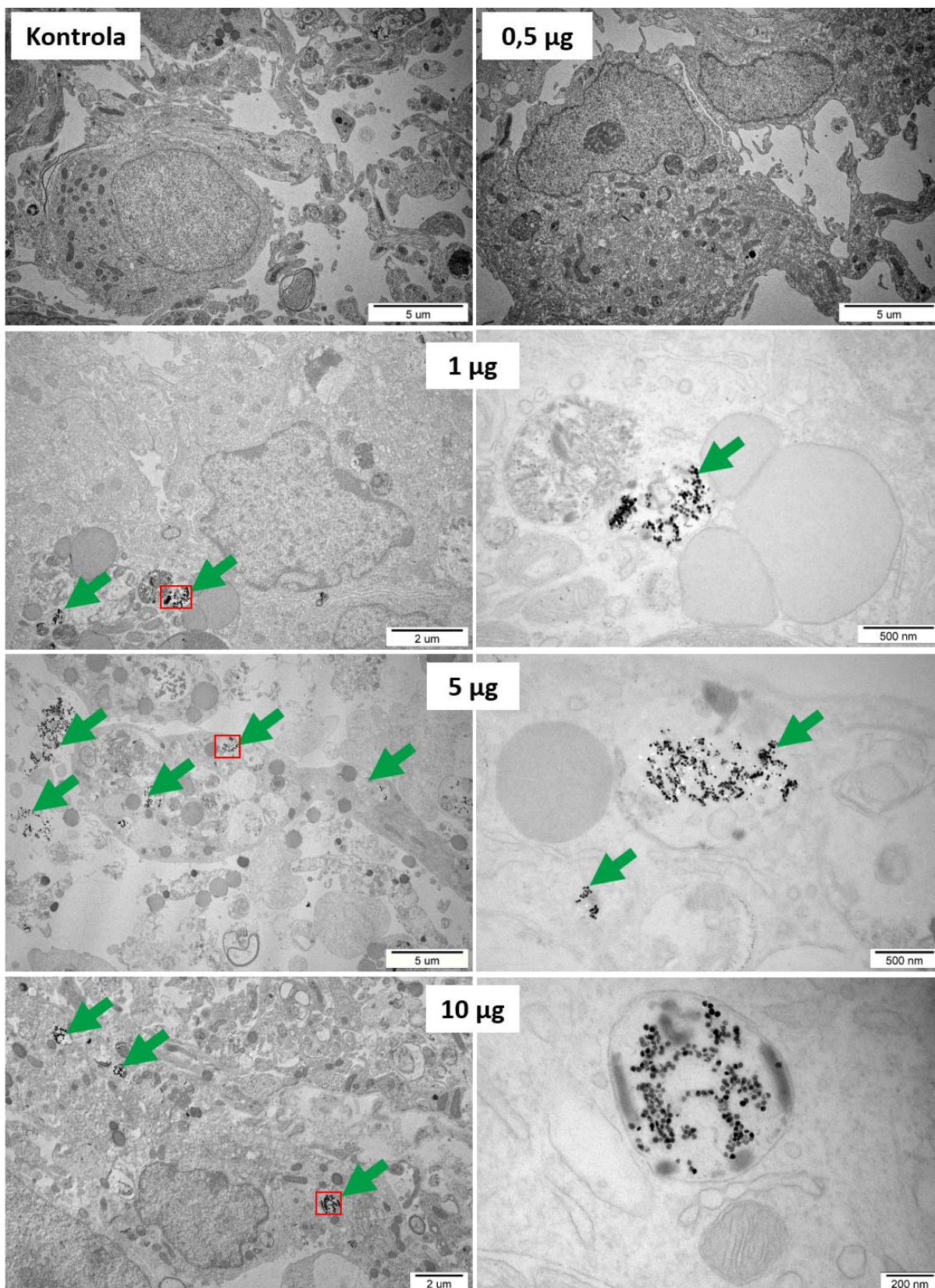
We wnętrzu komórek hipokampa potwierdzono również obecność nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+} @ \text{SiO}_2$ (UCNPs o stężeniu 5 μg nałożone w formie kropli) po 2 godzinach inkubacji. Nanocząstki $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+} @ \text{SiO}_2$ były obecne w głównej mierze w strukturach późnych endosomów (*Rycina 71*).



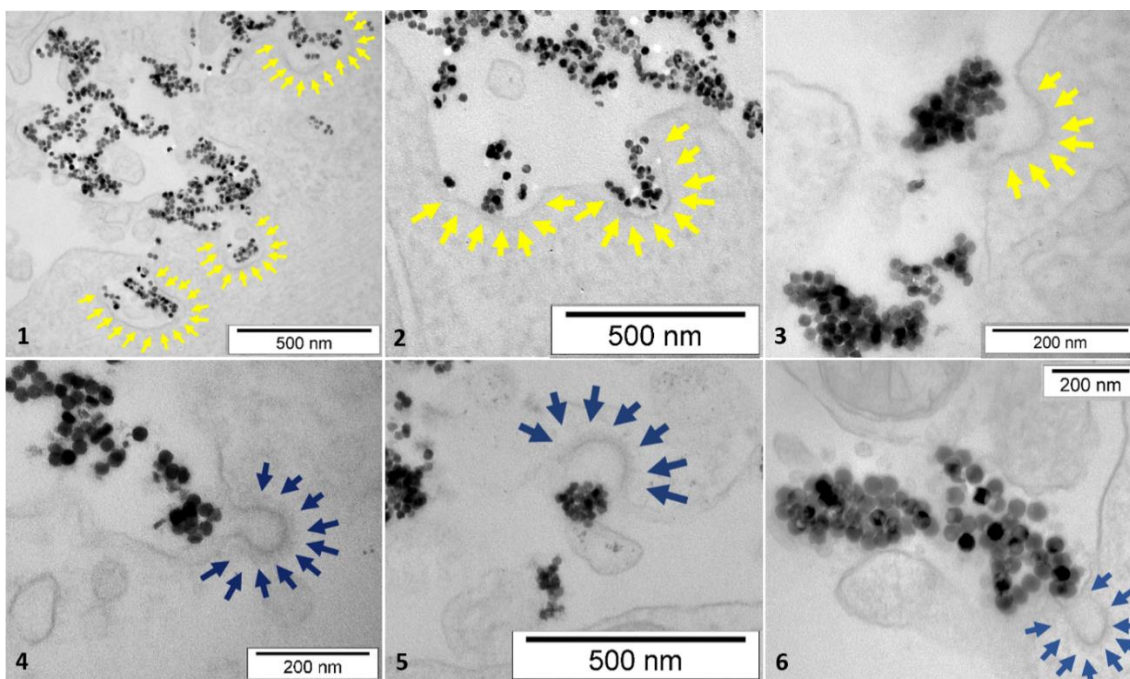
Rycina 66. Wariant 1. Panel przedstawiający wybrane elektronogramy komórek kontrolnych skrawków hipokampa po 24 godzinach bez nanocząstek (kontrola) oraz z 0,5; 1; 5 i 10 μg nanocząstek podanych na 1 ml pożywki. Skrawki były nałożone na membranę. Nanocząstki obecne w endosomie przy stężeniu 10 μg zaznaczone czarną strzałką (na większym powiększeniu we wstawce z czerwonym obrysem).



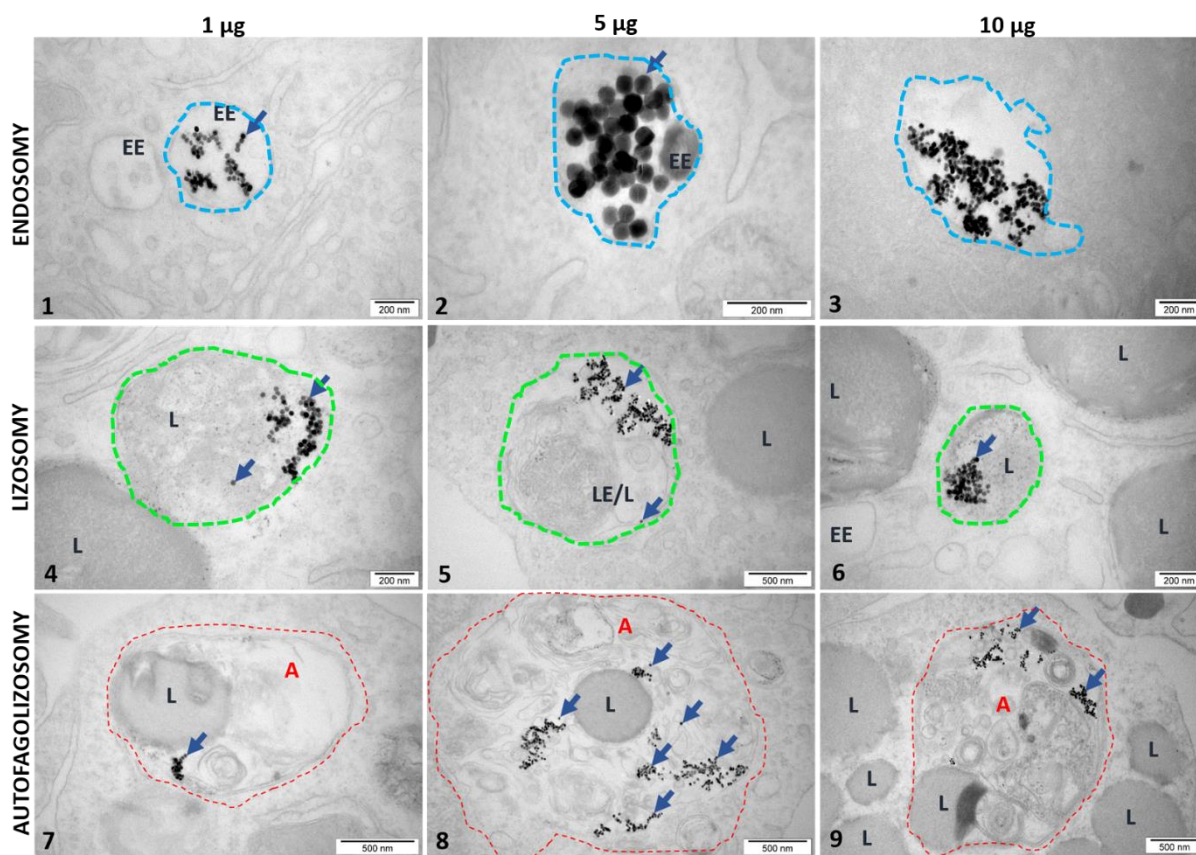
Rycina 67. Wariant 2. Panel przedstawiający wybrane elektronogramy komórek skrawków hipokampa po 1 godzinie bez nanocząstek (kontrola) oraz z 0,5; 1; 5 i 10 µg nanocząstek podanych na 1 ml pożywki. Skrawki były nałożone na membranę i zanurzone w dodatkowym 1 ml pożywki. Zielonymi strzałkami zaznaczone agregaty nanocząstek zlokalizowane głównie poza komórkami.



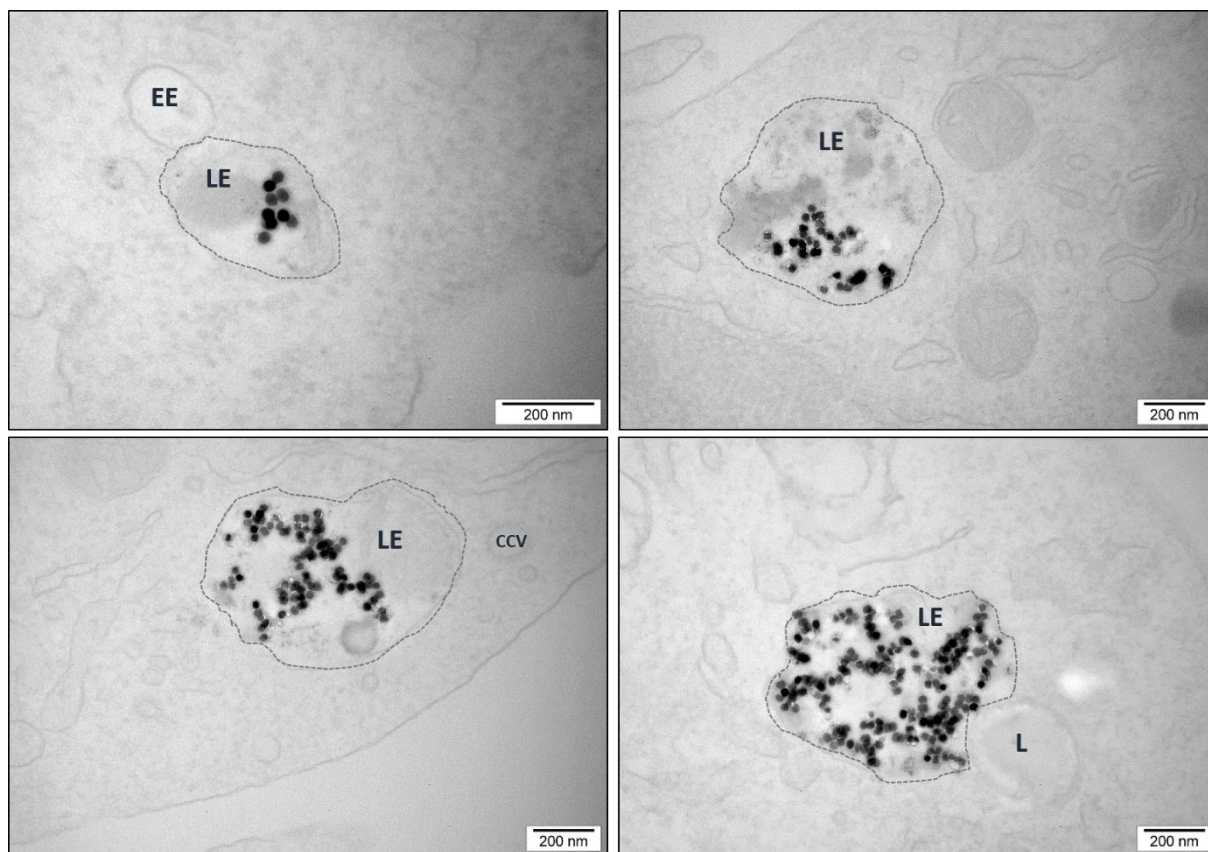
Rycina 68. Wariant 3. Panel przedstawiający wybrane elektronogramy komórek skrawków hipokampa po 2 godzinach inkubacji bez nanocząstek oraz z 0,5; 1; 5 i 10 µg nanocząstek podanych w formie kropli od góry na powierzchnię skrawka. Zielonymi strzałkami zaznaczone agregaty nanocząstek. Nanocząstki obecne w endosomach (przy stężeniu 1, 5 i 10 µg) zaznaczone zieloną strzałką i czerwonym obrysem (na większym powiększeniu odpowiednio obok).



Rycina 69. Reprezentatywne elektronogramy przedstawiające formujące się pęcherzyki będące uwypukleniem błony komórkowej do wnętrza komórki w obecności nanocząstek po 2 godzinach inkubacji (1 μg podane w formie kropli nałożonej na górną powierzchnię skrawka) Formujące się pęcherzyki bez klatryny zaznaczone są żółtymi strzałkami (1-3), natomiast pęcherzyki z klatryną (ciemniejsze halo dookoła wpuklenia) zaznaczone niebieskimi strzałkami (4-6).



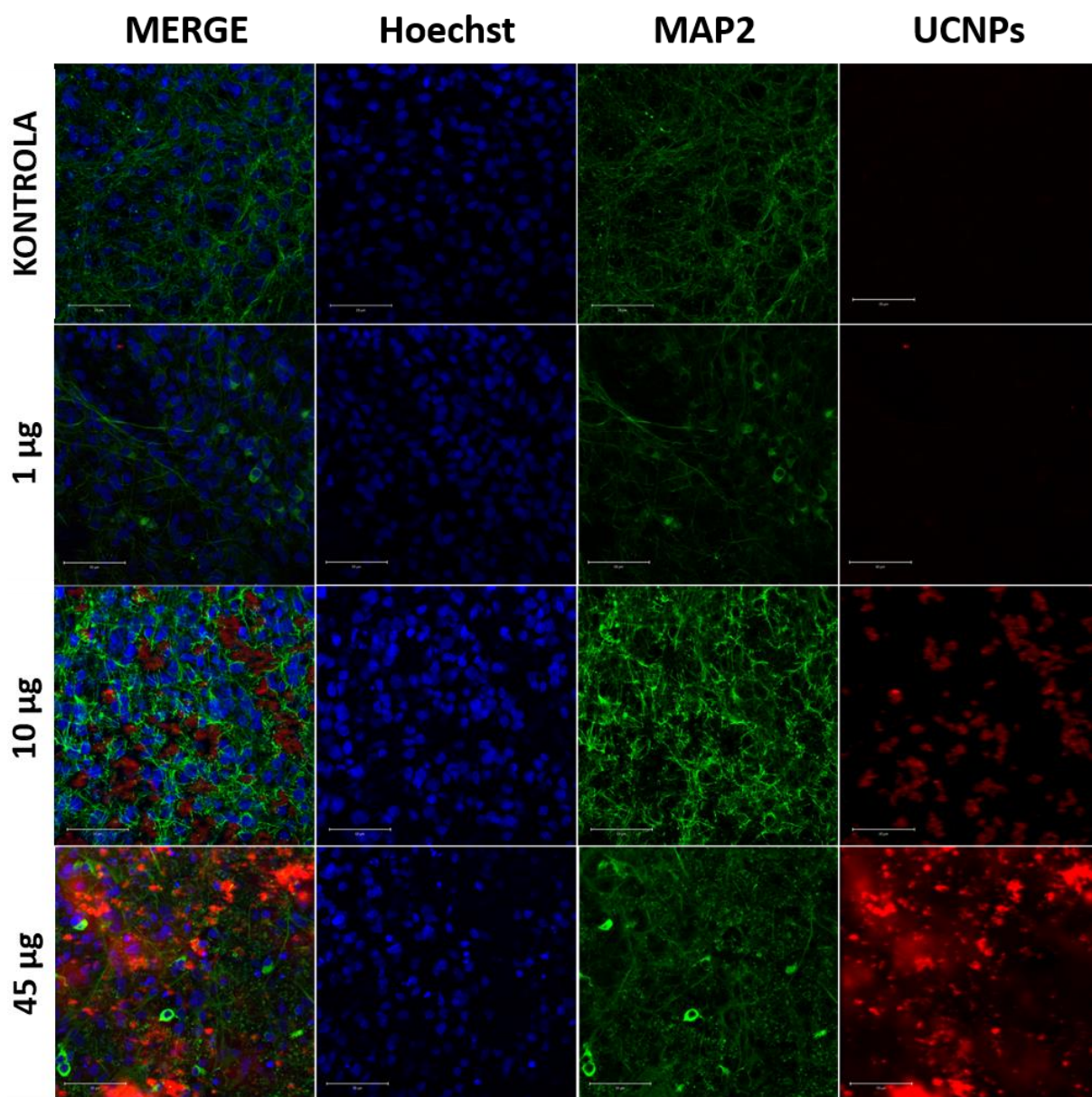
Rycina 70. Reprezentatywne elektronogramy przedstawiające kolokalizację nanocząstek (zaznaczone ciemnoniebieskimi strzałkami) z różnymi strukturami wewnątrzkomórkowymi. (1-3) UCNPs podane w formie kropli po 2 godzinach inkubacji zamknięte we wczesnych endosomach (EE- obrysowane na niebiesko przerywaną linią), (4-6) w późnych endosomach (LE) lub lizosomach (L-obrysowane na zielono przerywaną linią), (7-9) w autofagolizosomach (A - obrysowane czerwoną przerywaną linią).



Rycina 71. Reprezentatywne elektronogramy przedstawiające obecność nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}@\text{SiO}_2$ po 2 inkubacji ($5\ \mu\text{g}$) zamkniętych w strukturach późnych endosomów (LE), obrysowane przerywaną szarą linią. EE –endosom wczesny, L- lizosom, CCV – pęcherzyk klatrynowy.

4.2.2.2. Potwierdzenie obecności UCNPs i ich właściwości luminescencyjnych w komórkach hipokampa za pomocą mikroskopu konfokalnego

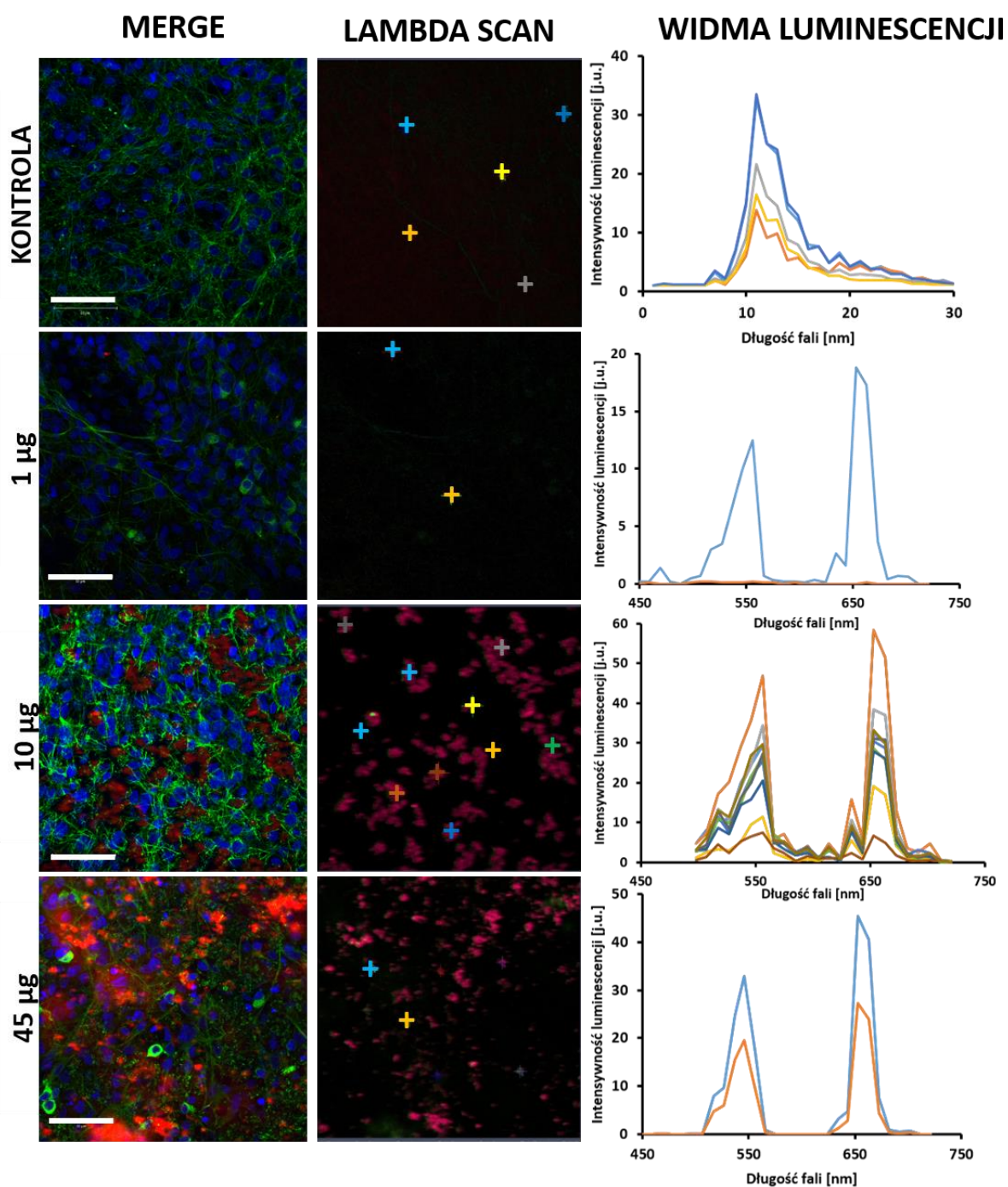
W dalszych eksperymentach przeprowadzono analizę wnikania nanocząstek do wnętrza poszczególnych rodzajów komórek skrawków hipokampa. Badania z użyciem mikroskopu konfokalnego potwierdziły nie tylko efektywny proces internalizacji badanych nanocząstek do neuronów i astrocytów hipokampa, ale również ich właściwości spektroskopowe. Na **Rycinie 72** przedstawiono reprezentatywne, trójkolorowe scalone obrazy konfokalne przedstawiające obecność UCNPs w neuronach po 2 godzinach ekspozycji organotypowych skrawków hipokampa szczura na wybrane stężenia UCNPs (1, 10 i $45\ \mu\text{g}/4\ \mu\text{l}$). Po inkubacji komórek z UCNPs w stężeniu $45\ \mu\text{g}/4\ \mu\text{l}$, obserwowano ich liczne skupiska, które utworzyły się na powierzchni skrawków. W głównej mierze był to nadmiar nieodpłukanych UCNPs, których nie udało się usunąć z hodowli po inkubacji. Część tych UCNPs, mogło również być związanych z receptorami powierzchniowymi znajdującymi się na błonie komórkowej, które nie zdążyły zostać zinternalizowane przez komórki.



Rycina 72. Obrazy konfokalne skrawków hipokampa po 2 godzinach inkubacji z wybranymi stężeniami nanocząstek, nałożonych w formie kropli na powierzchnię skrawka. UCNPs pobudzano laserem femtosekundowym o długości fali 980 nm (kanał czerwony), neurony (MAP2) pobudzano laserem argonowym o długości fali 488 nm (kanał zielony), jądra komórkowe wybarwiono barwnikiem Hoechst 33342 i pobudzano laserem femtosekundowym o długości fali 690 nm (kanał niebieski). Prezentowany obraz MERGE jest złożeniem obrazów pochodzących z luminescencji nanocząstek, wybarwionych neuronów oraz jąder komórkowych. Kontrole stanowiły skrawki bez nałożonej zawiesiny nanocząstek. Skala - 50 µm.

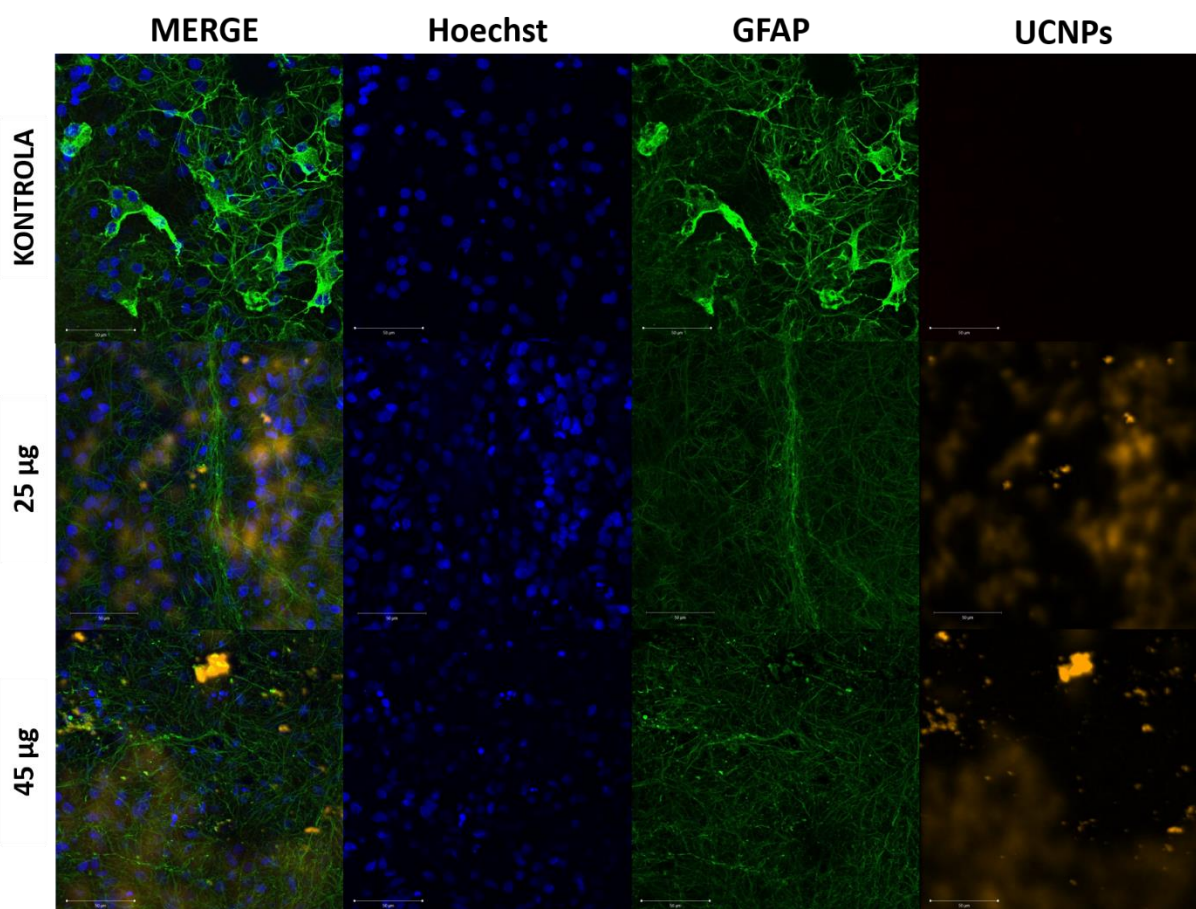
Widma luminescencji nanocząstek zlokalizowanych wewnątrz neuronów skrawków hipokampa rejestrowano przy użyciu trybu *lambda scan* (**Rycina 73**). Uzyskane spektra emisji luminescencji nanocząstek wewnątrz komórek po pobudzeniu laserem podczerwonym o długości fali 980 nm korelowały ze spektrami emisji uzyskanymi z analizy spektroskopowej przeprowadzonej podczas charakterystyki fizykochemicznej UCNPs (*podrozdział 3.2.4.*), z maksimum intensywności dla zielonej i czerwonej luminescencji odpowiednio przy długości fali ~550 nm i ~660 nm. Uzyskane wyniki wskazują na wysoką efektywność emisji

luminescencji UCNPs w zastosowanym modelu *ex vivo*. Ponadto, kanał dla nanocząstek (czerwony) wykazuje wysoki stosunek sygnału do szumu przy stosunkowo dużej intensywności emisji konwersji energii w górę. Nie zaobserwowano również występowania niekorzystnej autofluorescencji tła. Pozwoliło to uzyskać obrazy konfokalne o bardzo dobrej rozdzielczości i wysokim kontraście, których nie można uzyskać w tradycyjnym jedno- lub dwufotonowym obrazowaniu fluorescencyjnym.



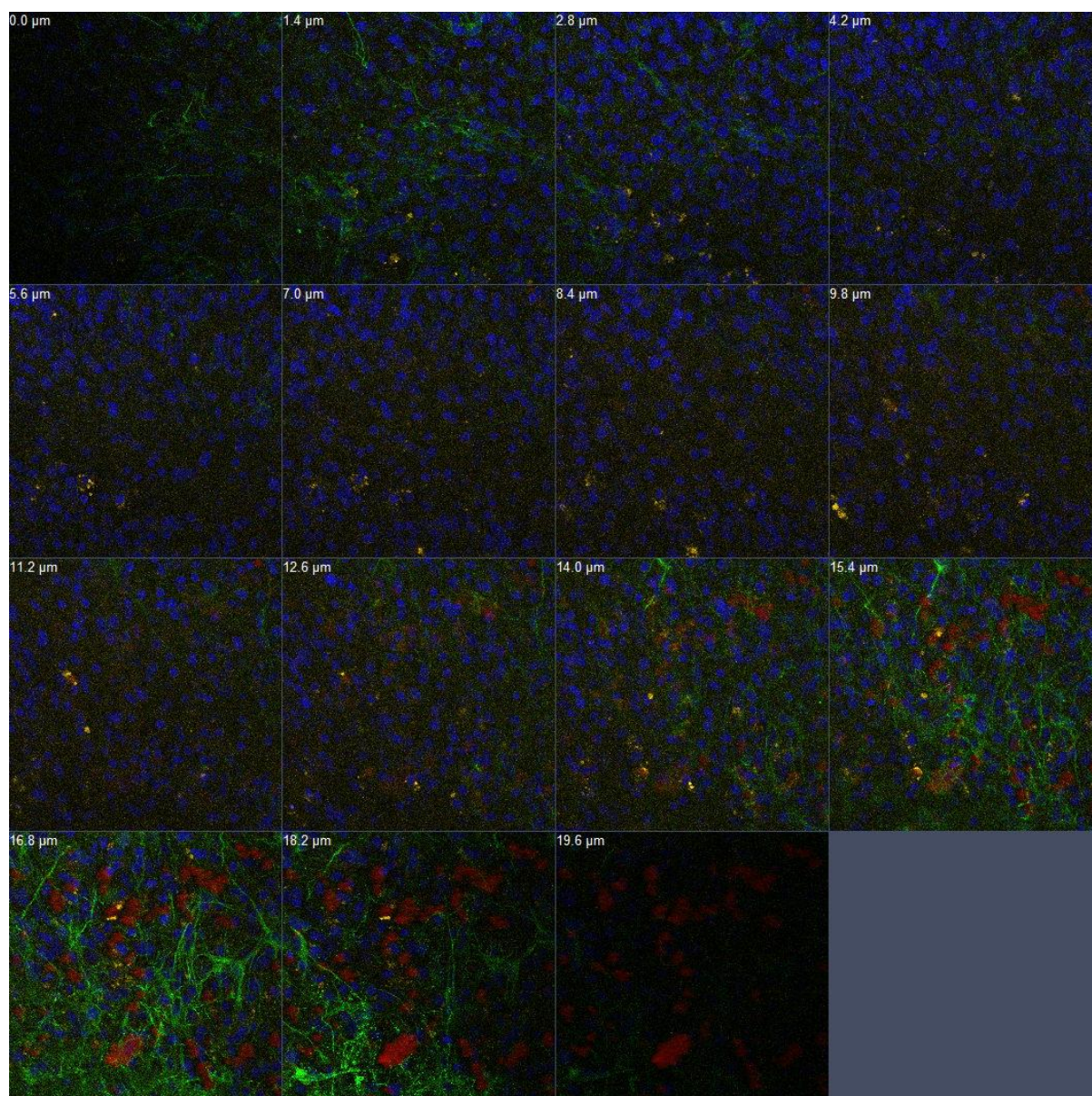
Rycina 73. Obrazy konfokalne MERGE oraz wyróżniony kanał dla trybu lambda scan, z którego były zbierane pomiary dla widm luminescencji UCNPs. Skala - 50 μm .

Obecność nanocząstek potwierdzono również w astrocytach (GFAP), ale w mniejszej ilości i przy większych stężeniach, wynoszących odpowiednio 25 i 45 $\mu\text{g}/4\mu\text{l}$ (**Rycina 74**).

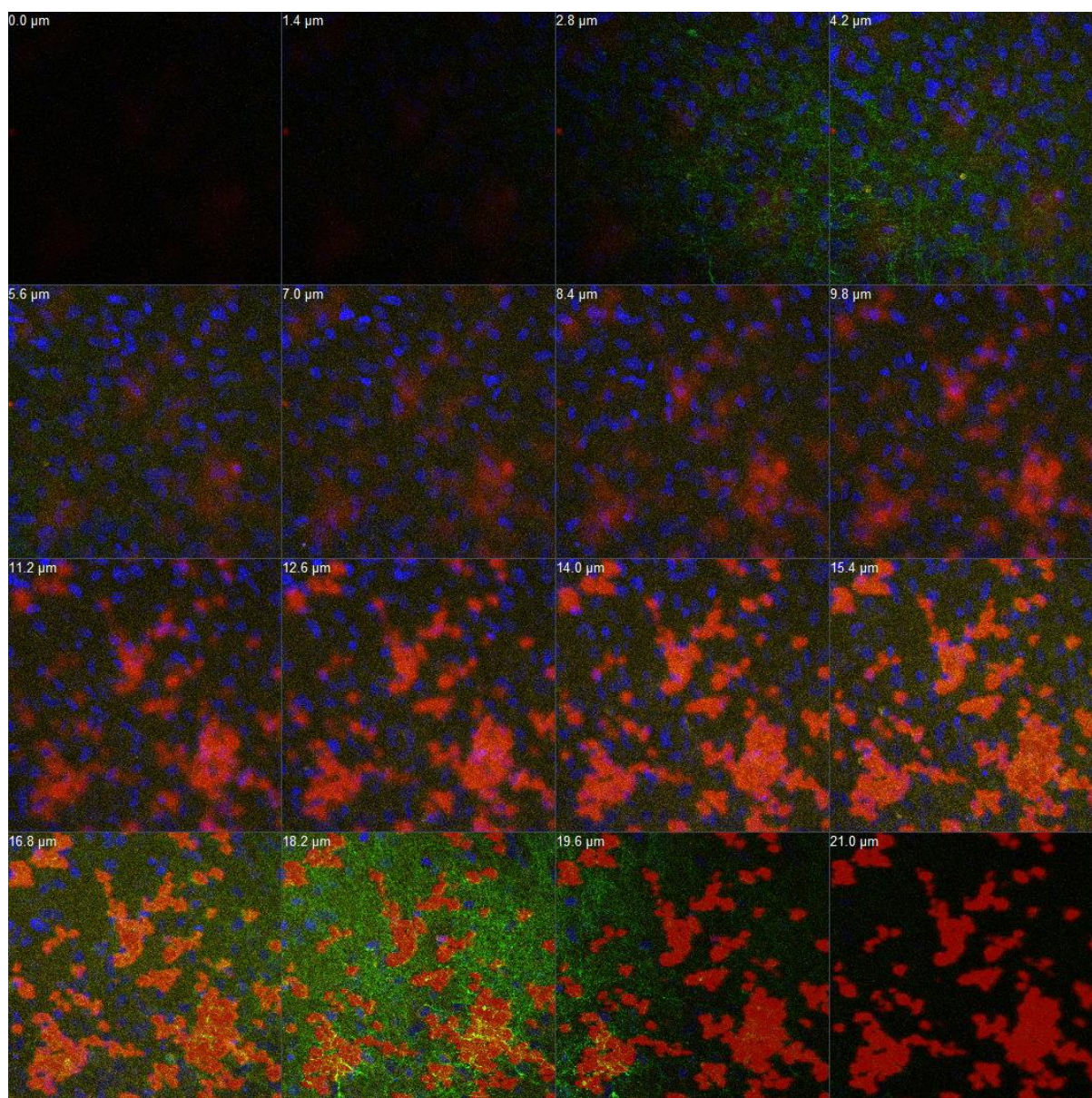


Rycina 74. Obrazy konfokalne skrawków hipokampa inkubowanych przez 2 godziny z 25 μl i 45 μl nanocząstek nałożonych w formie kropli na powierzchnię skrawka. UCNPs pobudzano laserem femtosekundowym o długości fali 980 nm (kanał pomarańczowy), astrocyty (GFAP) pobudzano laserem argonowym o długości fali 488 nm (kanał zielony), jądra komórkowe wybarwiono barwnikiem Hoechst 33342 i pobudzano laserem femtosekundowym o długości fali 690 nm (kanał niebieski). Prezentowany obraz MERGE jest złożeniem obrazów pochodzących z luminescencji nanocząstek, wybarwionych astrocytów oraz jąder komórkowych. Kontrole stanowią skrawki bez nałożonej zawiesiny nanocząstek. Skala - 50 μm .

W celu zbadania biodystrybucji UCNPs w komórkach skrawka, przeprowadzono dodatkowo analizę przekroju grubości w mikroskopie konfokalnym, która polegała na rekonstrukcji 3D badanego skrawka w trybie skanowania *Z-stack* (**Ryciny 75-76**). Uzyskana w ten sposób seria składała się z określonej liczby pojedynczych, optycznych warstw, będących obrazami mikroskopowymi o wybranej grubości (1,4 μm), zebranych z całego preparatu. Analiza *Z-stack* wykonana dla skrawków inkubowanych przez 24 godziny z 1 μg i 10 μg nanocząstek wykazała, że UCNPs były zlokalizowane w komórkach na różnych poziomach skrawka.



Rycina 75. Analiza Z-stack wykonana dla skrawka hipokampa szczura inkubowanego z 1 µg nanocząstek (1µg/3µl) przez 24 godziny. Na zielono wybarwione są neurony, na czerwono mikroglej, na niebiesko jądra komórkowe, a na pomarańczowo zaznaczona jest luminescencja pochodząca od nanocząstek.

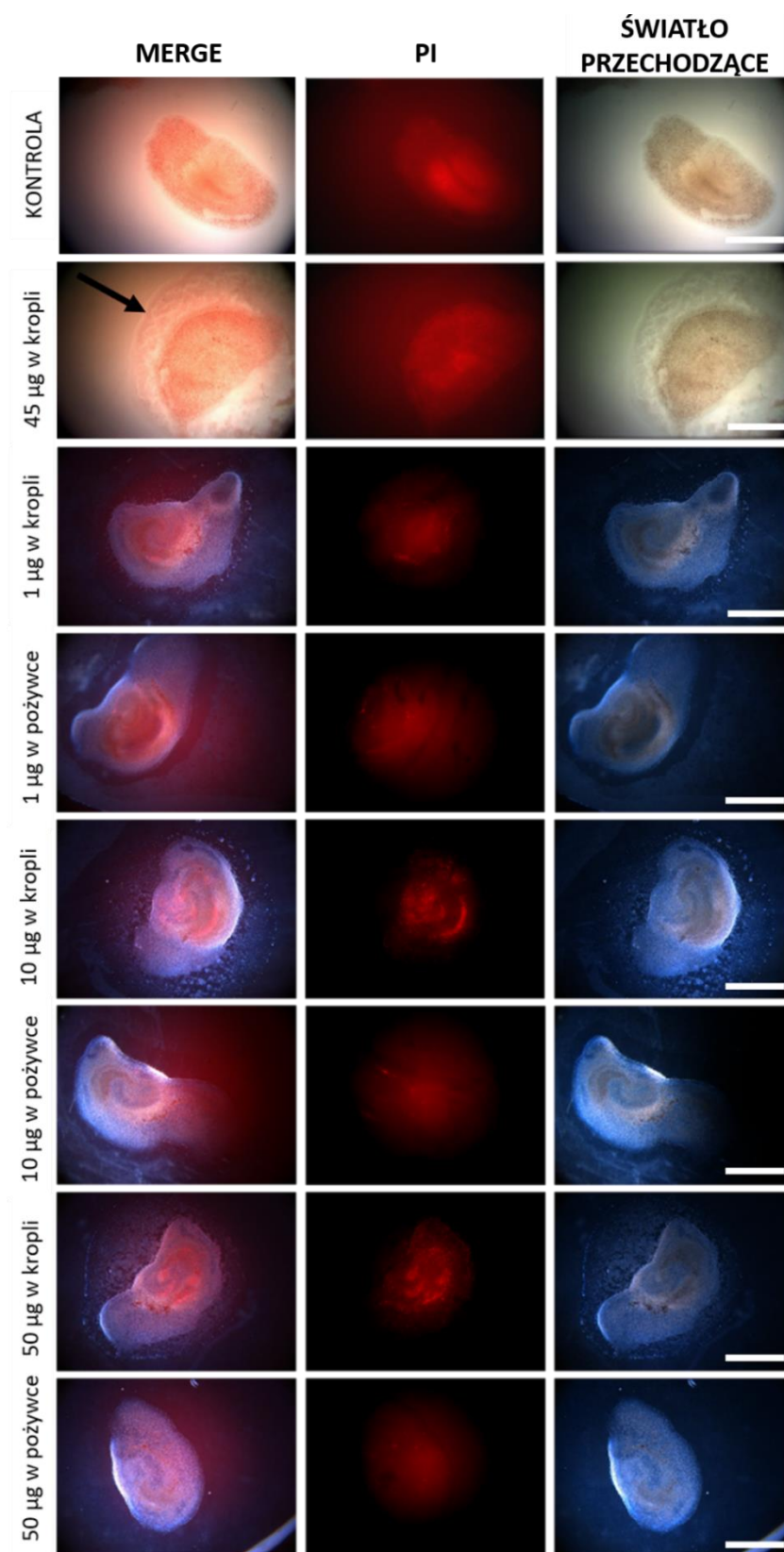


Rycina 76. Analiza Z-stack wykonana dla skrawka hipokampa szczura inkubowanego z 1 µg nanocząstek (1µg/3µl) przez 24 godziny. Na zielono wybarwione są neurony, na niebiesko jądra komórkowe, a na czerwono zaznaczona jest luminescencja pochodząca od nanocząstek.

4.2.2.3. Przeżywalność komórek hipokampa po ekspozycji na UCNPs

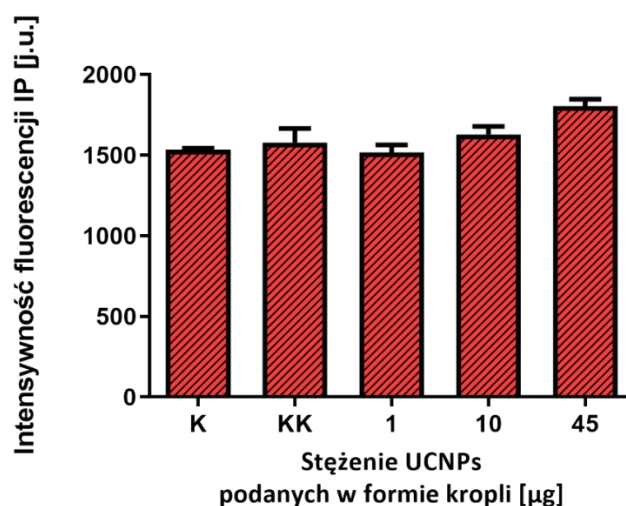
W kolejnych doświadczeniach *ex vivo* zbadano przeżywalność komórek hipokampa metodą przyżyciowego barwienia martwych komórek z użyciem jodku propidyny (PI), a następnie wykonano zdjęcia przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego.

Analizie mikroskopowej poddano skrawki hipokampa eksponowane na wybrane stężenia nanocząstek dodanych bezpośrednio do pożywki hodowlanej oraz podanych w formie kropli na skrawek. Obserwacje nie wykazały uszkodzenia tkanek we wszystkich testowanych stężeniach w stosunku do skrawków nietraktowanych UCNPs (**Rycina 77**).



Rycina 77. Wizualizacja mikroskopowa wpływu różnych stężeń nanocząstek (znajdujących się w pożywce hodowlanej oraz nanocząstek podanych w formie kropli bezpośrednio na skrawek) na śmiertelność komórek hipokampa. Czarną strzałką zaznaczona granica nałożonej kropli. Zdjęcia wykonywane były pod powiększeniem 5x. Pierwszy kanał MERGE- nałożone obrazy, drugi kanał czerwony- PI, trzeci kanał - światło przechodzące mikroskopu świetlnego. Różnice w kolorze pomiędzy kontrolą i stężeniem 45 μg w kropli w stosunku do pozostałych wariantów wynikały z nałożenia innego (niebieskiego) filtra do mikroskopu przy wykonywaniu dokumentacji fotograficznej. Skala – 200 μm

Następnie, w oparciu o uzyskane wyniki z obrazowania fluorescencyjnego, do określenia przeżywalności komórek hipokampa wybrano tylko warianty z nanocząstkami nałożonymi w formie kropli. Po 24-godzinnej inkubacji, nie obserwowano statystycznie istotnego wpływu UCNPów na przeżycie komórek skrawków hipokampa w porównaniu do skrawków kontrolnych, które nie były traktowane UCNPami. Większą śmiertelność komórek obserwowano jedynie w skrawkach eksponowanych na 45 μg (45 $\mu\text{g}/4 \mu\text{l}$) UCNPów. Należy zaznaczyć, że model OHSC jest modelem wymagającym i wysoce wrażliwym na zmiany warunków hodowlanych. Świadczą o tym różnice w przeżywalności skrawków kontrolnych (K), nietraktowanych UCNPami ani pożywką, a skrawkami traktowanymi samą pożywką (KK), bez UCNPów. Wartości na wykresie zostały przedstawione jako maksymalna intensywność fluorescencji jodku propidyny zmierzona w ImageJ (mean gray value) (**Rycina 78**).



Rycina 78. Wpływ UCNPów na śmiertelność komórek skrawków hipokampa. Każda wartość jest średnią uzyskaną z analizy skrawków z czterech powtórzeń dla każdego oznaczenia. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tuckeya, $n=4$; $p>0,05$. Oznaczenia: K – kontrola, którą stanowiły skrawki nietraktowane UCNPami ani pożywką; KK – kontrola, którą stanowiły skrawki traktowane samą pożywką.

5. Dyskusja

Nanotechnologia to wciąż stosunkowo nowa dziedzina nauki, która przyciągnęła uwagę naukowców ze względu na ogromny potencjał i różnorodność zastosowań, od produkcji energii po zastosowania biomedyczne [212-215]. Tak szerokie spektrum różnych dyscyplin i dziedzin życia opartych na nanotechnologii sprawia, że coraz trudniej wyobrazić sobie obszary z nią niezwiązane. W zakresie współczesnej medycyny, strategie oparte na nanotechnologii są coraz częściej wykorzystywane w chirurgii [216-220], kardiologii [221-225], diagnostyce i terapii nowotworów [226-230], identyfikacji molekularnych markerów różnych chorób [231], technologii implantów, czy też projektowaniu nanosystemów przeznaczonych do dostarczania leków [2,213,232-234]. W dobie pandemii nanomateriały wykorzystane są również w badaniach nad koronawirusem SARS-CoV-2 [235-243]. Ze względu na tak intensywny rozwój nauk związanych ze skalą nano (nano-nauk), na bieżąco powstają nowe i niezwykle konkurencyjne obszary takie jak nanomedycyna, nanotoksykologia, czy też chemia powierzchni nanomateriałów, które stają się samodzielnymi dziedzinami nanotechnologii. Tendencja ta narzuca potrzebę wzmocnionych badań nad niekorzystnymi skutkami zastosowania nanostruktur w różnych dziedzinach życia [244].

5.1. Właściwości otrzymanych UCNPs

Na przestrzeni ostatnich lat zostały opracowane liczne strategie syntezy UCNPs domieszkowanych lantanowcami [245,246]. Dobór metody syntezy jest ważnym czynnikiem warunkującym strukturę, skład i właściwości otrzymanych nanomateriałów. Nanokryształy o kontrolowanym kształcie i rozmiarze można selektywnie syntetyzować dobierając odpowiednie parametry i modulując warunki ich wytwarzania, w tym temperaturę i czas reakcji, stężenie użytych prekursorów, środki powierzchniowo czynne, itp. [247,248]. Możliwość kontrolowania syntezy w celu uzyskania monodispersyjnych UCNPs ma kluczowe znaczenie dla ich zastosowania w bioobrazowaniu i terapiach celowanych [247]. Ponadto, nanocząstki przeznaczone do stosowania w biomedycynie wymagają jednorodności pod względem morfologii i wielkości. Uzyskanie idealnie jednorodnej próbki stanowi duże wyzwanie [79,249]. Poszukuje się zatem metod gwarantujących uzyskanie wysokiej jakości UCNPs o wąskim rozkładzie wielkości, dobrej strukturze krystalicznej i znakomitych właściwościach optycznych. Prowadzone przeze mnie badania pozwoliły uzyskać funkcjonalne nanocząstki o określonych cechach fizyko-chemicznych. Nanocząstki domieszkowane jonami

Yb^{3+} oraz Er^{3+} zostały z powodzeniem zsyntetyzowane za pomocą zmodyfikowanej metody współstrącania, zaczerpniętej z literatury [250], co zaprezentowano w publikacji [181]. Zastosowana metoda syntezy pozwoliła dokładnie kontrolować kształt i rozmiar oraz gwarantowała intensywną emisję luminescencji [251]. Stężenia jonów domieszek pary Yb^{3+} - Er^{3+} , wynoszące odpowiednio 20% i 2% wybrano na podstawie dostępnych i aktualnych danych literaturowych, dotyczących nanomateriałów wykazujących konwersję energii w górę, uznanych jako najbardziej efektywne i gwarantujące intensywną emisję luminescencji [120] [252].

Otrzymano UCNPs o rozmiarze ~ 20 nm i wąskim rozrzucie wielkości, co czyniło je optymalnymi dla prowadzonych badań. Średnica NPs poniżej 50 nm jest uważana często za optymalny rozmiar dla efektywnej internalizacji przez komórki nefagocytujące, ze względu na podobieństwo ze strukturami biologicznymi [5,6,232]. Ponadto, zbliżony rozmiar syntetyzowanych UCNPs jest uważany za odpowiedni do zastosowań biomedycznych [253], zapewnia także równomierną funkcjonalizację, co wpływa na mniejszą cytotoksyczność nanomateriałów [254,255]. Zmiany warunków syntezy, np. wydłużenie czasu reakcji zachodzącej w wysokiej temperaturze (330°C) powodowało wzrost nanokryształów w kierunku nanoprętów, natomiast obniżenie temperatury reakcji lub też skrócenie czasu reakcji, prowadziło do uzyskania nanocząstek o mieszanych fazach krystalograficznych (α , β) lub o nieregularnej fazie kubicznej (α) [256-258] (wybrane elektronogramy TEM zostały zamieszczone w *Załączniku nr 4, Ryciny 73-76*). Otrzymano UCNPs o jednolitej fazie heksagonalnej, która została potwierdzona analizą fazową XRD. Pozycje dla pików dyfrakcyjnych pokrywają się z wartościami dla heksagonalnych nanokryształów NaYF_4 , co zgadza się z danymi literaturowymi dla tego typu nanocząstek [259]. Wśród opisanych w literaturze typów UCNPs faza heksagonalna (β) fluorku sodowo-itrowego (NaYF_4) jest jednym z najbardziej wydajnych materiałów konwertujących energię w górę ze względu na niską energię fononów ($\sim 350 \text{ cm}^{-1}$) [66,115,258]. Tak więc synteza umożliwiająca kontrolę fazową w celu uzyskania czystej fazy heksagonalnej nanokryształów NaYF_4 jest kluczowa do zwiększenia wydajności ich luminescencji [260]. W rezultacie ta grupa UCNPs β - NaYF_4 domieszkowanych lantanowcami, o kontrolowanej wielkości, kształcie i fazie wzbudziła bardzo duże zainteresowanie i jest przedmiotem wielu badań pod kątem zastosowań biomedycznych [247,257,258,261]. Opracowanie wysokiej jakości, jednorodnych nanokryształów NaYF_4 o czystej fazie heksagonalnej, uzyskanych metodą współstrącania w wysokiej temperaturze zostało potwierdzone przez wiele grup badawczych [248,262].

Metoda ta charakteryzuje się prostotą syntezy, niskimi kosztami i wysoką czystością uzyskanego produktu [247].

Stabilność fizyczna nanomateriałów jest istotnym czynnikiem mającym wpływ w procesie dołączania ligandów powierzchniowych w celu ich wykorzystania m.in. jako nanosystemów do dostarczania leków. Należy jednak pamiętać, że nawet, jeśli nanostruktury charakteryzują się kontrolowaną morfologią i wysoką wydajnością luminescencji, często nie mogą być wykorzystane w układach biologicznych [81]. Wynika to z faktu, że powszechnie stosowane metody syntezy UCNP, pozwalają na otrzymanie nanocząstek pokrytych ligandem kwasu oleinowego [263,264]. Kwas oleinowy jest środkiem powierzchniowo czynnym, który pomaga kontrolować wzrost nanocząstek podczas syntezy, jednocześnie działając jako rozpuszczalnik [105,197]. Jego obecność zapobiega również agregacji nanocząstek, jednak jest on związkiem wykazującym silne właściwości hydrofobowe, co oznacza, że nanocząstki nie rozpuszczają się w roztworach wodnych [197,249,265-267]. Syntetyczne nanocząstki często ulegają silnej agregacji, co również nie sprzyja zastosowaniom biologicznym [247]. W związku z powyższym stosuje się różne modyfikacje powierzchni nanomateriałów. Polegają one albo na usunięciu kwasu oleinowego z ich powierzchni, albo pokryciu różnymi grupami funkcyjnymi [268-270]. Pokrywanie nanomateriałów warstwą organicznej krzemionki jest najbardziej powszechną i praktyczną metodą, aby uzyskać hydrofilową powierzchnię UCNP. Warstwa krzemionki może być również łatwo modyfikowana poprzez dołączenie różnych grup chemicznych (-COOH, -NH₂, -SH), które umożliwiają dołączenie kolejnych funkcjonalnych związków lub molekuł biologicznych (biokoniugacja) [271-273]. Zmiany wywołane modyfikacją powierzchni nadają nanomateriałom nowych właściwości, takich jak dobra rozpuszczalność w wodzie (hydrofilowość), zmiana ładunku powierzchniowego lub uzyskanie biokompatybilności [108,197]. Korzyści płynące z uniwersalności otoczki krzemionkowej sprawiają, że UCNP@SiO₂ nabywają cech doskonałych nanoplatform do zastosowań teranostycznych [271]. Wcześniej, podejmowano liczne, udane próby opłaszczania nanocząstek NaYF₄ warstwą krzemionki [181,270,271,274-276]. W niniejszej pracy również z powodzeniem przeprowadzono tego rodzaju modyfikację powierzchni badanych nanocząstek. Pokryte warstwą krzemionki UCNP posiadały właściwości hydrofilowe, co umożliwiło ich zastosowanie w przeprowadzonych badaniach biologicznych [181].

5.2. Oddziaływania z komórkami, endocytoza i usuwanie UCNP

W literaturze szeroko opisywana jest efektywna internalizacja nanokryształów NaYF₄ badanych w tej pracy. Badacze pokazali, że UCNP zarówno dodatnio, jak i ujemnie

naładowane mogą być internalizowane przez komórki, pomimo że za najbardziej optymalny ładunek na ich powierzchni uważa się ładunek dodatni. Badania eksperymentalne wykazały, że nanostruktury o ujemnych ładunkach również są zdolne do wnikania do komórek, przechodząc przez ujemnie naładowaną błonę komórkową [277,278]. Potencjał zeta analizowanych nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ po usunięciu liganda kwasu oleinowego był dodatni ($44,7 \pm 1,5$ mV), co koresponduje z wynikami prac innych autorów dotyczących nanocząstek o podobnym rozmiarze i strukturze heksagonalnej ($45,5 \pm 8,7$ mV) [278]. Otoczki powierzchniowe nadają nanocząstkom właściwości hydrofilowe, zapewniają stabilność w roztworach wodnych, a także wpływają na ich oddziaływania z błoną komórkową. Nanocząstki pokryte otoczką SiO_2 były internalizowane, ale przy nieco większych stężeniach. Otoczka była biokompatybilna, gdyż nie obserwowano zmian w morfologii komórek. Internalizacja nanocząstek była jednak niższa, prawdopodobnie ze względu na ich ujemny potencjał powierzchniowy ($-16,6$ mV) [279]. Ujemny potencjał nie dyskwalifikuje zatem badanych nanocząstek do wykorzystania w aplikacjach biomedycznych. Zostało to potwierdzone w 2011 roku przez *Wong i wsp.*, którzy zsyntetyzowali UCNPs, pokrywając je trzema różnymi typami materiałów polimerowych (poliwinylopirolidon - PVP, kwas poliakrylowy - PAA, polietylenoimina - PEI), a następnie oceniali zdolność pobierania tych NPs *in vitro* przez komórki HeLa. Badania wykazały, że dodatnio naładowane UCNPs-PEI są pobierane znacznie efektywniej w porównaniu z pozostałymi typami nanocząstek o innym ładunku powierzchniowym [278].

Na podstawie własnych obserwacji mikroskopowo-elektronowych stwierdzono, że interakcje nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ z komórkami przebiegały według tego samego, powtarzalnego schematu (UCNPs internalizowane były na drodze endocytozy, następnie transportowane w pęcherzykach endocytarnych do endosomów wczesnych, endosomów późnych, a w końcu lizosomów i zostawały usuwane z komórki). Wyniki były powtarzalne bez względu na długość czasu ekspozycji komórek na UCNPs. Wskazuje to na ich duży potencjał do wykorzystania w obrazowaniu biologicznym. Uzyskane w badaniach UCNPs charakteryzowały się również dużą stabilnością, niską toksycznością i bardzo wydajną internalizacją w komórkach HeLa (nieco niższą w komórkach Hek293). Jest to obiecujący wynik dla potencjalnego wykorzystania UCNPs w terapiach nowotworowych [83], ponieważ mikrośrodowisko guza nowotworowego charakteryzuje się występowaniem efektu zwiększonej przepuszczalności naczyniowej i zatrzymywaniem małych i dużych nanocząstek w tkance nowotworowej (ang. *enhanced vascular permeability and retention*, EPR). Stwarza to możliwość transportu nanocząstek z większą selektywnością w obręb zmienionej chorobowo

tkanki, a tym samym ułatwia ich dystrybucję do komórek znajdujących się w środku guza oraz ogranicza ich usuwanie [280-284]. Efekt ten jest szeroko wykorzystany jako nowatorskie podejście w terapiach przeciwnowotworowych opartych o nanomateriały [285], a także oceniany jest w badaniach przedklinicznych nowych nanoleków [84]. Strategie te najczęściej dotyczą znakowania komórek guza za pomocą nanocząstek [286] lub wykorzystania NPs jako nośników leków [131,287]. Do tej pory wykorzystano funkcjonalne UCNPs w terapii PDT w celu wzmocnienia efektu EPR w guzach głęboko osadzonych [84].

Badane w niniejszej pracy nanocząstki zachowywały się bardzo stabilnie w cytoplazmie komórek i nie wykazywały zmian w morfologii. Analiza morfologii oraz obecności nanocząstek w komórkach zarejestrowana przy pomocy mikroskopii elektronowej, dostarczyła rozległej wiedzy z zakresu nauk materiałowych, fizycznych, chemicznych, biologicznych oraz biomedycznych. Wpisuje się to w bardzo aktualne trendy badań dotyczących stabilności nanomateriałów w układach biologicznych. Coraz więcej doniesień literaturowych wskazuje, że nanostruktury pod wpływem działania czynników biologicznych mogą zmieniać swoje właściwości fizykochemiczne. Zróżnicowane warunki panujące w komórkach tj. zmiany pH środowiska endosomalnego (endosomy wczesne pH=6,5, endosomy późne pH=5,5), czy też kwaśne pH oraz wysoki poziom enzymów hydrolitycznych w lizosomach (pH=4,5), mogą negatywnie wpływać na strukturę nanoobjektów, a nawet prowadzić do degradacji całych nanocząstek lub ligandów pokrywających ich powierzchnię [288,289].

Lepsze zrozumienie oddziaływań zachodzących w układzie nanocząstka-komórka jest bardzo istotne nie tylko dla zastosowań biomedycznych, ale również kwestii związanych z bezpieczeństwem stosowanych nanomateriałów. W celu rozwoju bezpiecznych i wydajnych nanosystemów na potrzeby medycyny, należy uwzględnić wiele czynników: (1) właściwości fizykochemiczne NPs (np. rozmiar, kształt, ładunek powierzchniowy i chemia powierzchni) [290]; (2) stabilność koloidalną w roztworach; (3) szybkość degradacji czy usuwania (4) biokompatybilność; (5) bioakumulację; (6) drogę podania (np. dożylna, doustna, inhalacyjna, transdermalna) oraz (7) rodzaj komórki docelowej lub tkanki [291-293].

Mechanizm zaangażowany w pobieranie NPs wpływa bezpośrednio na ich późniejszą lokalizację wewnątrzkomórkową. W związku z tym, zrozumienie dystrybucji NPs i ich lokalizacji w określonych strukturach, jak endosomy, lizosomy lub inne, jest istotne dla opracowania efektywnego systemu dostarczania leków. Takie strategie oparte są na możliwości uwalniania leków pod wpływem zmiany pH środowiska, w którym znajdują się nanocząstki [294].

Obecnie, dostępnych jest kilka metod badania transportu nanocząstek zarówno do, jak i w komórkach. Większość klasycznych podejść opiera się na metodzie zablokowania określonego portalu dla nanocząstek, określając w ten sposób jego udział w pobieraniu NPs do komórek. Takie podejście obejmuje wykorzystanie selektywnych inhibitorów farmakologicznych, interferencji RNA lub przejściowego zablokowania ekspresji kluczowych białek zaangażowanych w endocytozę [295].

Chemiczne inhibitory endocytozy są szeroko stosowane do badania ścieżek endocytozy, specyficznie zaangażowanych w pobieranie nanomateriałów. Ich działanie jest szybkie i często odwracalne po usunięciu inhibitora. Należy jednak mieć na uwadze, że chemiczne inhibitory endocytozy prawie nigdy nie są w stanie w pełni zablokować jednej ścieżki endocytozy, a długa ekspozycja lub zbyt wysokie stężenie może wywoływać toksyczność komórkową [296,297]. W prowadzonych przeze mnie badaniach interakcje zachodzące pomiędzy UCNPs a komórkami badano po 2 godzinach od momentu podania nanocząstek do hodowli komórkowych (poprzedzonych 30 minutową inkubacją z wybranymi inhibitorami endocytozy). Uzyskane wyniki własne, jak również aktualne dane literaturowe wykazały, że był to optymalny czas dla efektywnej internalizacji nanocząstek oraz ekspozycji na inhibitory do oceny procesów endocytozy zachodzących w układzie nanocząstka-komórka [207,298].

Trudno określić dokładny czas działania inhibitorów. Z tego powodu, postanowiono ocenić internalizację UCNPs w obecności wybranych inhibitorów endocytozy (azydek sodu, roztwór sacharozy, temperatura 4°C) przez 1 godzinę. Po tym czasie, komórki HeLa zinternalizowały o ponad połowę mniej UCNPs w przypadku azydku sodu i w 4°C oraz ~30% mniej w przypadku sacharozy w porównaniu do komórek kontrolnych. Jednak, ilość zinternalizowanych UCNPs mogłaby być inna, gdyby ekspozycja na UCNPs i inhibitor trwała przez 2 godziny, tak jak w przypadku kontroli. *Dutta i wsp.* w swoich badaniach obserwowali blokowanie endocytozy w komórkach HeLa po 10 minutach od podania inhibitora. Natomiast przywrócenie komórkom zdolności do ponownej internalizacji następowało po upływie 1 godziny od momentu usunięcia inhibitora [299]. Te obserwacje potwierdzają sensowność w wyborze schematu postępowania z inhibitorami.

Azydek sodu oraz inkubację w niskiej temperaturze zastosowano, aby zahamować wszystkie procesy transportu zależne od energii. Jak powszechnie wiadomo, niska temperatura obniża aktywność metaboliczną komórek, natomiast azydek sodu blokuje wytwarzanie ATP poprzez zakłócanie glikolitycznych i oksydacyjnych szlaków metabolicznych w komórkach. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że pobieranie nanocząstek NaYF₄:20% Yb³⁺, 2% Er³⁺

było procesem zależnym od energii, a jego zahamowanie znacząco ograniczało ich pobieranie przez komórki HeLa.

Zaobserwowano dwa główne mechanizmy endocytozy, przebiegającej z udziałem klatryny oraz z udziałem kaweoli. Świadczą o tym licznie występujące pęcherzyki endocytarne pokryte klatryną, bądź nie. Dodatkowo, obecność nanocząstek obserwowano w zagłębieniach błony komórkowej, we wczesnych endosomach, w późnych endosomach przemieszczających się okolicę okołojądrową oraz w lizosomach. Taki obraz jest charakterystyczny dla endocytarnego transportu wewnątrzkomórkowego nanocząstek zamkniętych po internalizacji w układach pęcherzykowych. Na podstawie jedynie obserwacji TEM, nie można było jednak określić głównego mechanizmu odpowiedzialnego za endocytozę tych nanocząstek. Przedstawione wyniki świadczą o udziale kilku mechanizmów endocytozy, ale aby właściwie ocenić wpływ inhibitorów, potrzebne są starannie dobrane warunki eksperymentu i kontrole (dawka i czas działania inhibitora). To pozwoli wykazać skuteczność w działaniu inhibitorów, a także wykluczyć ich toksyczne działanie.

Uzyskane wyniki dostarczyły również dokładnych informacji na temat lokalizacji badanych nanocząstek. Obserwacje mikroskopowo-elektronowe wykazały, że nanocząstki były przekazywane z endosomów do lizosomów, co może wskazywać na mechanizm obronny komórki, w celu usunięcia nanocząstek z jej wnętrza. Ponadto, nanocząstki były bardzo aktywnie pobierane przez komórki, a wydajny transport do komórek jest podstawowym kryterium przy wyborze nanomateriałów do zastosowań biologicznych. Obecnie wiadomo, że prawie wszystkie nanonośniki pobierane przez komórkę na drodze endocytozy są kierowane głównie do organelli degradujących, znanych jako lizosomy [135,137,138]. Szczególnie, bardzo często kierowane są do lizosomów nanocząstki, które przedostają się do komórki na drodze endocytozy za pośrednictwem klatryny [136,138,140]. Badania lokalizacji jednoznacznie potwierdziły, że bez względu na czas inkubacji UCNPs gromadziły się w endosomach o różnym stopniu dojrzałości (endosomy wczesne, endosomy późne/ciała wielopęcherzykowe). Brak wyraźnej toksyczności wskazuje, że nanocząstki prawdopodobnie były bardzo dynamicznie pobierane i usuwane z komórek. Brak dowodów na ich akumulację w innych organellach komórkowych np. mitochondriach, mogą sugerować brak znaczącego zakłócenia w funkcjach biologicznie związanych z metabolizmem komórki. Jest to ważny wynik odnośnie przyszłego zastosowania nanocząstek jako potencjalnego środka teranostycznego [300]. Jednocześnie uzyskane wyniki wskazują, że UCNPs nie gromadzą się w cytoplazmie komórek, nawet w trakcie ich transportu wewnątrzkomórkowego lub podczas ich usuwania z komórek. Wyklucza to również przenikanie UCNPs przez błonę komórkową

za pomocą transportu biernego, co jest ważną informacją w kontekście ich kontrolowanego dostarczania. Do tej pory jednak ukazały się nieliczne prace dokumentujące mechanizm endocytozy oraz wewnątrzkomórkową obecność nanocząstek NaYF_4 w strukturach endosomów [301]. Jedno badanie przeprowadzone przez *Jin i wsp.* sugerowało, że UCNP pokryte polietylenoiminą (PEI) wnikają do komórek ssaków poprzez endocytozę za pośrednictwem klatryny [278].

Pierwsze doniesienia dotyczące tematu internalizacji wskazywały, że UCNPs są internalizowane najprawdopodobniej na drodze endocytozy, zakładając, że jest to główny mechanizm, na drodze którego nanocząstki są pobierane przez komórki. Sądzone jednak, że jest to niespecyficzna endocytoza, ponieważ na powierzchni nanocząstek nie było żadnych specyficznych ligandów, które mogłyby wiązać się z receptorami na powierzchni błony komórkowej. Biorąc, jednakże pod uwagę typowy rozmiar badanych wówczas UCNPs (ok. 40 nm z powłoką PEG-fosfolipidową), istotnym mechanizmem zaangażowanym w internalizację była prawdopodobnie pinocytoza (z wyjątkiem makropinocytozy), chociaż trudno stwierdzić, czy dotyczyła ona endocytozy za pośrednictwem klatryny, czy też kaweoli [302].

Obecnie wiadomo, że obecność specyficznego liganda na powierzchni NPs nie jest wymagana do tego, aby został aktywowany konkretny szlak endocytozy. Jednakże, jak już wspomniano, jest to wieloczynnikowa zależność i wyniki z badań internalizacji uzyskane dla danego typu NPs nie są uniwersalne dla pozostałych typów nanocząstek.

W przeciwieństwie do wyników przedstawionych w pracy (kolokalizacja z endosomami i lizosomami), *Liab i wsp.*, wykazali lokalizację $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ UCNPs w cytoplazmie, lizosomach lub mitochondriach, zarówno komórek prawidłowych jak i nowotworowych. Według autorów, UCNPs o dodatnim potencjale powierzchniowym przemieszczały się z lizosomów do cytoplazmy, a następnie do mitochondriów [303]. Wydaje się jednak, że na podstawie zaprezentowanych w cytowanej referencji obserwacji w mikroskopie konfokalnym można jedynie spekulować o obecności UCNPs w mitochondriach, ponieważ nie zostało to potwierdzone w innych publikacjach. Ponadto, te same nanocząstki poddano także funkcjonalizacji trzema różnymi polimerami celem uzyskania UCNPs o dodatnim, ujemnym oraz neutralnym potencjale powierzchniowym. Jak w podobnych tego typu doświadczeniach, badacze zaobserwowali proces internalizacji UCNPs zależny od wartości potencjału powierzchniowego, przypisując efektywną internalizację UCNPs o potencjale dodatnim lub neutralnym [303].

W innym badaniu, heksagonalne nie funkcjonalizowane UCNPs $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ (40 nm) oraz po funkcjonalizacji polimerami takimi jak: diwodorofosforan 2-aminoetylu (AEP)

(UCNP-AEP), kwas poliakrylowy (PAA) (UCNP-PAA) oraz polialliloamina (PAAm) (UCNP-PAAm), oceniano na ludzkich komórkach raka piersi MCF-7 i mysich fibroblastach 3T3 ze względu na wartość ich potencjału powierzchniowego, ale bez uwzględnienia ich wewnątrzkomórkowej kolokalizacji. UCNP-PAAm o dodatnim potencjale były najefektywniej pobierane przez komórki, ale także charakteryzowały się największą cytotoksycznością [304]. Niestety, coraz częściej pojawiają się doniesienia, że UCNPs funkcjonalizowane polimerami w celu uzyskania hydrofilowości i biokompatybilności, wykazują większą cytotoksyczność niż UCNPs z niemodyfikowaną powierzchnią (ang. *bare*-UCNPs) [305,306].

W przeprowadzonych przez mnie badaniach, dla uzyskania hydrofilowości i przeniesienia otrzymanych UCNPs z cykloheksanu do wody, wybrano podejście polegające na odłączeniu ligandów kwasu oleinowego z ich powierzchni. Jeśli stosowane grupy powierzchniowe są słabo skoordynowane, to takie UCNPs mogą być potencjalnie toksyczne. Stwierdzono, że w ocenie rzeczywistej toksyczności istotne jest nie tylko rozważenie potencjalnej toksyczności samych nanomateriałów, ale także udziału ligandów powierzchniowych używanych do funkcjonalizacji, a nawet sposobu, w jaki są one wiązane z powierzchnią NPs. W zależności od typu nanocząstek i rozpuszczalnika, w którym są zdyspergowane, obecność odpowiedniego liganda powierzchniowego jest ważna, ponieważ może nie tylko zapewnić stabilność nanocząstek, ale także zapobiegać ich agregacji w roztworze. Wybór odpowiedniego liganda na powierzchni NPs jest uwzględniany przy określaniu ich stabilności, a także coraz częściej, przy ocenie toksycznych skutków w układach biologicznych [264]. Natomiast w przypadku biofunkcjonalizacji nanomateriałów powstaje specyficzne połączenie z wybraną strukturą, bez wywoływania efektu toksyczności komórkowej [307].

Odrębnym zagadnieniem jest usuwanie nanomateriałów z komórek. Jest to proces bardzo trudny do zobrazowania ze względu na specyfikę procedur przygotowania preparatów mikroskopowych. Dotyczy to zwłaszcza preparatyki materiału badawczego do obserwacji mikroskopowo-elektronowych. Zawiera ona liczne wirowania próbki, przez co materiał jest wielokrotnie płukany z pozostałości stosowanych odczynników, a w tym niezinternalizowanych nanocząstek lub tych, które były związane z błoną komórkową. Do tej pory nieliczni badacze udokumentowali ten proces, a obserwacje głównie dotyczyły obrazowania przy pomocy mikroskopu konfokalnego lub fluorescencyjnego oraz pomiaru widm luminescencji z pożywki zebranej z hodowli komórkowej po ekspozycji na NPs (po wcześniejszym usunięciu starej pożywki z niezinternalizowanymi NPs) [301]. Nie wydaje się to jednak zbyt wiarygodną metodą pomiaru obecności NPs, ze względu na ich niewielki

rozmiar, a przez to zdolność do agregacji oraz zachodzące oddziaływania elektrostatyczne, które powodują, że NPs mogą się przyklejać do sprzętu laboratoryjnego (szalki, tipsy, probówki).

Badania nad usuwaniem nanomateriałów z komórek lub tkanek są istotne z punktu widzenia bezpieczeństwa terapii, dlatego strategie ich projektowania powinny uwzględniać degradację nanomateriału lub jego egzocytozę. Ponadto, w przypadku, gdy nie stosuje się biodegradowalnego nanoosiężnika, po spełnieniu swojej funkcji (np. dostarczeniu leku), musi on zostać usunięty z komórki, nawet, jeśli nie jest cytotoksyczny. Jednakże biodegradacja i/lub egzocytota nanomateriałów, często są pomijane w wielu badaniach [308].

Badania interakcji zachodzących pomiędzy nanocząstkami a komórkami są eksperymentami trudnymi w interpretacji, ponieważ jest bardzo dużo zmiennych, które należy brać pod uwagę. Po potwierdzeniu efektywnej internalizacji NPs, dobrze przeprowadzać takie eksperymenty, bazując na krótkich okresach ekspozycji na NPs. Po wielogodzinnej np. 24- lub 48-godzinnej ekspozycji nie można jednoznacznie stwierdzić czy obserwowane nanocząstki w komórce, to NPs, które nie zostały jeszcze z niej usunięte, czy też NPs, które zostały usunięte przez komórkę i zostały przez nią lub sąsiednią komórkę ponownie pobrane. Wraz z długością czasu inkubacji, wzrasta również liczba komórek. Dzielące się komórki prawdopodobnie mogą przekazywać nanocząstki komórkom potomnym. Istnieje także prawdopodobieństwo, że nanocząstki w ogóle nie zostały zinternalizowane przez komórki.

Elektronogramy wykonane po 24-godzinnej inkubacji, wykazały, że komórki nie były przeładowane nanocząstkami. Może to świadczyć, że tylko niewielki procent z podanego stężenia UCNPs jest pobierany przez komórki i zatrzymywany w ich wnętrzu. Efektywny transport nanomateriałów jest ważnym czynnikiem, ponieważ poszukiwane są takie nanostruktury, które po spełnionej funkcji będą łatwo usuwane z organizmu, nie rozpadając się i nie uwalniając toksycznych pierwiastków. Znajomość szlaków transportu UCNPs w komórce umożliwi ich wykorzystanie pod kątem konkretnych zastosowań. Nie ma również ryzyka, że UCNPs będą gromadziły się w mitochondriach, które są centrami energetycznymi komórki, czy też w jądrze komórkowym, generując w ten sposób uszkodzenia komórkowe. Na podstawie testów oceniających żywotność komórek oraz stężenie wolnych rodników, można wnioskować, że obecność badanych nanocząstek w komórkach wywołuje znikomą cytotoksyczność, której nie towarzyszą zmiany ultrastrukturalne. Na podstawie analizy ultrastrukturalnej, można przypuszczać jednak, że obecność UCNPs może aktywować procesy autofagii, co sugerują liczne figury autofagalne (autofagolizosomy).

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, badania przeprowadzone na potrzeby pracy pozwoliły na pierwszą, tak wnikliwą wizualizację subkomórkowej lokalizacji nanocząstek

NaYF₄ wykonaną przy pomocy obserwacji mikroskopowo-elektronowych. Do tej pory głównie lokalizację nanocząstek NaYF₄ udokumentowano głównie przy pomocy technik mikroskopii fluorescencyjnej lub konfokalnej [74,309,310], a w momencie planowania badań nie było informacji na temat dokładnej kolokalizacji UCNPs. Aktualnie pojawiają się prace na temat wewnątrzkomórkowej lokalizacji UCNPs zgodne z naszymi wynikami [300]. Ponadto, dotychczasowe badania oparte na UCNPs stosowane do pomiaru wewnątrzkomórkowego pH nie określały ilościowo kolokalizacji z endosomami lub lizosomami ani nie badały mechanizmów endocytozy tych nanomateriałów. Autorzy bazując na wcześniejszych doniesieniach, w których zakładano, że UCNPs są internalizowane na drodze endocytozy za pośrednictwem klatryny [91], sugerują jednak, że modyfikacja nanocząstek poprzez dołączenie do ich powierzchni np. barwnika może wpływać na proces pobierania (szlak endocytozy), co jest spójne z aktualnymi założeniami. Znajomość mechanizmu pobierania nanocząstek z barwnikiem przez komórki jest bardzo istotna, ponieważ pozwala na monitorowanie dostarczania leków w badaniach. Zaprojektowane w tym celu nanoczuJNIKI, które wykorzystywałyby szlak endocytozy za pośrednictwem klatryny, nie byłyby w stanie wykryć pH w endosomach lub lizosomach zawierających leki wchodzące poprzez szlak endocytozy za pośrednictwem kaweoli [298].

Dostępne dane wskazują, że nadal brakuje informacji na temat szczegółowych mechanizmów endocytarnych aktywowanych dla danego typu NPs. Głównym problemem jest niespójność wyników badań prowadzonych w różnych ośrodkach, co jest odzwierciedleniem złożonych oddziaływań zachodzących pomiędzy nanomateriałami a układami biologicznymi, a także bardzo odmiennych właściwości fizykochemicznych różnych typów NPs. Wybór optymalnego eksperymentu do oceny tych oddziaływań jest niezwykle istotny. Należy wziąć pod uwagę wybór linii komórkowej i wprowadzenie bardziej selektywnych inhibitorów endocytozy, a także precyzyjne ilościowe oznaczenie wewnątrzkomórkowej liczby NPs oraz ich lokalizacji subkomórkowej. W takiej konfiguracji eksperymentalnej połączenie różnych podejść do oceny pobierania nanocząstek i aktywacji specyficznych ścieżek endocytozy jest wysoce uzasadnione. Większość inhibitorów może wpływać jednocześnie na inne szlaki endocytozy, a sama ekspozycja na inhibitory może wywoływać działanie cytotoksyczne [291]. Co więcej, nawet dla tego samego typu NPs, chemiczne modyfikacje powierzchni (różne grupy chemiczne na powierzchni), dołączanie różnych ligandów (w celu zwiększenia ukierunkowania komórkowego, ang. *cellular targeting*) mogą znacznie zmieniać drogę „wejścia” (ang. *cellular entry pathway*). Bardzo utrudnia to przewidywanie tempa i zakresu transportu do komórek NPs o odmiennym charakterze fizyko-chemicznym. Ponadto, NPs o tych samych modyfikacjach

chemicznych (cechach fizyko-chemicznych) mogą być inaczej pobierane przez różne typy komórek. Ten fakt może być związany z różnym składem lipidów, białek i węglowodanów zewnętrznej części błony komórkowej w komórkach różnego pochodzenia. To dodatkowo komplikuje opracowanie wspólnych zasad, których należy przestrzegać, aby projektować wydajne i bezpieczne NPs [139]. W przyszłości projektowanie wydajnych nanosystemów dostarczania leków powinno się opierać na doborze odpowiednich grup funkcyjnych na powierzchni NPs, istotnych dla ich pobierania. Należy również brać pod uwagę drogi aktywacji uruchomione przy selektywnym dostarczaniu NPs do określonych typów komórek.

Przyszłość w zakresie udoskonalenia celowanych terapii w nanomedycynie opiera się na projektowaniu nowych narzędzi badawczych zdolnych do przewyciężenia pozostałych luk w wiedzy, związanych ze złożonymi oddziaływaniami nanocząstka-układ biologiczny (nano-bio), procesami ich endocytozy oraz dokładnym rozróżnieniu między ścieżkami endocytozy. Główne ograniczenia w stosowaniu NPs *in vivo* do celów biomedycznych, wynikają z istnienia wielu czynników, często pomijanych w badaniach *in vitro* (wyższa zawartość i większa złożoność surowicy, przepływ krwi [311]). Dokładna analiza potencjalnych interakcji nanocząstek z substancjami obecnymi w fizjologicznym mikrośrodkowisku jest kluczowa do udoskonalenia ich dostarczania *in vivo*. Świadomość wieloczynnikowych zależności oraz dogłębne zrozumienie interakcji nano-bio, a także sposób, w jaki zachodzi internalizacji NPs, są kluczowe dla pomyślnego wdrożenia nanocząstek w nanomedycynie [291].

5.3. Cytotoksyczność UCNPs *in vitro* i *in vivo*

Liczne badania dedykowano ocenie potencjalnie toksycznego wpływu nanocząstek konwertujących energię w górę NaYF_4 w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* sugerując niski indeks toksyczności [74,300,309,312,313]. Badania cytotoxyczności w niniejszej pracy przeprowadzono w znacznie szerszym zakresie niż rutynowo opisywane w literaturze testy żywotności komórek. Oprócz trzech testów cytotoxyczności (MTT, Presto Blue, Live/Dead), dokonano dodatkowo analizy ultrastrukturalnej poszczególnych komponentów komórkowych. Uzyskane wyniki pokazały, że nanocząstki $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ wywoływały znikomą cytotoxyczność, której nie towarzyszyły znaczące zmiany morfologiczne w badanych liniach komórkowych i w zakresie testowanych stężeń. Wybrane do pracy stężenia UCNPs $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ były znacznie niższe od tych opisywanych w literaturze, a ich wybór podyktowany był wynikami uzyskanymi na podstawie oceny mikroskopowo-elektronowej oraz w mikroskopie konfokalnym. W przedstawionych elektronogramach komórek, nanocząstki (o optymalnym stężeniu 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zawsze były obserwowane w ich wnętrzu. Oznacza to,

że we wnętrzu całej komórki występowało znacznie więcej nanocząstek niż to ilustrują przedstawione obrazy (będące jedynie pojedynczą płaszczyzną uzyskaną z przekroju całej komórki). Porównywalnie, w analizie konfokalnej wykazano obecność nanocząstek (1 µg/ml) dzięki unikalnym właściwościom luminescencyjnym po pobudzeniu laserem podczerwonym (980 nm). W związku z uzyskanymi wynikami mikroskopowymi, nie wydaje się zasadnym celowe przeładowanie komórki bardzo wysokimi stężeniami, co miałyby wpływ na ich toksyczność. Zbyt wysokie dawki testowane w badaniach *in vitro* na komórkach nie znajdują również wiarygodnego przełożenia w układach *in vivo*.

Przeprowadzone do tej pory badania, mające na celu określenie potencjalnej toksyczności nanocząstek *in vivo*, dotyczyły głównie małych zwierząt [312-315] i roślin [316,317]. Natomiast, badania nad biodystrybucją UCNPs NaYF₄:Yb,Er@SiO₂ *in vivo* wykazały zależność od drogi podania nanocząstek. Zhou i wsp. dowiedli, że NaYF₄:Yb,Er@SiO₂ po podaniu doustnym głównie kumulowały się w kościach, żołądku i jelitach, podczas gdy podane dożylnie obserwowane były w wątrobie i śledzionie [313].

5.4. Oddziaływania UCNPs z komórkami skrawków hipokampa

Organotypowe hodowle skrawków mózgu są użytecznym narzędziem pozwalającym na badanie procesów fizjologicznych i farmakologicznych właściwości testowanych substancji w tkankach [318], mechanizmów komórkowych i molekularnych leżących u podstaw zaburzeń CNS oraz oceny potencjalnych metod leczenia takich chorób [319]. Ponadto, modele skrawków mózgu mają przewagę nad innymi modelami *in vitro*, ponieważ zachowują cytoarchitekturę i mikrośrodowisko tkanki *in vivo*. Najczęściej hodowanym w warunkach *in vitro* obszarem mózgu jest hipokamp [318]. Zastosowanie modeli, takich jak eksplanty tkankowe (skrawki), wydaje się być doskonałym etapem pośrednim do obserwacji zmian wywołanych obecnością nanomateriałów w tkankach i testowania nowych strategii terapeutycznych *in vitro* (dobrze odzwierciedlają badania *in vivo*). Taki model eksperymentalny pozwala uzyskać informacje na temat procesów zachodzących w warunkach kontrolowanych. Jednocześnie jest bardziej zaawansowaną formą modelu badawczego niż model *in vitro*. Zastosowanie eksperymentalnego modelu *ex vivo* umożliwia porównanie zjawisk zachodzących w strukturze tkanek w warunkach pozaustrojowych. Model OHSC zapewnia kompleksowe zbadanie interakcji, nie tylko często badanych w tym kontekście neuronów, ale również całej tkanki nerwowej *ex vivo*. Poznanie mechanizmów internalizacji nanocząstek oraz ich wpływu na morfologię tkanek, jest kluczowe dla rozwoju nowych terapii komórkowych chorób związanych z tym obszarem mózgu. Mając to na uwadze, zaprojektowanie i uzyskanie

nanocząstek pełniących funkcję nano-systemów dostarczania substancji aktywnych do mózgu w kontrolowany sposób, mogłoby poprawić skuteczność stosowanych terapii.

Celem potwierdzenia możliwości internalizacji UCNPs przez inne typy komórek niż HeLa i HEK293, dokonano analizy mikroskopowo-elektronowej w modelu organotypowej hodowli skrawków hipokampa (OHSC). Ze względu na to, zbadano wpływ UCNPs na komórki skrawków hipokampa w kilku wariantach (UCNPs w pożywce hodowlanej lub nałożone na górną powierzchnię skrawków) i w zakresie różnych stężeń nanocząstek. W wariancie z UCNPs znajdującymi się w pożywce, internalizację nanocząstek obserwowano jedynie w przypadku hodowli zawierających ich wysokie stężenia (powyżej 10 $\mu\text{g/ml}$). Natomiast w wariancie bezpośredniego podania UCNPs na skrawki, uzyskano wyniki wskazujące na aktywną internalizację badanych nanocząstek w zakresie wszystkich testowanych stężeń. Analiza uzyskanych obrazów mikroskopowo-elektronowych po 24-godzinnej inkubacji skrawków z nanocząstkami dodanymi w stężeniu 10 μg do pożywki hodowlanej, wykazała również znaczną akumulację dużych kompleksów UCNPs, które nie zostały zinternalizowane przez komórki. Wydaje się być to związane z utrudnionym dostępem nanocząstek z pożywki do skrawków. Obecność dużych kompleksów nanocząstek poza komórkami, mogła być również związana z krótkim czasem inkubacji, przez co większość nanocząstek prawdopodobnie nie zdążyła wejść w kontakt z komórkami. Na uwagę zasługuje jednak fakt, że analizowane nanostruktury znajdowały się w bliskim sąsiedztwie komórek i pomiędzy nimi, co sugeruje prawdopodobieństwo oddziaływań z receptorami znajdującymi się w błonie komórkowej prowadzącą w następstwie do ich internalizacji. Przemawia za tym fakt obecności zagłębień w błonie komórkowej w miejscach kontaktu z nanocząstkami.

Zastosowany wariant z bezpośrednim nałożeniem nanocząstek na skrawek, okazał się skuteczny i efektywny. Uzyskane elektronogramy potwierdziły również występowanie dużych skupisk nanocząstek zamkniętych wewnątrz struktur pęcherzyków obecnych w komórkach nerwowych. Nanocząstki występowały w endosomach wczesnych, a także endosomach późnych. Obecność nanocząstek wykazano również wewnątrz lizosomów oraz dużych autofagolizosomów. Podobnie, jak w modelu *in vitro* nie obserwowano obecności „wolno” występujących nanostruktur w cytoplazmie, ani w innych organelach czy też jądrze komórkowym. Taki obraz wskazuje, że nanocząstki były transportowane do wnętrza komórek na drodze procesu endocytozy, co sugerują nie tylko liczne pęcherzyki i pęcherzyki (endosomy) zawierające UCNPs, ale również pofałdowana błona komórkowa z licznymi zagłębieniami w miejscach kontaktu z nanocząstkami. Tak licznym zmianom w strukturze błony komórkowej świadczącym o aktywnie zachodzącym procesie endocytozy nie obserwowano w skrawkach

nietraktowanych nanocząstkami. Internalizacja nanocząstek przebiegała prawdopodobnie głównie na drodze endocytozy klatrynozależnej oraz endocytozy za pośrednictwem kaweoli, na co wskazują zagłębienia w błonie komórkowej z charakterystyczną warstwą klatryny dookoła formującego się pęcherzyka, oraz tworzące się zagłębienia w postaci kaweoli.

Przeprowadzone obserwacje pozwoliły na sformułowanie hipotezy, że w zastosowanym modelu OHSC nanocząstki NaYF_4 są pobierane przez komórki hipokampa, jedynie w warunkach swobodnego i nieograniczonego technicznie dostępu do tkanki. Uzyskany wynik pozwala przypuszczać, że opracowany system dostarczania nanocząstek z wykorzystaniem modelu OHSC może stać się skuteczną metodą do testowania różnych strategii terapeutycznych chorób neurologicznych z wykorzystaniem nanostruktur. Duże nadzieje, dotyczące zastosowań UCNPs pokłada się w możliwości obrazowania mózgu, ze względu na ich wyjątkowe właściwości optyczne, umożliwiające obrazowanie na głębokości poniżej centymetra w żywej tkance. Dodatkowo, badany materiał (zatopiony fragment tkanki hipokampa w bloczku z żywicy epoksydowej) dokrajano kilkakrotnie, aby na podstawie analizy wyników dotyczących różnic w pobieraniu UCNPs we fragmentach pochodzących z głębszych rejonów analizowanej próbki, potwierdzić ich obecność i dystrybucję do głębszych rejonów skrawka. Pojedynczy, analizowany elektronogram TEM komórek skrawków hipokampa jest jedną płaszczyzną o grubości ok. 40-60 nm z przekroju poprzecznego fragmentu badanej tkanki o łącznej grubości 400 μm . Pozwoliło to stwierdzić, że nanocząstki (podane w wysokich stężeniach) nie tylko są dynamicznie pobierane przez komórki, ale również transportowane w jej głębsze poziomy. Ponadto, duże aglomeraty niezinternalizowanych nanocząstek zgromadziły się pomiędzy wolnymi przestrzeniami wokół komórek. Brak jest dostępnych w literaturze badań dotyczących obserwacji mikroskopowo-elektronowych, w których możemy dogłębnie ocenić morfologię skrawków eksponowanych na nanomateriały. Dotyczy to również informacji uwzględniających wewnątrzkomórkową lokalizację. Nieliczne prace potwierdziły obecność nanocząstek w hodowli skrawków hipokampa przy pomocy TEM. Badania te dotyczyły kropek kwantowych biofunkcjonalizowanych peptydem Pam11 (CL4 QD-Palm1), który specyficznie wiązał się z neuronami [320], w badaniach nad neuroprotekcijnym mechanizmem działania nanocząstek CeO_2 na skrawkach hipokampa w mysim modelu niedokrwienia mózgu [321], także dystrybucji niepokrytych żadnym ligandem powierzchniowym nanocząstek srebra (AgNPs), które lokalizowały się w cytoplazmie komórek (OHSC szczura) [322].

Wyniki badań własnych nad dystrybucją UCNPs w hodowli skrawków hipokampa wykazały, że zdolność do penetracji komórek skrawków i efektywność pobierania

otrzymywanych nanomateriałów są cechą naturalną nanocząstek do swobodnego wchodzenia do komórek i akumulacji w wybranych organellach wewnątrzkomórkowych. Taka analiza na podstawie rekonstrukcji przekroju tkanki pozwala uzyskać znacznie więcej obserwacji i wyników niż obrazowanie innymi metodami (np. mikroskopia konfokalna), co oznacza, że obrazowanie z wykorzystaniem TEM jest kluczową techniką i tzw. złotym standardem (ang. *gold standard*) w analizach mikroskopowych obiektów o rozmiarach nanometrycznych.

W kolejnym etapie eksperymentu przy pomocy transmisyjnej mikroskopii elektronowej została oceniona morfologia i cechy ultrastrukturalne elementów komórkowych skrawków po ekspozycji na wybrane stężenia nanocząstek. Obecność UCNPs w komórkach skrawka wiązała się z niewielką toksycznością w zakresie testowanych stężeń i długości czasu ekspozycji na nanocząstki. Należy także uwzględnić fakt, że zastosowany model jest wysoce wymagający i bardzo czuły na wszelkie zmiany w hodowli. Dlatego, ze względu na liczne trudności techniczne i utrzymanie hodowli skrawków w dobrej kondycji na czas trwania eksperymentów, zdecydowano się na przeprowadzenie analiz tylko na tygodniowych skrawkach i czasowej inkubacji z UCNPs nie dłuższej niż 24 godziny. Podjęte próby dłuższej ekspozycji skrawków na UCNPs, wykonane na 2-tygodniowych skrawkach oraz poddane 48-godzinnej ekspozycji, łącznie z wariantami kontrolnymi (bez nanocząstek) były niemożliwe do oceny ze względu na niezadowalającą jakość skrawków. Przy czym, wszystkie warianty eksperymentalne wykonywane były w co najmniej trzech powtórzeniach.

Przy wyższych stężeniach nanocząstek obserwowano zwiększoną liczbę lizosomów i autofagolizosomów, co z dużym prawdopodobieństwem sugeruje, że obecność UCNPs w jakiś sposób mogła wpływać na indukcję procesów autofagii w komórkach nerwowych.

Na podstawie prezentowanych wyników można stwierdzić, że UCNPs wykazują wyraźny potencjał do wnikania do komórek skrawków hipokampa. Rozkład przestrzenny UCNPs we wnętrzu komórek był ściśle związany z dynamiką procesów zachodzących wewnątrz komórki oraz predyspozycji UCNPs do lokalizowania się wyłącznie w określonych organellach wewnątrzkomórkowych jak endosomy i lizosomy. Taki model może być użyteczny do potwierdzenia obecności UCNPs, badań ich biodystrybucji na poziomie tkanki, a także oceny zmian temu towarzyszących. Jednocześnie, ze względu na ograniczenia techniczne i krótki okres utrzymania skrawków w hodowli w dobrej kondycji, wysoce zasadnym wydaje się planowanie dalszych eksperymentów wyłącznie na bio-funkcjonalnych UCNPs. Takie celowane traktowanie biofunkcjonalnymi UCNPs w odniesieniu do całej tkanki lub wybranych typów komórek i względem konkretnych zastosowań jak terapia chorób układu nerwowego czy

w badaniach nad neurotoksycznością, odniosłoby bardziej pozytywny skutek. Natomiast na tym etapie, badania na niefunkcjonalizowanych UCNPs zostały wyczerpane.

Uzyskane wyniki pokazały, że każdy etap analiz powinien uwzględniać szczegółowe badania, aby wyeliminować ryzyko toksyczności nanomateriałów, szczególnie w klinice. Nanocząstki powinny zostać dokładnie scharakteryzowane i być szczegółowo badane w układach biologicznych na każdym etapie planowania eksperymentów. Jednocześnie, uzyskane wyniki są bardzo atrakcyjnym aspektem w obrazowaniu biologicznym fragmentów tkanek *ex vivo*, z wykorzystaniem unikalnych właściwości spektroskopowych UCNPs.

5.5. TEM w obrazowaniu oddziaływań nano-bio

Stosowanie nanocząstek do celowanego dostarczania leków do komórek przewidywane było jako prawdziwy przełom XXI wieku w doskonaleniu profilaktyki, diagnozy i terapii różnych chorób. Jednakże, wraz z rozwojem nanomedycyny badacze mierzą się z licznymi problemami. Ograniczenia te dotyczą głównie technik obrazowania na poziomie nanoskali jak również ilościowego oznaczania nanocząstek w biologicznym środowisku komórki. W związku z powyższym, potrzebne są nowe i ulepszone techniki do ilościowego określania interakcji między nanocząstkami, aby umożliwić porównywanie uzyskanych danych oraz przyspieszyć rozwój funkcjonalnych nanocząstek. Interakcje między nanocząstkami a komórkami są zazwyczaj wizualizowane za pomocą mikroskopii konfokalnej lub transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Mikroskopia konfokalna pozwala na wielokolorowe obrazowanie 3D komórek, ale jest ograniczona rozdzielczością optyczną (≈ 200 nm), co uniemożliwia obserwację pojedynczych nanocząstek. Tymczasem, TEM oferuje doskonałą rozdzielczość (≈ 1 nm), która umożliwia badanie nanocząstek i struktur subkomórkowych z dużą szczegółowością [323]. Dzięki rozdzielczości bliskiej atomów [324], analiza TEM jest niezastąpionym narzędziem szeroko stosowanym do badania właściwości fizykochemicznych nanocząstek oraz mechanizmów internalizacji nanocząstek i ich bezpośredniej lokalizacji wewnątrzkomórkowej [254,300,325,326]. TEM jest w stanie wykryć nawet pojedyncze nanostruktury, a nawet określić liczbę nanocząstek na każdym uzyskanym obrazie, co jest niemożliwe do wykrycia standardowymi metodami mikroskopii świetlnej.

Główną zaletą badań prowadzonych z wykorzystaniem technik mikroskopii elektronowej jest możliwość dogłębnego zbadania wpływu nanocząstek na komórki, ich interakcji z błonami i organellami komórkowymi [327,328]. Wysoka rozdzielczość obrazowania w mikroskopie elektronowym dostarcza bezpośrednich informacji na temat stanu agregacji nanocząstek na terenie komórki, co jest trudne do osiągnięcia innymi metodami.

Możliwość oceny morfologii (kształtu) nanocząstek w określonych organellach jest dodatkowym i potężnym narzędziem dostarczającym wiedzy o losie nanostruktur, np. ich degradacji [329]. Obrazowanie za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej ujawniło około 150 razy więcej NPs /komórkę niż przy użyciu laserowej mikroskopii skaningowej [330]. Ponadto, TEM umożliwia bezpośrednie rozróżnienie między nanocząstkami znajdującymi się wewnątrz komórek, poza komórkami, a także obecnych w strukturach wewnątrzkomórkowych [331]. TEM można wykorzystać również do badania oddziaływań nanocząstek z organellami komórkowymi oraz do oceny ich morfologii [332].

Nowe osiągnięcia i stosowane metody pomiarów, znacznie ulepszone protokoły przygotowania materiału, a także rosnące możliwości nowoczesnych metod mikroskopowo-elektronowych dają nadzieję na kolejne osiągnięcia badawcze w tej dziedzinie. Prognozuje się, że rola TEM w analizie nanomateriałów w układach biologicznych będzie kluczowa i jeszcze ważniejsza w najbliższej przyszłości. Ponadto, badanie cech ultrastrukturalnych przyczyni się do dalszego pogłębiania wiedzy na temat odpowiedzi komórkowej, co zapewni lepsze strategie projektowania różnych systemów nanocząstek (nanosystemów), w szczególności do zastosowań w dostarczaniu leków [329]. Co więcej, postępy w technikach obrazowania do analizy subkomórkowej mogą dostarczyć nowych, cennych informacji na temat nano-bio interakcji zachodzących na powierzchni komórki i w jej subkomórkowych przedziałach znalezionych na obrazach mikroskopowych. Jednakże w celu uzyskania rzetelnej oceny interakcji nanocząstek z komórkami, zaleca się łączyć różne metody dające komplementarne wyniki [333].

Podsumowując, pomimo licznych badań nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$, dotyczących zarówno funkcjonalizacji, oddziaływań z komórkami, cytotoksyczności, podtrzymujących relatywnie ich niską toksyczność wciąż pozostają one przedmiotem dyskusji.

Nie istnieją również żadne uniwersalne metodologie dotyczące badań nanomateriałów. Protokół funkcjonalizacji nanomateriałów, który działa dobrze dla jednego typu, może być nieskuteczny dla pozostałych. Wynika to z różnic nanomateriałów pod względem wielkości, ładunku, pola powierzchni, stabilności koloidalnej, gęstości, grup reaktywnych na powierzchni i innych właściwości. To samo dotyczy interakcji zachodzących w układzie nanocząstka-komórka, gdzie również należy brać pod uwagę złożone wieloczynnikowe zależności występujące pomiędzy nanostrukturami a systemami biologicznymi.

Podsumowanie

W pracy przedstawiono wyniki badań mających na celu określenie właściwości nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ do zastosowań bio-medycznych. Na potrzeby prowadzonych badań dokonano syntezy nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$, a następnie scharakteryzowano ich właściwości fizykochemiczne. Otrzymane metodą współstrącania z roztworu jednorodnego nanostruktury zostały oparte o nanokrystaliczne matryce fluorkowe metali ziem rzadkich (Y), domieszkowane jonami lantanowców (Yb^{3+} , Er^{3+}). Uzyskane nanomateriały zostały zoptymalizowane pod względem morfologii, posiadały heksagonalny kształt, nanometryczny rozmiar poniżej 30 nm oraz hydrofilowy charakter, co pozwoliło na przeprowadzenie analiz biologicznych.

W kolejnym etapie badań, testowane nanocząstki $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ oceniano względem żywych komórek na poziomie *in vitro*, aby zbadać powiązania pomiędzy nanocząstkami, a powszechnie stosowanymi dwiema (różnymi) modelowymi liniami komórkowymi. Głównym celem badań biologicznych była ocena funkcjonalności i efektywności samodzielnie wytworzonych, o danej morfologii i właściwościach fizykochemicznych nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ w układach *in vitro*. Badania biologiczne przeprowadzone na liniach komórkowych głównie skupiały się na ocenie potencjalnego toksycznego wpływu oraz określeniu mechanizmów internalizacji komórkowej. Badania cytotoksyczności nanocząstek stanowią jeden z podstawowych etapów w badaniach nad wykorzystaniem nanocząstek do zastosowań biomedycznych i obok badań nad mechanizmami pobierania, są najważniejszym parametrem kwalifikującym do przeprowadzenia analiz na doświadczalnych modelach biologicznych. Ponieważ intensywnie poszukiwane są nanomateriały wielofunkcyjne, które mają spełniać sprecyzowane funkcje w organizmie, efektywny transport do wnętrza komórek i biokompatybilność z materiałem biologicznym są kryteriami gwarantującymi zasadność prowadzonych badań.

Analiza profilu cytotoksyczności została wykonana dla szerokiego zakresu stężeń nanocząstek po 24 i 48 godzinach inkubacji z komórkami, pochodzącymi z linii nowotworowej HeLa oraz prawidłowej HEK293. W wyniku przeprowadzonych testów cytotoksyczności (testy MTT, PrestoBlue, Live/Dead) stwierdzono znikomy cytotoksyczny charakter nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ oraz zbliżony stosunek komórek żywych do martwych w zakresie wszystkich testowanych stężeń. Podobne wyniki odnotowano dla pomiaru wybranych parametrów stresu oksydacyjnego.

Przy pomocy TEM prześlędzono szczegółowo drogę wnikania nanocząstek do komórek oraz zbadano ich lokalizację wewnątrzkomórkową. Takie podejście pomogło zrozumieć oddziaływania zachodzące pomiędzy nanocząstkami, a komórkami na poziomie pojedynczej komórki. Nanocząstki internalizowane były na drodze endocytozy, a następnie obserwowane we wnętrzu wczesnych i późnych endosomów oraz lizosomów. Nie potwierdzono ich obecności w innych organellach komórkowych i jądrze komórkowym, nie były także uwalniane do cytoplazmy pod wpływem działania niesprzyjających, kwaśnych enzymów lizosomalnych. W środowisku biologicznym zachowywały się bardzo stabilnie, zachowały swoją morfologię oraz właściwości spektroskopowe. Głównymi mechanizmami zaangażowanymi w pobieranie nanocząstek była endocytoza klatrynozależna oraz endocytoza za pośrednictwem kaweoli. Natomiast, największe zahamowanie procesu endocytozy dla nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ zaobserwowano w obecności hipertonicznego roztworu sacharozy oraz pod wpływem działania niskiej temperatury. Te dwa czynniki są głównymi inhibitorami odpowiedzialnymi za hamowanie odpowiednio, transportu aktywnego oraz mechanizmów zależnych od energii. Potwierdza to dodatkowo wcześniejszą hipotezę, zakładającą udział procesu endocytozy, który jest formą transportu aktywnego i wymaga nakładu energii pod postacią ATP do internalizacji nanocząstek. Sugeruje to również dużą złożoność procesów leżących u podłoża internalizacji nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ i braku jednego, głównego mechanizmu endocytozy zaangażowanego w ich pobieranie. Niemniej jednak, dane z ilościowych pomiarów ICP-MS zestawione z wnikliwą analizą mikroskopowo-elektronową, uwzględniającą zmiany w obrazie morfologicznym komórek eksponowanych na UCNPs, pozwoliły na rzetelną i wiarygodną interpretację tych wyników. Zmiany te związane były z występowaniem licznych zagłębień z klatryną bądź bez klatryny w błonie komórkowej, obecnością licznych pęcherzyków endocytarnych oraz endosomów w cytoplazmie komórki, kolokalizację subkomórkową tylko z określonymi strukturami, jak wczesne i późne endosomy oraz lizosomy, a także z obecnością UCNPs lub ich obniżoną internalizacją pod wpływem działania wybranych inhibitorów endocytozy. Podobnie, przeprowadzone obserwacje konfokalne potwierdziły efektywne wnikanie nanocząstek do komórek, z uwzględnieniem ich kolokalizacji z tymi samymi strukturami (endosomy wczesne, endosomy późne, lizosomy), a także ich właściwości luminescencyjne w obrazowaniu biologicznym na poziomie *in vitro*.

Badania internalizacji nanocząstek przeprowadzono również na szczurzym modelu *ex vivo* organotypowej hodowli skrawków hipokampa, poddanych czasowej inkubacji z wybranymi stężeniami nanocząstek. W wyniku przeprowadzonych analiz (TEM, mikroskop konfokalny) potwierdzono aktywną internalizację nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 2\% \text{Er}^{3+}$ przez

komórki hipokampa, ich biodystrybucję (analiza *Z-stack*) na poziomie skrawka oraz, tak jak w komórkach HeLa oraz HEK, ich gromadzenie się w endosomach i lizosomach. Badania toksyczności (barwienie jodkiem propidyny, analiza TEM) nie potwierdziły znaczącego, negatywnego wpływu na przeżywalność i ultrastrukturę komórek skrawka.

Realizacja badań umożliwiła pozyskanie danych na temat efektywnego sposobu otrzymywania badanych nanostruktur oraz ich właściwości spektroskopowych i strukturalnych. Poza informacjami na temat charakterystyki nanocząstek, najwięcej danych uzyskano odnośnie mechanizmów internalizacji, cytotoksyczności i ich zachowania w układach *in vitro*, w szczególności dotyczących ich lokalizacji oraz stabilności w komórkach pod wpływem zmian pH środowiska, w którym przebywały. Po uzyskaniu zadowalających wyników z części fizyko-chemicznej i biologicznej, nanocząstki można określić, jako funkcjonalne i bezpieczne (w ocenianym zakresie). Natomiast, potencjał analizowanych nanocząstek do zastosowań bio-medycznych można ocenić bardzo wysoko. Ze względu na wiele wciąż istniejących niejasności, należy podkreślić, że jest to stosunkowo mało poznana tematyka i w momencie planowania badań istniało niewiele informacji na temat interakcji zachodzących w układzie nanocząstka-komórka.

Uzyskane wyniki należy rozpatrywać jedynie w zastosowanym układzie. W oparciu o dane literaturowe należy mieć na uwadze, że każdy typ nanostruktur oraz komórek posiada określone cechy, które określają ich wzajemne interakcje, zachodzące w tym układzie. Zrozumienie interakcji zachodzących w układzie nanocząstka-komórka wymaga indywidualnego podejścia i jest ściśle charakterystyczne dla danego rodzaju i formy nanocząstek (kształt, wielkość, pokrycie, ładunek powierzchniowy) oraz typu testowanej linii komórkowej (wieloczynnikowa zależność). Wyniki te nie są uniwersalne dla wszystkich nanocząstek. W związku z tym, po analizie uzyskanych wyników wydaje się być wysoce zasadnym i obowiązkowym wykonywanie kontroli nanomateriałów (charakterystyki fizykochemicznej i badań biologicznych) po każdej syntezie i każdej modyfikacji powierzchni nanocząstek, (pod kątem ustalenia stosowanej dawki, czasu niezbędnego do efektywnej internalizacji, analizy profilu cytotoksyczności oraz analizy zmian w morfologii nanomateriałów mogących wystąpić w czasie w środowisku biologicznym), co gwarantuje zachowanie najwyższych standardów pracy i uzyskanie wiarygodnych wyników.

Badania te mogą przyczynić się znacząco do rozwoju prac nad otrzymywaniem UCNPs oraz być inspiracją przy projektowaniu nowych, wysoce funkcjonalnych nanomateriałów o bardzo dobrych właściwościach optycznych i niskim indeksie cytotoksyczności. Ma to bezpośrednie przełożenie na ich potencjalne wykorzystanie w bio-medycynie. Możliwość

zaprojektowania i wykorzystania wielofunkcyjnych bezpiecznych nanosystemów, służących do obrazowania biologicznego pozwoli na uzyskanie rewolucyjnych rozwiązań w zakresie diagnostyki i leczenia.

Wnioski

Wnioski wypływające z prezentowanych badań wskazują na wysoki potencjał badanych nanocząstek do zastosowań w biologii i medycynie. W związku z niską cytotoksycznością, efektywną internalizacją oraz unikalnymi właściwościami luminescencyjnymi, na tle obecnie stosowanych różnych typów nanostruktur, nanocząstki $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yr}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ są bardzo interesującą alternatywą szczególnie do zastosowań teranostycznych.

Najważniejsze wnioski:

- 1) **Obecność nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yr}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ w komórkach wskazuje na efektywną internalizację** tych nanostruktur, nawet **bez udziału innych czynników** (takich jak mikroiniekcja, elektroporacja, użycie lipofektaminy, stosowanie dużych stężeń i długich czasów inkubacji, modyfikacja powierzchni jak funkcjonalizacja lub biofunkcjonalizacja).
- 2) **W internalizację nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yr}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ wydaje się być zaangażowany więcej niż jeden mechanizm endocytozy** (endocytoza zależna od klatryny, endocytoza zależna od kaweoli, makropinocytoza), a blokowanie jednego z poszczególnych szlaków może wpływać na indukcję innych, alternatywnych ścieżek endocytozy. **Zdolność do efektywnej internalizacji jest korzystną cechą umożliwiającą ich wykorzystanie w zastosowaniach biomedycznych.**
- 3) **Analiza cytotoksyczności oraz profilu zmian ultrastrukturalnych w komórkach** wskazuje, że **nanocząstki $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yr}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ wykazują niewielką toksyczność** na poziomie *in vitro*, zależną od stężenia i czasu ekspozycji, stanowiąc **biokompatybilne narzędzie do zastosowań biomedycznych.**
- 4) **Internalizacja nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yr}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ przez komórki hipokampa oraz lokalizowanie się w ściśle określonych strukturach komórkowych, wskazuje na możliwość ich wykorzystania w badaniach neurotoksyczności oraz na ich potencjał terapeutyczny w chorobach centralnego układu nerwowego.**
- 5) **Nanokryształy $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yr}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ wykazują efektywną luminescencję na poziomie *in vitro*, zarówno w komórkach jak i w tkankach, przez co stanowią funkcjonalny nanosystem do obrazowania w zakresie podczerwieni.**

Bibliografia

- [1] Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., Rizzolio, F. (2020). The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112.
- [2] Rudramurthy, G. R., Swamy, M. K. (2018). Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: An update. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(8), 1185-1204.
- [3] Bahadar, H., Maqbool, F., Niaz, K., Abdollahi, M. (2016). Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. *Iranian biomedical journal*, 20(1), 1.
- [4] Baig, N., Kammakakam, I., Falath, W. (2021). Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*, 2(6), 1821-1871.
- [5] Gnach, A., Lipinski, T., Bednarkiewicz, A., Rybka, J., Capobianco, J. A. (2015). Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity. *Chemical Society Reviews*, 44(6), 1561-1584.
- [6] Wang, W., Gaus, K., Tilley, R. D., Gooding, J. J. (2019). The impact of nanoparticle shape on cellular internalisation and transport: what do the different analysis methods tell us? *Materials Horizons*, 6(8), 1538-1547.
- [7] Rostami, I., Alanagh, H. R., Hu, Z., Shahmoradian, S. H. (2019). Breakthroughs in medicine and bioimaging with up-conversion nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 7759.
- [8] Gadekar, V., Borade, Y., Kannaujia, S., Rajpoot, K., Anup, N., Tambe, V., Kalia, K., Tekade, R. K. (2021). Nanomedicines accessible in the market for clinical interventions. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 330, 372–397.
- [9] Khalid, K., Tan, X., Mohd Zaid, H. F., Tao, Y., Lye Chew, C., Chu, D. T., Lam, M. K., Ho, Y. C., Lim, J. W., Chin Wei, L. (2020). Advanced in developmental organic and inorganic nanomaterial: a review. *Bioengineered*, 11(1), 328–355.
- [10] Arora, S., Rajwade, J. M., Paknikar, K. M. (2012). Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicology and applied pharmacology*, 258(2), 151-165.
- [11] Sarma, A., Bania, R., Devi, J. R., Deka, S. (2021). Therapeutic nanostructures and nanotoxicity. *Journal of Applied Toxicology*, 41(10), 1494-1517.

- [12] Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein journal of nanotechnology*, 9(1), 1050-1074.
- [13] Nikzamir, M., Akbarzadeh, A., Panahi, Y. (2021). An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 102316.
- [14] Menon, J. U., Jadeja, P., Tambe, P., Vu, K., Yuan, B., Nguyen, K. T. (2013). Nanomaterials for photo-based diagnostic and therapeutic applications. *Theranostics*, 3(3), 152.
- [15] Madamsetty, V. S., Mukherjee, A., Mukherjee, S. (2019). Recent trends of the bio-inspired nanoparticles in cancer theranostics. *Frontiers in Pharmacology*, 1264.
- [16] Shang, L., Nienhaus, K., Nienhaus, G. U. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of nanobiotechnology*, 12(1), 1-11.
- [17] Valavanidis, A., Vlachogianni, T. (2016). Engineered nanomaterials for pharmaceutical and biomedical products new trends, benefits and opportunities. *Pharm Bioprocess*, 4(1), 13-24.
- [18] Li, X., Wei, J., Aifantis, K. E., Fan, Y., Feng, Q., Cui, F. Z., Watari, F. (2016). Current investigations into magnetic nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(5), 1285-1296.
- [19] Dykman, L., Khlebtsov, N. (2012). Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chemical Society Reviews*, 41(6), 2256-2282.
- [20] Woźniak, A., Malankowska, A., Nowaczyk, G., Grześkowiak, B. F., Tuśnio, K., Słomski, R., Zaleska-Medynska, A. Jurga, S. (2017). Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 28(6), 1-11.
- [21] Zhang, R., Duan, Y., Liu, B. (2019). Recent advances of AIE dots in NIR imaging and phototherapy. *Nanoscale*, 11(41), 19241-19250.
- [22] Zhao, M. X., Zeng, E. Z. (2015). Application of functional quantum dot nanoparticles as fluorescence probes in cell labeling and tumor diagnostic imaging. *Nanoscale research letters*, 10(1), 1-9.
- [23] Liang, G., Wang, H., Shi, H., Wang, H., Zhu, M., Jing, A., Li, J. Li, G. (2020). Recent progress in the development of upconversion nanomaterials in bioimaging and disease treatment. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1), 1-22.
- [24] Lee, H. P., Gaharwar, A. K. (2020). Light-responsive inorganic biomaterials for biomedical applications. *Advanced Science*, 7(17), 2000863.

- [25] Repar, N., Li, H., Aguilar, J. S., Li, Q. Q., Drobne, D., Hong, Y. (2018). Silver nanoparticles induce neurotoxicity in a human embryonic stem cell-derived neuron and astrocyte network. *Nanotoxicology*, 12(2), 104-116.
- [26] Chen, X., Schluesener, H. J. (2008). Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology letters*, 176(1), 1-12.
- [27] Strużyńska, L., Skalska, J. (2018). Mechanisms underlying neurotoxicity of silver nanoparticles. *Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles*, 227-250.
- [28] Ferdous, Z., Nemmar, A. (2020). Health impact of silver nanoparticles: a review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2375.
- [29] Naz, S., Gul, A., Zia, M. (2019). Toxicity of copper oxide nanoparticles: a review study. *IET nanobiotechnology*, 14(1), 1-13.
- [30] Ahamed, M., Siddiqui, M. A., Akhtar, M. J., Ahmad, I., Pant, A. B., Alhadlaq, H. A. (2010). Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(2), 578-583.
- [31] Semisch, A., Ohle, J., Witt, B., Hartwig, A. (2014). Cytotoxicity and genotoxicity of nano- and microparticulate copper oxide: role of solubility and intracellular bioavailability. *Particle and fibre toxicology*, 11(1), 1-16.
- [32] Yarjanli, Z., Ghaedi, K., Esmaili, A., Rahgozar, S., Zarrabi, A. (2017). Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation. *BMC neuroscience*, 18(1), 1-12.
- [33] Feng, Q., Liu, Y., Huang, J., Chen, K., Huang, J., Xiao, K. (2018). Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
- [34] Chrishtop, V. V., Mironov, V. A., Prilepskii, A. Y., Nikonorova, V. G., Vinogradov, V. V. (2021). Organ-specific toxicity of magnetic iron oxide-based nanoparticles. *Nanotoxicology*, 15(2), 167-204.
- [35] Malhotra, N., Lee, J. S., Liman, R. A. D., Ruallo, J. M. S., Villaflores, O. B., Ger, T. R., Hsiao, C. D. (2020). Potential toxicity of iron oxide magnetic nanoparticles: A review. *Molecules*, 25(14), 3159.
- [36] Vakili-Ghartavol, R., Momtazi-Borojeni, A. A., Vakili-Ghartavol, Z., Aiyelabegan, H. T., Jaafari, M. R., Rezayat, S. M., Arbabi Bidgoli, S. (2020). Toxicity assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in different tissues. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 48(1), 443-451.

- [37] Saxena, P., Sangela, V. (2020). Toxicity evaluation of iron oxide nanoparticles and accumulation by microalgae *Coelastrella terrestris*. *Environmental science and pollution research*, 27(16), 19650-19660.
- [38] Hamzeh, M., Sunahara, G. I. (2013). In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 864-873.
- [39] Ghosh, M., Bandyopadhyay, M., Mukherjee, A. (2010). Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. *Chemosphere*, 81(10), 1253-1262.
- [40] Mohamed, H. R., Hussien, N. A. (2016). Genotoxicity studies of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) in the brain of mice. *Scientifica*, 2016.
- [41] Osman, I. F., Baumgartner, A., Cemeli, E., Fletcher, J. N., Anderson, D. (2010). Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEp-2 cells. *Nanomedicine*, 5(8), 1193-1203.
- [42] Husain, M., Wu, D., Saber, A. T., Decan, N., Jacobsen, N. R., Williams, A., Yauk, C. L., Wallin, H., Vogel, U. Halappanavar, S. (2015). Intratracheally instilled titanium dioxide nanoparticles translocate to heart and liver and activate complement cascade in the heart of C57BL/6 mice. *Nanotoxicology*, 9(8), 1013-1022.
- [43] Kongseng, S., Yoovathaworn, K., Wongprasert, K., Chunhabundit, R., Sukwong, P., Pissuwan, D. (2016). Cytotoxic and inflammatory responses of TiO₂ nanoparticles on human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Applied Toxicology*, 36(10), 1364-1373.
- [44] Guan, R., Kang, T., Lu, F., Zhang, Z., Shen, H., Liu, M. (2012). Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles. *Nanoscale research letters*, 7(1), 1-7.
- [45] Kononenko, V., Repar, N., Marušič, N., Drašler, B., Romih, T., Hočevár, S., Drobne, D. (2017). Comparative in vitro genotoxicity study of ZnO nanoparticles, ZnO macroparticles and ZnCl₂ to MDCK kidney cells: Size matters. *Toxicology in Vitro*, 40, 256-263.
- [46] Ng, C. T., Yong, L. Q., Hande, M. P., Ong, C. N., Yu, L. E., Bay, B. H., Baeg, G. H. (2017). Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and *Drosophila melanogaster*. *International journal of nanomedicine*, 12, 1621.
- [47] Sharma, V., Singh, P., Pandey, A. K., Dhawan, A. (2012). Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide

nanoparticles. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745(1-2), 84-91.

[48] Han, Z., Yan, Q., Ge, W., Liu, Z. G., Gurunathan, S., De Felici, M., Shen, W. Zhang, X. F. (2016). Cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on mouse testicular cells. *International journal of nanomedicine*, 11, 5187.

[49] Pinho, A. R., Martins, F., Costa, M. E. V., Senos, A. M., da Cruz e Silva, O. A., Pereira, M. D. L., Rebelo, S. (2020). In vitro cytotoxicity effects of zinc oxide nanoparticles on spermatogonia cells. *Cells*, 9(5), 1081.

[50] Chen, A., Feng, X., Sun, T., Zhang, Y., An, S., Shao, L. (2016). Evaluation of the effect of time on the distribution of zinc oxide nanoparticles in tissues of rats and mice: a systematic review. *IET nanobiotechnology*, 10(3), 97–106.

[51] Zhong, L., Zhang, L., Li, Y., Liang, X., Kong, L., Shen, X., Wu, T. (2021). Assessment of the Toxicity of Quantum Dots through Biliometric Analysis. *International journal of environmental research and public health*, 18(11), 5768.

[52] Tsoi, K. M., Dai, Q. I. N., Alman, B. A., Chan, W. C. (2013). Are quantum dots toxic? Exploring the discrepancy between cell culture and animal studies. *Accounts of chemical research*, 46(3), 662-671.

[53] Zhang, T., Wang, Y., Kong, L., Xue, Y., Tang, M. (2015). Threshold dose of three types of quantum dots (QDs) induces oxidative stress triggers DNA damage and apoptosis in mouse fibroblast L929 cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(10), 13435-13454.

[54] Wang, Y., Tang, M. (2018). Dysfunction of various organelles provokes multiple cell death after quantum dot exposure. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 2729.

[55] Liang, X., Tang, M. (2019). Research advances on cytotoxicity of cadmium-containing quantum dots. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 19(9), 5375-5387.

[56] Zhu, C., Chen, Z., Gao, S., Goh, B. L., Samsudin, I. B., Lwe, K. W., Wu, Y., Wu, C., Su, X. (2019). Recent advances in non-toxic quantum dots and their biomedical applications. *Progress in Natural Science: Materials International*, 29(6), 628-640.

[57] Gupta, R., Xie, H. (2018). Nanoparticles in daily life: applications, toxicity and regulations. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 37(3).

[58] Egbuna, C., Parmar, V. K., Jeevanandam, J., Ezzat, S. M., Patrick-Iwuanyanwu, K. C., Adetunji, C. O., Khan, J., Onyeike, E. N., Uche, C. Z., Akram, M., Ibrahim, M. S., El Mahdy, N. M., Awuchi, C. G., Saravanan, K., Tijjani, H., Odoh, U. E., Messaoudi, M., Ifemeje, J. C., Olisah, M. C., Ezeofor, N. J., Chikwendu, C. J. Ibeabuchi, C. G. (2021). Toxicity of

Nanoparticles in Biomedical Application: Nanotoxicology. *Journal of toxicology*, 2021, 9954443.

[59] Lewinski, N., Colvin, V., Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *small*, 4(1), 26-49.

[60] Ge, D., Du, Q., Ran, B., Liu, X., Wang, X., Ma, X., Cheng, F., Sun, B. (2019). The neurotoxicity induced by engineered nanomaterials. *International journal of nanomedicine*, 14, 4167–4186.

[61] Liu, N., Tang, M. (2020). Toxic effects and involved molecular pathways of nanoparticles on cells and subcellular organelles. *Journal of Applied Toxicology*, 40(1), 16-36.

[62] Sengul, A. B., Asmatulu, E. (2020). Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18(5), 1659-1683.

[63] Manke, A., Wang, L., Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international*, 2013.

[64] Mahata, M. K., Hofsäss, H. C., Vetter, U. (2016). Photon-upconverting materials: advances and prospects for various emerging applications. *Luminescence-an outlook on the phenomena and their applications*, 109-131.

[65] Gulzar, A., Xu, J., Yang, P., He, F., Xu, L. (2017). Upconversion processes: versatile biological applications and biosafety. *Nanoscale*, 9(34), 12248-12282.

[66] Haase, M., Schäfer, H. (2011). Upconverting nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(26), 5808-5829.

[67] Chen, G., Qiu, H., Prasad, P. N., Chen, X. (2014). Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics. *Chemical reviews*, 114(10), 5161-5214.

[68] Wang, F., Liu, X. (2009). Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 976-989.

[69] Wilhelm, S. (2017). Perspectives for upconverting nanoparticles. *ACS nano*, 11(11), 10644-10653.

[70] Misiak, M., Skowicki, M., Lipiński, T., Kowalczyk, A., Prorok, K., Arabasz, S., Bednarkiewicz, A. (2017). Biofunctionalized upconverting CaF₂: Yb, Tm nanoparticles for *Candida albicans* detection and imaging. *Nano Research*, 10(10), 3333-3345.

[71] Lan, J., Li, L., Liu, Y., Yan, L., Li, C., Chen, J., Chen, X. (2016). Upconversion luminescence assay for the detection of the vascular endothelial growth factor, a biomarker for breast cancer. *Microchimica Acta*, 183(12), 3201-3208.

[72] Zhang, X., Wang, S., Cheng, G., Yu, P., Chang, J. (2021). Light-responsive nanomaterials for cancer therapy. *Engineering*.

- [73] Liao, H., Ye, S., Shi, Y., Wang, D. (2019). Optical-magnetic bifunctional sub-20 nm β -NaYF₄: Yb³⁺/Er³⁺@ NaGdF₄: Yb³⁺/Nd³⁺@ NaGdF₄ core-shell-shell nanoparticles triggered by 808 nm light. *Optical Materials*, 98, 109489.
- [74] Samhadaneh, D. M., Mandl, G. A., Han, Z., Mahjoob, M., Weber, S. C., Tuznik, M., Rudko, D. A., Capobianco, J. A. Stochaj, U. (2020). Evaluation of lanthanide-doped upconverting nanoparticles for in vitro and in vivo applications. *ACS Applied Bio Materials*, 3(7), 4358-4369.
- [75] Park, Y. I., Lee, K. T., Suh, Y. D., Hyeon, T. (2015). Upconverting nanoparticles: a versatile platform for wide-field two-photon microscopy and multi-modal in vivo imaging. *Chemical Society Reviews*, 44(6), 1302-1317.
- [76] Misiak, M., Prorok, K., Bednarkiewicz, A. (2012). Biologiczne zastosowania nanoluminoforów domieszkowanych lantanowcami. *Wiadomości Chemiczne*, 393-443.
- [77] Kwon, O. S., Song, H. S., Conde, J., Kim, H. I., Artzi, N., Kim, J. H. (2016). Dual-color emissive upconversion nanocapsules for differential cancer bioimaging in vivo. *ACS nano*, 10(1), 1512-1521.
- [78] Li, Z., Zhang, Y., La, H., Zhu, R., El-Banna, G., Wei, Y., Han, G. (2015). Upconverting NIR photons for bioimaging. *Nanomaterials*, 5(4), 2148-2168.
- [79] Ang, L. Y., Lim, M. E., Ong, L. C., Zhang, Y. (2011). Applications of upconversion nanoparticles in imaging, detection and therapy. *Nanomedicine*, 6(7), 1273-1288.
- [80] Min, Y., Li, J., Liu, F., Padmanabhan, P., Yeow, E. K., Xing, B. (2014). Recent advance of biological molecular imaging based on lanthanide-doped upconversion-luminescent nanomaterials. *Nanomaterials*, 4(1), 129-154.
- [81] Chen, C., Li, C., Shi, Z. (2016). Current advances in lanthanide-doped upconversion nanostructures for detection and bioapplication. *Advanced Science*, 3(10), 1600029.
- [82] Bettinelli, M., Carlos, L., Liu, X. (2015). Lanthanide-doped. *Physics Today*, 68(9), 38.
- [83] Wang, C., Cheng, L., Liu, Z. (2013). Upconversion nanoparticles for photodynamic therapy and other cancer therapeutics. *Theranostics*, 3(5), 317.
- [84] Gao, W., Wang, Z., Lv, L., Yin, D., Chen, D., Han, Z., Ma, Y., Zhang, M., Yang, M., Gu, Y. (2016). Photodynamic Therapy Induced Enhancement of Tumor Vasculature Permeability Using an Upconversion Nanoconstruct for Improved Intratumoral Nanoparticle Delivery in Deep Tissues. *Theranostics*, 6(8), 1131-1144.
- [85] Xing, Y., Li, L., Ai, X., Fu, L. (2016). Polyaniline-coated upconversion nanoparticles with upconverting luminescent and photothermal conversion properties for photothermal cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4327.

- [86] Bednarkiewicz, A., Wawrzynczyk, D., Nyk, M., Streck, W. (2011). Optically stimulated heating using Nd³⁺ doped NaYF₄ colloidal near infrared nanophosphors. *Applied Physics B*, 103(4), 847-852.
- [87] Qiao, X. F., Zhou, J. C., Xiao, J. W., Wang, Y. F., Sun, L. D., Yan, C. H. (2012). Triple-functional core-shell structured upconversion luminescent nanoparticles covalently grafted with photosensitizer for luminescent, magnetic resonance imaging and photodynamic therapy in vitro. *Nanoscale*, 4(15), 4611-4623.
- [88] Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R., Nann, T. (2008). Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature methods*, 5(9), 763-775.
- [89] Algar, W. R., Susumu, K., Delehanty, J. B., Medintz, I. L. (2011). Semiconductor quantum dots in bioanalysis: crossing the valley of death.
- [90] Sakiyama, M., Sugimoto, H., Fujii, M. (2018). Long-lived luminescence of colloidal silicon quantum dots for time-gated fluorescence imaging in the second near infrared window in biological tissue. *Nanoscale*, 10(29), 13902-13907.
- [91] Shen, H., Lin, Q., Cao, W., Yang, C., Shewmon, N. T., Wang, H., Niu, J., Li, L. S., Xue, J. (2017). Efficient and long-lifetime full-color light-emitting diodes using high luminescence quantum yield thick-shell quantum dots. *Nanoscale*, 9(36), 13583-13591.
- [92] Gao, X., Nie, S. (2003). Molecular profiling of single cells and tissue specimens with quantum dots. *Trends in biotechnology*, 21(9), 371-373.
- [93] Zrazhevskiy, P., Gao, X. (2009). Multifunctional quantum dots for personalized medicine. *Nano today*, 4(5), 414-428.
- [94] Chung, E. J., Leon, L., Rinaldi, C. (Eds.). (2019). *Nanoparticles for biomedical applications: fundamental concepts, biological interactions and clinical applications*. Elsevier.
- [95] Ismail, M., Akhtar, K., Khan, M. I., Kamal, T., Khan, M. A., M Asiri, A., Seo, J. Khan, S. B. (2019). Pollution, toxicity and carcinogenicity of organic dyes and their catalytic bio-remediation. *Current pharmaceutical design*, 25(34), 3645-3663.
- [96] Ardila-Leal, L. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Quevedo-Hidalgo, B. E. (2021). A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases. *Molecules*, 26(13), 3813.
- [97] Broadwater, D., Bates, M., Jayaram, M., Young, M., He, J., Raithel, A. L., Hamann, T. W., Zhang, W., Borhan, B., Lunt, R. R. Lunt, S. Y. (2019). Modulating cellular cytotoxicity and phototoxicity of fluorescent organic salts through counterion pairing. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.

- [98] Alford, R., Simpson, H. M., Duberman, J., Hill, G. C., Ogawa, M., Regino, C., Kobayashi, H. Choyke, P. L. (2009). Toxicity of organic fluorophores used in molecular imaging: literature review. *Molecular imaging*, 8(6), 7290-2009.
- [99] Zhou, J., Liu, Q., Feng, W., Sun, Y., Li, F. (2015). Upconversion luminescent materials: advances and applications. *Chemical reviews*, 115(1), 395-465.
- [100] Huang, K., Li, W., Jayakumar, M. K. G., Zhang, Y. (2013, March). Upconverting fluorescent nanoparticles for biodetection and photoactivation. In *Advances in Photonics of Quantum Computing, Memory, and Communication VI* (Vol. 8635, pp. 8-13). SPIE.
- [101] Huang, Z., Lee Tang, M. (2018). Semiconductor nanocrystal light absorbers for photon upconversion. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 9(21), 6198-6206.
- [102] Das, A., Bae, K., Park, W. (2020). Enhancement of upconversion luminescence using photonic nanostructures. *Nanophotonics*, 9(6), 1359-1371.
- [103] Li, X., Zhang, F., Zhao, D. (2015). Lab on upconversion nanoparticles: optical properties and applications engineering via designed nanostructure. *Chemical Society Reviews*, 44(6), 1346-1378.
- [104] Lingeswar Reddy, K., Balaji, R., Kumar, A., Krishnan, V. (2018). Lanthanide doped near infrared active upconversion nanophosphors: fundamental concepts, synthesis strategies, and technological applications. *Small*, 14(37), 1801304.
- [105] Chen, J., Zhao, J. X. (2012). Upconversion nanomaterials: synthesis, mechanism, and applications in sensing. *Sensors*, 12(3), 2414-2435.
- [106] van Sark, W. G., de Wild, J., Rath, J. K., Meijerink, A., Schropp, R. E. (2013). Upconversion in solar cells. *Nanoscale research letters*, 8(1), 1-10.
- [107] Dong, H., Sun, L. D., Yan, C. H. (2015). Energy transfer in lanthanide upconversion studies for extended optical applications. *Chemical Society Reviews*, 44(6), 1608-1634.
- [108] Zhang, F. (2015). *Photon upconversion nanomaterials* (Vol. 416). Berlin, Germany: Springer.
- [109] Yao, J., Huang, C., Liu, C., Yang, M. (2020). Upconversion luminescence nanomaterials: A versatile platform for imaging, sensing, and therapy. *Talanta*, 208, 120157.
- [110] Zhou, B., Tang, B., Zhang, C., Qin, C., Gu, Z., Ma, Y., Zhai, T., Yao, J. (2020). Enhancing multiphoton upconversion through interfacial energy transfer in multilayered nanoparticles. *Nature communications*, 11(1), 1174.
- [111] Zhang, G., Qiang, Q., Du, S., Wang, Y. (2018). An upconversion luminescence and temperature sensor based on Yb³⁺/Er³⁺ co-doped GdSr₂AlO₅.

- [112] Qian, H. S., Zhang, Y. (2008). Synthesis of hexagonal-phase core-shell NaYF₄ nanocrystals with tunable upconversion fluorescence. *Langmuir*, 24(21), 12123-12125.
- [113] Mackenzie, L. E., Goode, J. A., Vakurov, A., Nampi, P. P., Saha, S., Jose, G., Millner, P. A. (2018). The theoretical molecular weight of NaYF₄: RE upconversion nanoparticles. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.
- [114] Li, H., Xu, L., Chen, G. (2017). Controlled synthesis of monodisperse hexagonal NaYF₄: Yb/Er nanocrystals with ultrasmall size and enhanced upconversion luminescence. *Molecules*, 22(12), 2113.
- [115] Li, D., Ågren, H., Chen, G. (2018). Near infrared harvesting dye-sensitized solar cells enabled by rare-earth upconversion materials. *Dalton Transactions*, 47(26), 8526-8537.
- [116] Wen, S., Zhou, J., Zheng, K., Bednarkiewicz, A., Liu, X., Jin, D. (2018). Advances in highly doped upconversion nanoparticles. *Nature communications*, 9(1), 1-12.
- [117] Kang, D., Jeon, E., Kim, S., Lee, J. (2020). Lanthanide-doped upconversion nanomaterials: Recent advances and applications. *BioChip Journal*, 14(1), 124-135.
- [118] Tu, L., Liu, X., Wu, F., Zhang, H. (2015). Excitation energy migration dynamics in upconversion nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 44(6), 1331-1345.
- [119] Cherif, A., Kanoun, A., Maaref, H. (2011). Up-conversion fluorescence dynamics in Er³⁺/Yb³⁺ co-doped tellurite glasses. *Optica Applicata*, 41(1), 235.
- [120] Sikora, B., Fronc, K., Kamińska, I., Koper, K., Szewczyk, S., Paterczyk, B., Wojciechowski, T., Sobczak, K., Minikayev, R., Paszkowicz, W., Stępień, P., Elbaum, D. (2013). Transport of NaYF₄: Er³⁺, Yb³⁺ up-converting nanoparticles into HeLa cells. *Nanotechnology*, 24(23), 235702.
- [121] Escudero, A., Becerro, A. I., Carrillo-Carrión, C., Nunez, N. O., Zyuzin, M. V., Laguna, M., González-Mancebo, D., Ocaña, M. Parak, W. J. (2017). Rare earth based nanostructured materials: synthesis, functionalization, properties and bioimaging and biosensing applications. *Nanophotonics*, 6(5), 881-921.
- [122] Wiesholler, L. M., Hirsch, T. (2018). Strategies for the design of bright upconversion nanoparticles for bioanalytical applications. *Optical Materials*, 80, 253-264.
- [123] Hemmer, E., Benayas, A., Légaré, F., Vetrone, F. (2016). Exploiting the biological windows: current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm. *Nanoscale Horizons*, 1(3), 168-184.
- [124] <https://urbanavc.com/photobiomodulation/> dostęp dnia 03.03.2022 r.

- [125] González-Béjar, M., Francés-Soriano, L., Pérez-Prieto, J. (2016). Upconversion nanoparticles for bioimaging and regenerative medicine. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 4, 47.
- [126] Wu, S., Butt, H. J. (2017). Near-infrared photochemistry at interfaces based on upconverting nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(35), 23585-23596.
- [127] DaCosta, M. V., Doughan, S., Han, Y., Krull, U. J. (2014). Lanthanide upconversion nanoparticles and applications in bioassays and bioimaging: A review. *Analytica chimica acta*, 832, 1-33.
- [128] Conde, J., Dias, J. T., Grazú, V., Moros, M., Baptista, P. V., de la Fuente, J. M. (2014). Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Frontiers in chemistry*, 2, 48.
- [129] Thanh, N. T., Green, L. A. (2010). Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today*, 5(3), 213-230.
- [130] Gnach, A., Bednarkiewicz, A. (2012). Lanthanide-doped up-converting nanoparticles: Merits and challenges. *Nano Today*, 7(6), 532-563.
- [131] Shi, Y., Van der Meel, R., Chen, X., Lammers, T. (2020). The EPR effect and beyond: Strategies to improve tumor targeting and cancer nanomedicine treatment efficacy. *Theranostics*, 10(17), 7921.
- [132] Chen, C., Wang, F., Wen, S., Su, Q. P., Wu, M., Liu, Y., Wang, B., Li, D., Shan, X., Kianinia, M., Aharonovich, I., Toth, M., Jackson, S. P., Xi, P., Jin, D. (2018). Multi-photon near-infrared emission saturation nanoscopy using upconversion nanoparticles. *Nature communications*, 9(1), 3290.
- [133] Beddoes, C. M., Case, C. P., Briscoe, W. H. (2015). Understanding nanoparticle cellular entry: a physicochemical perspective. *Advances in colloid and interface science*, 218, 48-68.
- [134] Akinc, A., Battaglia, G. (2013). Exploiting endocytosis for nanomedicines. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(11), a016980.
- [135] Patel, S., Kim, J., Herrera, M., Mukherjee, A., Kabanov, A. V., Sahay, G. (2019). Brief update on endocytosis of nanomedicines. *Advanced drug delivery reviews*, 144, 90-111.
- [136] Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., He, Z. (2013). The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 1-10.
- [137] Rennick, J. J., Johnston, A. P., Parton, R. G. (2021). Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. *Nature nanotechnology*, 16(3), 266-276.

- [138] Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., Brown, D., M. Alkilany, A. M., Farokhzad, O. C. Mahmoudi, M. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, 46(14), 4218-4244.
- [139] Manzanares, D., Ceña, V. (2020). Endocytosis: the nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell. *Pharmaceutics*, 12(4), 371.
- [140] Doherty, G. J., McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 78, 857-902.
- [141] Sorkin, A., Von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(9), 609-622.
- [142] Sahay, G., Alakhova, D. Y., Kabanov, A. V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *Journal of controlled release*, 145(3), 182-195.
- [143] Oh, N., Park, J. H. (2014). Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International journal of nanomedicine*, 9(Suppl 1), 51.
- [144] Zhao, F., Zhao, Y., Liu, Y., Chang, X., Chen, C., Zhao, Y. (2011). Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *small*, 7(10), 1322-1337.
- [145] Nazareus, M., Zhang, Q., Soliman, M. G., Del Pino, P., Pelaz, B., Carregal-Romero, S., Rejman, J., Rothen-Rutishauser, B., Clift, M. J., Zellner, R., Nienhaus, G. U., Delehanty, J. B., Medintz, I. L., Parak, W. J. (2014). In vitro interaction of colloidal nanoparticles with mammalian cells: What have we learned thus far? *Beilstein journal of nanotechnology*, 5, 1477–1490.
- [146] Kralj, S., Rojnik, M., Romih, R., Jagodič, M., Kos, J., Makovec, D. (2012). Effect of surface charge on the cellular uptake of fluorescent magnetic nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(10), 1-14.
- [147] Verma, A., Stellacci, F. (2010). Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. *small*, 6(1), 12-21.
- [148] Schweiger, C., Hartmann, R., Zhang, F., Parak, W. J., Kissel, T. H., Rivera_Gil, P. (2012). Quantification of the internalization patterns of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with opposite charge. *Journal of nanobiotechnology*, 10(1), 1-11.
- [149] Panariti, A., Miserocchi, G., Rivolta, I. (2012). The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnology, science and applications*, 5, 87.
- [150] Lynch, I., Dawson, K. A. (2008). Protein-nanoparticle interactions. *Nano today*, 3(1-2), 40-47.

- [151] Mortensen, N. P., Hurst, G. B., Wang, W., Foster, C. M., Nallathamby, P. D., Retterer, S. T. (2013). Dynamic development of the protein corona on silica nanoparticles: composition and role in toxicity. *Nanoscale*, 5(14), 6372-6380.
- [152] Brun, E., Sicard–Roselli, C. (2014). Could nanoparticle corona characterization help for biological consequence prediction? *Cancer nanotechnology*, 5(1), 1-13.
- [153] Mahmoudi, M., Lynch, I., Ejtehadi, M. R., Monopoli, M. P., Bombelli, F. B., Laurent, S. (2011). Protein– nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chemical reviews*, 111(9), 5610-5637.
- [154] Mirshafiee, V., Kim, R., Park, S., Mahmoudi, M., Kraft, M. L. (2016). Impact of protein pre-coating on the protein corona composition and nanoparticle cellular uptake. *Biomaterials*, 75, 295-304.
- [155] Park, S. J. (2020). Protein–nanoparticle interaction: corona formation and conformational changes in proteins on nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 5783.
- [156] Rampado, R., Crotti, S., Caliceti, P., Pucciarelli, S., Agostini, M. (2020). Recent advances in understanding the protein corona of nanoparticles and in the formulation of “Stealthy” Nanomaterials. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 166.
- [157] Yang, X., Chung, E., Johnston, I., Ren, G., Cheong, Y. K. (2021). Exploitation of antimicrobial nanoparticles and their applications in biomedical engineering. *Applied Sciences*, 11(10), 4520.
- [158] Elsayed, H. H., Al-Sherbini, A. S. A., Abd-Elhady, E. E., Ahmed, K. A. E. A. (2014). Treatment of anemia progression via magnetite and folate nanoparticles in vivo. *International Scholarly Research Notices*, 2014.
- [159] Simko, M., Mattsson, M. O. (2014). Interactions between nanosized materials and the brain. *Current medicinal chemistry*, 21(37), 4200-4214.
- [160] Zhou, Y., Peng, Z., Seven, E. S., Leblanc, R. M. (2018). Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of controlled release*, 270, 290-303.
- [161] Ceña, V., Játiva, P. (2018). Nanoparticle crossing of blood-brain barrier: a road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases. *Nanomedicine*, 13(13), 1513-1516.
- [162] Gonzalez-Carter, D., Liu, X., Tockary, T. A., Dirisala, A., Toh, K., Anraku, Y., Kataoka, K. (2020). Targeting nanoparticles to the brain by exploiting the blood–brain barrier impermeability to selectively label the brain endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(32), 19141-19150.

- [163] Lombardo, S. M., Schneider, M., Türelı, A. E., Türelı, N. G. (2020). Key for crossing the BBB with nanoparticles: The rational design. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11(1), 866-883.
- [164] Zhang, W., Wang, W., Yu, D. X., Xiao, Z., He, Z. (2018). Application of nanodiagnostics and nanotherapy to CNS diseases. *Nanomedicine*, 13(18), 2341-2371.
- [165] Teleanu, D. M., Chircov, C., Grumezescu, A. M., Volceanov, A., Teleanu, R. I. (2018). Impact of nanoparticles on brain health: An up to date overview. *Journal of clinical medicine*, 7(12), 490.
- [166] Gao, H. (2016). Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(4), 268-286.
- [167] Pampaloni, N. P., Giugliano, M., Scaini, D., Ballerini, L., Rauti, R. (2019). Advances in nano neuroscience: From nanomaterials to nanotools. *Frontiers in neuroscience*, 953.
- [168] Woolf, N. J., Priel, A., Tuszynski, J. A. (2009). Nanotechnology, Nanostructure, and Nervous System Disorders. In *Nanoneuroscience* (pp. 177-226). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [169] Wang, F., Banerjee, D., Liu, Y., Chen, X., Liu, X. (2010). Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy. *Analyst*, 135(8), 1839-1854.
- [170] Zhang, Z., Han, Q., Lau, J. W., Xing, B. (2020). Lanthanide-doped upconversion nanoparticles meet the needs for cutting-edge bioapplications: recent progress and perspectives. *ACS Materials Letters*, 2(11), 1516-1531.
- [171] Shah, S., Liu, J. J., Pasquale, N., Lai, J., McGowan, H., Pang, Z. P., Lee, K. B. (2015). Hybrid upconversion nanomaterials for optogenetic neuronal control. *Nanoscale*, 7(40), 16571-16577.
- [172] Peng, J., Xu, W., Teoh, C. L., Han, S., Kim, B., Samanta, A., Er, J. C., Wang, L., Yuan, L., Liu, X. Chang, Y. T. (2015). High-efficiency in vitro and in vivo detection of Zn²⁺ by dye-assembled upconversion nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 137(6), 2336-2342.
- [173] Chamanzar, M., Garfield, D. J., Iafrati, J., Chan, E. M., Sohal, V., Cohen, B. E., Schuck, P. J., Maharbiz, M. M. (2018). Upconverting nanoparticle micro-lightbulbs designed for deep tissue optical stimulation and imaging. *Biomedical optics express*, 9(9), 4359-4371.
- [174] Zhao, J., Ellis-Davies, G. C. (2020). Intracellular photoswitchable neuropharmacology driven by luminescence from upconverting nanoparticles. *Chemical Communications*, 56(66), 9445-9448.
- [175] Liu, X., Chen, H., Wang, Y., Si, Y., Zhang, H., Li, X., Zhang, Z., Yan, B., Jiang, S., Wang, F., Weng, S., Xu, W., Zhao, D., Zhang, J., Zhang, F. (2021). Near-infrared manipulation

of multiple neuronal populations via trichromatic upconversion. *Nature communications*, 12(1), 5662.

[176] Monteiro-Riviere, N. A., Inman, A. O., Zhang, L. W. (2009). Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and applied pharmacology*, 234(2), 222-235.

[177] Liu, G., Gao, J., Ai, H., Chen, X. (2013). Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. *Small*, 9(9-10), 1533-1545.

[178] Ashraf, S., Hassan Said, A., Hartmann, R., Assmann, M. A., Feliu, N., Lenz, P., Parak, W. J. (2020). Quantitative particle uptake by cells as analyzed by different methods. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(14), 5438-5453.

[179] Brown, A., Hondow, N. (2013). Electron microscopy of nanoparticles in cells. In *Frontiers of Nanoscience* (Vol. 5, pp. 95-120). Elsevier.

[180] Tremi, I., Havaki, S., Georgitsopoulou, S., Lagopati, N., Georgakilas, V., Gorgoulis, V. G., Georgakilas, A. G. (2021). A guide for using transmission electron microscopy for studying the radiosensitizing effects of gold nanoparticles in vitro. *Nanomaterials*, 11(4), 859.

[181] Kowalik, P., Elbaum, D., Mikulski, J., Fronc, K., Kamińska, I., Morais, P. C., De Souza, P. E., Barbosa Nunes, R., Veiga-Souza, F. H., Gruzeł, G., Minikayev, R., Wojciechowski, T., Mosiniewicz-Szablewska, E., Szewczyk, M., Pawlyta, M., Sienkiewicz, A., Łapiński, M., Zajdel, K., Stępień, P., Szczepkowski, J., Jastrzębski, W., Frontczak-Baniewicz, M., Paszkowicz, W., Sikora, B. (2017). Upconversion fluorescence imaging of HeLa cells using ROS generating SiO₂-coated lanthanide-doped NaYF₄ nanoconstructs. *Rsc Advances*, 7(48), 30262-30273.

[182] Malatesta, M. (2016). Transmission electron microscopy for nanomedicine: novel applications for long-established techniques. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 60(4).

[183] Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., Thanh, N. T. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871-12934.

[184] Scimeca, M., Bischetti, S., Lamsira, H. K., Bonfiglio, R., Bonanno, E. (2018). Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European journal of histochemistry: EJH*, 62(1).

[185] Salame, P. H., Kolte, J. T. (2020). Role of lanthanide substitution on suitable sites in enhancing the properties of various electroceramics. In *Spectroscopy of Lanthanide Doped Oxide Materials* (pp. 365-392). Woodhead Publishing.

- [186] Sukul, P. P., Kumar, K., Swart, H. C. (2018). Photoluminescence spectroscopy of Eu 3+: an economical technique for the detection of crystal phase transformation in PbZr 0.53 Ti 0.47 O 3 ceramics. *OSA continuum*, 1(3), 971-980.
- [187] Clogston, J. D., Patri, A. K. (2011). Zeta potential measurement. In *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery* (pp. 63-70). Humana Press.
- [188] Honary, S., Zahir, F. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 255-264.
- [189] Joseph, E., Singhvi, G. (2019). Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier. *Nanomaterials for drug delivery and therapy*, 91-116.
- [190] Shnoudeh, A. J., Hamad, I., Abdo, R. W., Qadumii, L., Jaber, A. Y., Surchi, H. S., Alkelany, S. Z. (2019). Synthesis, characterization, and applications of metal nanoparticles. In *Biomaterials and bionanotechnology* (pp. 527-612). Academic Press.
- [191] Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(16), 3731.
- [192] Rasmussen, M. K., Pedersen, J. N., Marie, R. (2020). Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient. *Nature communications*, 11(1), 1-8.
- [193] Blanco, E., Shen, H., Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature biotechnology*, 33(9), 941-951.
- [194] Forest, V., Pourchez, J. (2017). Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona. *Materials Science and Engineering: C*, 70, 889-896.
- [195] Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 7, 5577.
- [196] Guerrero-Martínez, A., Pérez-Juste, J., Liz-Marzán, L. M. (2010). Recent progress on silica coating of nanoparticles and related nanomaterials. *Advanced materials*, 22(11), 1182-1195.
- [197] Sedlmeier, A., Gorris, H. H. (2015). Surface modification and characterization of photon-upconverting nanoparticles for bioanalytical applications. *Chemical Society Reviews*, 44(6), 1526-1560.

- [198] Shah, K. W. (2018). Nanosynthesis Techniques of Silica-Coated Nanostructures. *Novel Nanomaterials-Synthesis and Applications*.
- [199] Chen, Y., D'Amario, C., Gee, A., Duong, H. T., Shimoni, O., Valenzuela, S. M. (2020). Dispersion stability and biocompatibility of four ligand-exchanged NaYF₄: Yb, Er upconversion nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 102, 384-393.
- [200] Stepanenko, A. A., Dmitrenko, V. V. (2015). HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene*, 569(2), 182-190.
- [201] Landry, J. J., Pyl, P. T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M. M., Stütz, A. M., Jauch, A., Aiyar, R. S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, J. O., Huber, W., Steinmetz, L. M. (2013). The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda, Md.)*, 3(8), 1213–1224.
- [202] Xing, X., He, X., Peng, J., Wang, K., Tan, W. (2005). Uptake of silica-coated nanoparticles by HeLa cells. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 5(10), 1688-1693.
- [203] Boncler, M., Różalski, M., Krajewska, U., Podśędek, A., Watala, C. (2014). Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 69(1), 9-16.
- [204] Xu, M., McCanna, D. J., Sivak, J. G. (2015). Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 71, 1-7.
- [205] Sasso, L., Purdie, L., Grabowska, A., Jones, A. T., Alexander, C. (2018). Time and cell-dependent effects of endocytosis inhibitors on the internalization of biomolecule markers and nanomaterials. *Journal of interdisciplinary Nanomedicine*, 3(2), 67-81.
- [206] Sun, J., Liu, Y., Ge, M., Zhou, G., Sun, W., Liu, D., Liang, X. J., & Zhang, J. (2017). A Distinct Endocytic Mechanism of Functionalized-Silica Nanoparticles in Breast Cancer Stem Cells. *Scientific reports*, 7(1), 16236.
- [207] Kuhn, D. A., Vanhecke, D., Michen, B., Blank, F., Gehr, P., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B. (2014). Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. *Beilstein journal of nanotechnology*, 5(1), 1625-1636.
- [208] Jurowski, K., Piekoszewski, W. (2015). *Spektrometria mas sprzężona z plazmą wzbudzaną indukcyjnie z mikropróbkowaniem za pomocą odparowania laserowego (LA ICP-MS)*. Kraków: Scientiae et Didactics.

- [209] Vanhaecke, F. (2015). Agilent 8800 ICP-QQQ application handbook Agilent 8800 ICP-QQQ. *Agilent Technologies Application Handbook*, 2, 1-92.
- [210] Sypecka, J., Sarnowska, A. (2014). The neuroprotective effect exerted by oligodendroglial progenitors on ischemically impaired hippocampal cells. *Molecular Neurobiology*, 49(2), 685-701.
- [211] Krämer, C. E., Wiechert, W., Kohlheyer, D. (2016). Time-resolved, single-cell analysis of induced and programmed cell death via non-invasive propidium iodide and counterstain perfusion. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- [212] Dan, D. T. (2020). Nanotechnology, Nanoparticles and Nanoscience: A New Approach in Chemistry and Life Sciences. *Soft Nanoscience Letters*, 10(02), 17.
- [213] Nikalje, A. P. (2015). Nanotechnology and its applications in medicine. *Med chem*, 5(2), 081-089.
- [214] Contera, S., Bernardino de la Serna, J., Tetley, T. D. (2020). Biotechnology, nanotechnology and medicine. *Emerging Topics in Life Sciences*, 4(6), 551-554.
- [215] Scheinberg, D. A., Grimm, J., Heller, D. A., Stater, E. P., Bradbury, M., McDevitt, M. R. (2017). Advances in the clinical translation of nanotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 46, 66-73.
- [216] Mariappan, N. (2019). Recent trends in Nanotechnology applications in surgical specialties and orthopedic surgery. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(3), 1095-1127.
- [217] Hofferberth, S. C., Grinstaff, M. W., Colson, Y. L. (2016). Nanotechnology applications in thoracic surgery. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 50(1), 6-16.
- [218] Amin, K., Moscalu, R., Imere, A., Murphy, R., Barr, S., Tan, Y., Wong, R., Sorooshian, P., Zhang, F., Stone, J., Fildes, J., Reid, A., Wong, J. (2019). The future application of nanomedicine and biomimicry in plastic and reconstructive surgery. *Nanomedicine (London, England)*, 14(20), 2679–2696.
- [219] Viswanathan, V. K., Manoharan, S. R. R., Subramanian, S., Moon, A. (2019). Nanotechnology in spine surgery: a current update and critical review of the literature. *World Neurosurgery*, 123, 142-155.
- [220] Petersen, D. K., Naylor, T. M., Halen, J. P. V. (2014). Current and future applications of nanotechnology in plastic and reconstructive surgery. *Plastic and Aesthetic Research*, 1, 43-50.
- [221] Chandarana, M., Curtis, A., Hoskins, C. (2018). The use of nanotechnology in cardiovascular disease. *Applied Nanoscience*, 8(7), 1607-1619.

- [222] Wang, D. K., Rahimi, M., Filgueira, C. S. (2021). Nanotechnology applications for cardiovascular disease treatment: Current and future perspectives. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 34, 102387.
- [223] Passaro, F., Testa, G., Ambrosone, L., Costagliola, C., Tocchetti, C. G., di Nezza, F., Russo, M., Pirozzi, F., Abete, P., Russo, T., Bonaduce, D. (2017). Nanotechnology-Based Cardiac Targeting and Direct Cardiac Reprogramming: The Betrothed. *Stem cells international*, 2017, 4940397.
- [224] Flores, A. M., Ye, J., Jarr, K. U., Hosseini-Nassab, N., Smith, B. R., Leeper, N. J. (2019). Nanoparticle therapy for vascular diseases. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 39(4), 635-646.
- [225] Pala, R., Anju, V. T., Dyavaiah, M., Busi, S., Nauli, S. M. (2020). Nanoparticle-mediated drug delivery for the treatment of cardiovascular diseases. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 3741.
- [226] Kumar, V., Palazzolo, S., Bayda, S., Corona, G., Toffoli, G., Rizzolio, F. (2016). DNA nanotechnology for cancer therapy. *Theranostics*, 6(5), 710.
- [227] Zhang, Y., Li, M., Gao, X., Chen, Y., Liu, T. (2019). Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges and opportunities. *Journal of hematology & oncology*, 12(1), 1-13.
- [228] El-Sayed, A., Kamel, M. (2020). Advances in nanomedical applications: diagnostic, therapeutic, immunization, and vaccine production. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 19200-19213.
- [229] Jin, C., Wang, K., Oppong-Gyebi, A., Hu, J. (2020). Application of nanotechnology in cancer diagnosis and therapy-a mini-review. *International Journal of Medical Sciences*, 17(18), 2964.
- [230] Li, J., Yao, M., Shao, Y., Yao, D. (2018). The application of bio-nanotechnology in tumor diagnosis and treatment: a view. *Nanotechnology Reviews*, 7(3), 257-266.
- [231] Madhurantakam, S., Babu, K. J., Rayappan, J. B. B., Krishnan, U. M. (2018). Nanotechnology-based electrochemical detection strategies for hypertension markers. *Biosensors and Bioelectronics*, 116, 67-80.
- [232] Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2), 101-124.
- [233] Fenton, O. S., Olafson, K. N., Pillai, P. S., Mitchell, M. J., Langer, R. (2018). Advances in biomaterials for drug delivery. *Advanced Materials*, 30(29), 1705328.

- [234] Utreja, P., Verma, S., Rahman, M., Kumar, L. (2020). Use of nanoparticles in medicine. *Current Biochemical Engineering*, 6(1), 7-24.
- [235] Tharayil, A., Rajakumari, R., Kumar, A., Choudhary, M. D., Palit, P., Thomas, S. (2021). New insights into application of nanoparticles in the diagnosis and screening of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Emergent Materials*, 4(1), 101-117.
- [236] Almanza-Reyes, H., Moreno, S., Plascencia-López, I., Alvarado-Vera, M., Patrón-Romero, L., Borrego, B., Reyes-Escamilla, A., Valencia-Manzo, D., Brun, A., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N. (2021). Evaluation of silver nanoparticles for the prevention of SARS-CoV-2 infection in health workers: In vitro and in vivo. *PloS one*, 16(8), e0256401.
- [237] Varahachalam, S. P., Lahooti, B., Chamaneh, M., Bagchi, S., Chhibber, T., Morris, K., Bolanos, J. F., Kim, N. Y., Kaushik, A. (2021). Nanomedicine for the SARS-CoV-2: State-of-the-Art and Future Prospects. *International journal of nanomedicine*, 16, 539–560.
- [238] Gupta, R., Sagar, P., Priyadarshi, N., Kaul, S., Sandhir, R., Rishi, V., Singhal, N. K. (2020). Nanotechnology-based approaches for the detection of SARS-CoV-2. *Frontiers in Nanotechnology*, 2, 6.
- [239] Rashidzadeh, H., Danafar, H., Rahimi, H., Mozafari, F., Salehiabar, M., Rahmati, M. A., Rahamooz-Haghighi, S., Mousazadeh, N., Mohammadi, A., Ertas, Y. N., Ramazani, A., Huseynova, I., Khalilov, R., Davaran, S., Webster, T. J., Kavetsky, T., Eftekhari, A., Nosrati, H., Mirsaedi, M. (2021). Nanotechnology against the novel coronavirus (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2): diagnosis, treatment, therapy and future perspectives. *Nanomedicine (London, England)*, 16(6), 497–516.
- [240] Chen, K., Han, H., Tuguntaev, R. G., Wang, P., Guo, W., Huang, J., Gong, X., Liang, X. J. (2021). Applications and regulatory of nanotechnology-based innovative in vitro diagnostics. *View*, 2(2), 20200091.
- [241] Jones, G. W., Monopoli, M. P., Campagnolo, L., Pietroiusti, A., Tran, L., Fadeel, B. (2020). No small matter: a perspective on nanotechnology-enabled solutions to fight COVID-19. *Nanomedicine*, 15(24), 2411-2427.
- [242] Yang, D. (2021). Application of nanotechnology in the COVID-19 pandemic. *International journal of nanomedicine*, 16, 623.
- [243] Yayehrad, A. T., Siraj, E. A., Wondie, G. B., Alemie, A. A., Derseh, M. T., Ambaye, A. S. (2021). Could Nanotechnology Help to End the Fight Against COVID-19? Review of Current Findings, Challenges and Future Perspectives. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 5713.

- [244] Missaoui, W. N., Arnold, R. D., Cummings, B. S. (2018). Toxicological status of nanoparticles: what we know and what we don't know. *Chemico-biological interactions*, 295, 1-12.
- [245] Zhao, J., Jia, T., Wang, X., Kong, X. (2014). Controlled Synthesis of Water-Soluble NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺ Nanoparticles with Surfactant Dependent Properties. *Journal of nanomaterials*, 2014.
- [246] Zhang, D., Wei, L., Zhong, M., Xiao, L., Li, H. W., Wang, J. (2018). The morphology and surface charge-dependent cellular uptake efficiency of upconversion nanostructures revealed by single-particle optical microscopy. *Chemical science*, 9(23), 5260-5269.
- [247] Jia, F., Li, G., Yang, B., Yu, B., Shen, Y., Cong, H. (2019). Investigation of rare earth upconversion fluorescent nanoparticles in biomedical field. *Nanotechnology Reviews*, 8(1), 1-17.
- [248] Mai, H. X., Zhang, Y. W., Si, R., Yan, Z. G., Sun, L. D., You, L. P., Yan, C. H. (2006). High-quality sodium rare-earth fluoride nanocrystals: controlled synthesis and optical properties. *Journal of the American Chemical Society*, 128(19), 6426-6436.
- [249] Gee, A., Xu, X. (2018). Surface functionalisation of upconversion nanoparticles with different moieties for biomedical applications. *Surfaces*, 1(1), 96-121.
- [250] Mai, H. X., Zhang, Y. W., Si, R., Yan, Z. G., Sun, L. D., You, L. P., Yan, C. H. (2006). High-quality sodium rare-earth fluoride nanocrystals: controlled synthesis and optical properties. *Journal of the American Chemical Society*, 128(19), 6426-6436.
- [251] Li, Z., Zhang, Y., Jiang, S. (2008). Multicolor core/shell-structured upconversion fluorescent nanoparticles. *Advanced Materials*, 20(24), 4765-4769.
- [252] Kaiser, M., Würth, C., Kraft, M., Soukka, T., Resch-Genger, U. (2019). Explaining the influence of dopant concentration and excitation power density on the luminescence and brightness of β -NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺ nanoparticles: Measurements and simulations. *Nano Research*, 12(8), 1871-1879.
- [253] Ziegler, A., Landfester, K., Musyanovych, A. (2009). Synthesis of phosphonate-functionalized polystyrene and poly (methyl methacrylate) particles and their kinetic behavior in miniemulsion polymerization. *Colloid and polymer science*, 287(11), 1261-1271.
- [254] Sanità, G., Carrese, B., Lamberti, A. (2020). Nanoparticle surface functionalization: How to improve biocompatibility and cellular internalization. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 381.

- [255] Thiruppathi, R., Mishra, S., Ganapathy, M., Padmanabhan, P., Gulyás, B. (2017). Nanoparticle functionalization and its potentials for molecular imaging. *Advanced Science*, 4(3), 1600279.
- [256] Ye, X., Collins, J. E., Kang, Y., Chen, J., Chen, D. T., Yodh, A. G., Murray, C. B. (2010). Morphologically controlled synthesis of colloidal upconversion nanophosphors and their shape-directed self-assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(52), 22430-22435.
- [257] Namagal, S., Jaya, N. V., Muralidharan, M., Sumithra, S. (2020). Optical and magnetic properties of pure and Er, Yb-doped β -NaYF₄ hexagonal plates for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 31(14), 11398-11410.
- [258] Li, H., Xu, L., Chen, G. (2017). Controlled synthesis of monodisperse hexagonal NaYF₄: Yb/Er nanocrystals with ultrasmall size and enhanced upconversion luminescence. *Molecules*, 22(12), 2113.
- [259] Schäfer, H., Ptacek, P., Eickmeier, H., Haase, M. (2009). Synthesis of Hexagonal Yb³⁺, Er³⁺-Doped NaYF₄ Nanocrystals at Low Temperature. *Advanced Functional Materials*, 19(19), 3091-3097.
- [260] Zhou, R., Ma, T., Qiu, B., Li, X. (2017). Controlled synthesis of β -NaYF₄: Yb, Er microphosphors and upconversion luminescence property. *Materials Chemistry and Physics*, 194, 23-28.
- [261] Han, Y., Gai, S., Ma, P. A., Wang, L., Zhang, M., Huang, S., Yang, P. (2013). Highly uniform α -NaYF₄: Yb/Er hollow microspheres and their application as drug carrier. *Inorganic Chemistry*, 52(16), 9184-9191.
- [262] Li, Z., Zhang, Y. (2008). An efficient and user-friendly method for the synthesis of hexagonal-phase NaYF₄: Yb, Er/Tm nanocrystals with controllable shape and upconversion fluorescence. *Nanotechnology*, 19(34), 345606.
- [263] Heuer-Jungemann, A., Feliu, N., Bakaimi, I., Hamaly, M., Alkilany, A., Chakraborty, I., Masood, A., Casula, M. F., Kostopoulou, A., Oh, E., Susumu, K., Stewart, M. H., Medintz, I. L., Stratakis, E., Parak, W. J., Kanaras, A. G. (2019). The Role of Ligands in the Chemical Synthesis and Applications of Inorganic Nanoparticles. *Chemical reviews*, 119(8), 4819–4880.
- [264] Das, G. K., Stark, D. T., Kennedy, I. M. (2014). Potential toxicity of up-converting nanoparticles encapsulated with a bilayer formed by ligand attraction. *Langmuir*, 30(27), 8167-8176.
- [265] Biju, V. (2014). Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. *Chemical Society Reviews*, 43(3), 744-764.

- [266] Himmelstoß, S. F., Hirsch, T. (2019). Long-term colloidal and chemical stability in aqueous media of NaYF₄-type upconversion nanoparticles modified by ligand-exchange. *Particle & Particle Systems Characterization*, 36(10), 1900235.
- [267] Muhr, V., Wilhelm, S., Hirsch, T., Wolfbeis, O. S. (2014). Upconversion nanoparticles: from hydrophobic to hydrophilic surfaces. *Accounts of chemical research*, 47(12), 3481-3493.
- [268] Meesaragandla, B., Adusumalli, V. N., Mahalingam, V. (2015). Methyl oleate-capped upconverting nanocrystals: a simple and general ligand exchange strategy to render nanocrystals dispersible in aqueous and organic medium. *Langmuir*, 31(19), 5521-5528.
- [269] Kong, W., Sun, T., Chen, B., Chen, X., Ai, F., Zhu, X., Li, M., Zhang, W., Zhu, G., Wang, F. (2017). A General Strategy for Ligand Exchange on Upconversion Nanoparticles. *Inorganic chemistry*, 56(2), 872–877.
- [270] Kembuan, C., Saleh, M., Rühle, B., Resch-Genger, U., Graf, C. (2019). Coating of upconversion nanoparticles with silica nanoshells of 5–250 nm thickness. *Beilstein journal of nanotechnology*, 10(1), 2410-2421.
- [271] Liu, J. N., Bu, W. B., Shi, J. L. (2015). Silica coated upconversion nanoparticles: a versatile platform for the development of efficient theranostics. *Accounts of chemical research*, 48(7), 1797-1805.
- [272] Li, N., Wen, X., Liu, J., Wang, B., Zhan, Q., He, S. (2016). Yb³⁺-enhanced UCNP@SiO₂ nanocomposites for consecutive imaging, photothermal-controlled drug delivery and cancer therapy. *Optical Materials Express*, 6(4), 1161-1171.
- [273] Alonso-Cristobal, P., Vilela, P., El-Sagheer, A., Lopez-Cabarcos, E., Brown, T., Muskens, O. L., Rubio-Retama, J., Kanaras, A. G. (2015). Highly Sensitive DNA Sensor Based on Upconversion Nanoparticles and Graphene Oxide. *ACS applied materials & interfaces*, 7(23), 12422–12429.
- [274] Ji, T., Xu, X., Wang, X., Zhou, Q., Chen, G. (2017). Monodisperse water-stable SiO₂-coated fluoride upconversion nanoparticles with tunable shell thickness. *International Journal of Nanomaterials, Nanotechnology and Nanomedicine*, 3(1), 015-018.
- [275] Zhang, Z., Zhang, X. L., Li, B. (2021). Mesoporous Silica-Coated Upconverting Nanorods for Singlet Oxygen Generation: Synthesis and Performance. *Materials*, 14(13), 3660.
- [276] Han, R., Wu, S., Tang, K., Hou, Y. (2020). Facilitating drug release in mesoporous silica coated upconversion nanoparticles by photoacid assistance upon near-infrared irradiation. *Advanced Powder Technology*, 31(9), 3860-3866.

- [277] Augustine, R., Hasan, A., Primavera, R., Wilson, R. J., Thakor, A. S., Kevadiya, B. D. (2020). Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components. *Materials Today Communications*, 25, 101692.
- [278] Jin, J., Gu, Y. J., Man, C. W. Y., Cheng, J., Xu, Z., Zhang, Y., Wang, H., Lee, V. H., Cheng, S. H., Wong, W. T. (2011). Polymer-coated NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺ upconversion nanoparticles for charge-dependent cellular imaging. *ACS nano*, 5(10), 7838-7847.
- [279] Polikarpov, D., Liang, L., Care, A., Sunna, A., Campbell, D., Walsh, B., Balalaeva, I., Zvyagin, A., Gillatt, D., Guryev, E. (2019). Functionalized Upconversion Nanoparticles for Targeted Labelling of Bladder Cancer Cells. *Biomolecules*, 9(12), 820.
- [280] Wu, J. (2021). The enhanced permeability and retention (EPR) effect: the significance of the concept and methods to enhance its application. *Journal of Personalized Medicine*, 11(8), 771.
- [281] Alasvand, N., Urbanska, A. M., Rahmati, M., Saeidifar, M., Gungor-Ozkerim, P. S., Sefat, F., Rajadas, J., Mozafari, M. (2017). Therapeutic nanoparticles for targeted delivery of anticancer drugs. *Multifunctional systems for combined delivery, biosensing and diagnostics*, 245-259.
- [282] Shukla, T., Upmanyu, N., Pandey, S. P., Sudheesh, M. S. (2019). Site-specific drug delivery, targeting, and gene therapy. In *Nanoarchitectonics in Biomedicine* (pp. 473-505). William Andrew Publishing.
- [283] Tee, J. K., Yip, L. X., Tan, E. S., Santitewagun, S., Prasath, A., Ke, P. C., Ho, H. K., Leong, D. T. (2019). Nanoparticles' interactions with vasculature in diseases. *Chemical Society Reviews*, 48(21), 5381-5407.
- [284] Tonga, G. Y., Moyano, D. F., Kim, C. S., Rotello, V. M. (2014). Inorganic nanoparticles for therapeutic delivery: Trials, tribulations and promise. *Current opinion in colloid & interface science*, 19(2), 49-55.
- [285] Srinivasan, G., Mane, S. (2014). EPR effect: Promising approach for tumor targeted drug delivery. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 881-889.
- [286] Kang, H., Rho, S., Stiles, W. R., Hu, S., Baek, Y., Hwang, D. W., Kashiwagi, S., Kim, M. S., Choi, H. S. (2020). Size-dependent EPR effect of polymeric nanoparticles on tumor targeting. *Advanced healthcare materials*, 9(1), 1901223.
- [287] Danhier, F. (2016). To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *Journal of Controlled Release*, 244, 108-121.

- [288] Soenen, S. J., Parak, W. J., Rejman, J., Manshian, B. (2015). (Intra) cellular stability of inorganic nanoparticles: effects on cytotoxicity, particle functionality, and biomedical applications. *Chemical reviews*, 115(5), 2109-2135.
- [289] Chen, M., Zeng, G., Xu, P., Lai, C., Tang, L. (2017). How do enzymes 'meet' nanoparticles and nanomaterials? *Trends in biochemical sciences*, 42(11), 914-930.
- [290] Mosquera, J., García, I., Liz-Marzán, L. M. (2018). Cellular uptake of nanoparticles versus small molecules: a matter of size. *Accounts of chemical research*, 51(9), 2305-2313.
- [291] de Almeida, M. S., Susnik, E., Drasler, B., Taladriz-Blanco, P., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B. (2021). Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine. *Chemical Society Reviews*, 50(9), 5397-5434.
- [292] Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E., Rodriguez-Torres, M., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of nanobiotechnology*, 16(1), 71.
- [293] Kim, D., Kim, J., Park, Y. I., Lee, N., Hyeon, T. (2018). Recent development of inorganic nanoparticles for biomedical imaging. *ACS central science*, 4(3), 324-336.
- [294] Palanikumar, L., Al-Hosani, S., Kalmouni, M., Nguyen, V. P., Ali, L., Pasricha, R., Barrera, F. N., Magzoub, M. (2020). pH-responsive high stability polymeric nanoparticles for targeted delivery of anticancer therapeutics. *Communications biology*, 3(1), 95.
- [295] Francia, V., Reker-Smit, C., Boel, G., Salvati, A. (2019). Limits and challenges in using transport inhibitors to characterize how nano-sized drug carriers enter cells. *Nanomedicine*, 14(12), 1533-1549.
- [296] Degors, I. M., Wang, C., Rehman, Z. U., Zuhorn, I. S. (2019). Carriers break barriers in drug delivery: endocytosis and endosomal escape of gene delivery vectors. *Accounts of chemical research*, 52(7), 1750-1760.
- [297] Dutta, D., Donaldson, J. G. (2012). Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cellular logistics*, 2(4), 203-208.
- [298] Tsai, E. S., Joud, F., Wiesholler, L. M., Hirsch, T., Hall, E. A. (2020). Upconversion nanoparticles as intracellular pH messengers. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412(24), 6567-6581.
- [299] Dutta, D., Williamson, C. D., Cole, N. B., Donaldson, J. G. (2012). Pitstop 2 is a potent inhibitor of clathrin-independent endocytosis. *PloS one*, 7(9), e45799.
- [300] Sikora, B., Kowalik, P., Mikulski, J., Fronc, K., Kamińska, I., Szewczyk, M., Konopka, A., Zajdel, K., Minikayev, R., Sobczak, K., Zaleszczyk, W., Borodziuk, A., Rybusiński, J.,

- Szczytko, J., Sienkiewicz, A., Wojciechowski, T., Stępień, P., Frontczak-Baniewicz, M., Łapiński, M., Wilczyński, G., Paszkowicz, W., Twardowski, A., Elbaum, D. (2017). Mammalian cell defence mechanisms against the cytotoxicity of NaYF₄:(Er, Yb, Gd) nanoparticles. *Nanoscale*, 9(37), 14259-14271.
- [301] Bae, Y. M., Park, Y. I., Nam, S. H., Kim, J. H., Lee, K., Kim, H. M., Yoo, B., Choi, J. S., Lee, K. T., Hyeon, T. Suh, Y. D. (2012). Endocytosis, intracellular transport, and exocytosis of lanthanide-doped upconverting nanoparticles in single living cells. *Biomaterials*, 33(35), 9080-9086.
- [302] Nam, S. H., Bae, Y. M., Park, Y. I., Kim, J. H., Kim, H. M., Choi, J. S., Lee, K. T., Hyeon, T., Suh, Y. D. (2011). Long-term real-time tracking of lanthanide ion doped upconverting nanoparticles in living cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(27), 6093-6097.
- [303] Li, X., Tang, Y., Xu, L., Kong, X.; Zhang, L., Chang, Y., Zhao, H., Zhang, H., Liu, X. (2017). Dependence between cytotoxicity and dynamic subcellular localization of up-conversion nanoparticles with different surface charges. *RSC advances*, 7(53), 33502-33509.
- [304] Gu, Y., Qiao, X., Zhang, J., Sun, Y., Tao, Y., Qiao, S. (2016). Effects of surface modification of upconversion nanoparticles on cellular uptake and cytotoxicity. *Chemical Research in Chinese Universities*, 32(3), 474-479.
- [305] Guller, A. E., Nadort, A., Generalova, A. N., Khaydukov, E. V., Nechaev, A. V., Kornienko, I. A., Petersen, E. V., Liang, L., Shekhter, A. B., Qian, Y., Goldys, E. M., Zvyagin, A. V. (2018). Rational Surface Design of Upconversion Nanoparticles with Polyethylenimine Coating for Biomedical Applications: Better Safe than Brighter? *ACS biomaterials science & engineering*, 4(9), 3143–3153.
- [306] Guller, A. E., Generalova, A. N., Petersen, E. V., Nechaev, A. V., Trusova, I. A., Landyshev, N. N., Nadort, A., Grebenik, E. A., M. Deyev, S. M., B. Shekhter, A. B., Zvyagin, A. V. (2015). Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells. *Nano Research*, 8(5), 1546-1562.
- [307] Song, C., Zhang, S., Zhou, Q., Shi, L., Du, L., Zhi, D., Zhaob, Y., Zhenc, Y., Zhao, D. (2017). Bifunctional cationic solid lipid nanoparticles of β -NaYF₄: Yb, Er upconversion nanoparticles coated with a lipid for bioimaging and gene delivery. *RSC advances*, 7(43), 26633-26639.
- [308] Song, Y. H., De, R., Lee, K. T. (2021). Uptake of Polyelectrolyte Functionalized Upconversion Nanoparticles by Tau-Aggregated Neuron Cells. *Pharmaceutics*, 13(1), 102.

- [309] Wang, C., He, M., Chen, B., Hu, B. (2020). Study on cytotoxicity, cellular uptake and elimination of rare-earth-doped upconversion nanoparticles in human hepatocellular carcinoma cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 110951.
- [310] Ferrera-González, J., Francés-Soriano, L., Galiana-Roselló, C., González-García, J., González-Béjar, M., Fröhlich, E., Pérez-Prieto, J. (2021). Initial Biological Assessment of Upconversion Nanohybrids. *Biomedicines*, 9(10), 1419.
- [311] Tenzer, S., Docter, D., Kuharev, J., Musyanovych, A., Fetz, V., Hecht, R., Schlenk, F., Fischer, D., Kiouptsi, K., Reinhardt, C., Landfester, K., Schild, H., Maskos, M., Knauer, S. K., Stauber, R. H. (2013). Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature nanotechnology*, 8(10), 772–781.
- [312] Yu, Y., Huang, T., Wu, Y., Ma, X., Yu, G., Qi, J. (2014). In-vitro and in-vivo imaging of prostate tumor using NaYF₄: Yb, Er up-converting nanoparticles. *Pathology & Oncology Research*, 20(2), 335-341.
- [313] Zhou, M., Ge, X., Ke, D. M., Tang, H., Zhang, J. Z., Calvaresi, M., Gao, B., Sun, L., Su, Q., Wang, H. (2019). The Bioavailability, Biodistribution, and Toxic Effects of Silica-Coated Upconversion Nanoparticles *in vivo*. *Frontiers in chemistry*, 7, 218.
- [314] Lakshmanan, A., Akasov, R. A., Sholina, N. V., Demina, P. A., Generalova, A. N., Gangadharan, A., Sardar, D. K., Lankamsetty, K. B., Khochenkov, D. A., Khaydukov, E. V., Gudkov, S. V., Jayaraman, M., Jayaraman, S. (2021). Nanocurcumin-Loaded UCNPs for Cancer Theranostics: Physicochemical Properties, In Vitro Toxicity, and In Vivo Imaging Studies. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 11(9), 2234.
- [315] Chatterjee, D. K., Rufaihah, A. J., Zhang, Y. (2008). Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. *Biomaterials*, 29(7), 937-943.
- [316] Nordmann, J., Buczka, S., Voss, B., Haase, M., Mummenhoff, K. (2015). In vivo analysis of the size-and time-dependent uptake of NaYF₄: Yb, Er upconversion nanocrystals by pumpkin seedlings. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(1), 144-150.
- [317] Yin, W., Zhou, L., Ma, Y., Tian, G., Zhao, J., Yan, L., Zheng, X., Zhang, P., Yu, J., Gu, Z., Zhao, Y. (2015). Phytotoxicity, Translocation, and Biotransformation of NaYF₄ Upconversion Nanoparticles in a Soybean Plant. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 11(36), 4774–4784.
- [318] Daviaud, N., Garbayo, E., Schiller, P. C., Perez-Pinzon, M., Montero-Menei, C. N. (2013). Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies. *Experimental neurology*, 248, 429-440.

- [319] Qi, X. R., Verwer, R. W., Bao, A. M., Balesar, R. A., Luchetti, S., Zhou, J. N., Swaab, D. F. (2019). Human brain slice culture: a useful tool to study brain disorders and potential therapeutic compounds. *Neuroscience bulletin*, 35(2), 244-252.
- [320] Walters, R., Kraig, R. P., Medintz, I., Delehanty, J. B., Stewart, M. H., Susumu, K., Huston, A. L., Dawson, P. E., Dawson, G. (2012). Nanoparticle targeting to neurons in a rat hippocampal slice culture model. *ASN neuro*, 4(6), 383–392.
- [321] Estevez, A. Y., Pritchard, S., Harper, K., Aston, J. W., Lynch, A., Lucky, J. J., Ludington, J. S., Chatani, P., Mosenthal, W. P., Leiter, J. C., Andreescu, S., Erlichman, J. S. (2011). Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. *Free radical biology & medicine*, 51(6), 1155–1163.
- [322] Kursungoz, C., Taş, S. T., Sargon, M. F., Sara, Y., Ortaç, B. (2017). Toxicity of internalized laser generated pure silver nanoparticles to the isolated rat hippocampus cells. *Toxicology and industrial health*, 33(7), 555–563.
- [323] van der Zwaag, D., Vanparijs, N., Wijnands, S., De Rycke, R., De Geest, B. G., Albertazzi, L. (2016). Super Resolution Imaging of Nanoparticles Cellular Uptake and Trafficking. *ACS applied materials & interfaces*, 8(10), 6391–6399.
- [324] Erni, R., Rossell, M. D., Kisielowski, C., Dahmen, U. (2009). Atomic-resolution imaging with a sub-50-pm electron probe. *Physical review letters*, 102(9), 096101.
- [325] Brown, A., Hondow, N. (2013). Electron microscopy of nanoparticles in cells. In *Frontiers of Nanoscience* (Vol. 5, pp. 95-120). Elsevier.
- [326] Yue, J., Feliciano, T. J., Li, W., Lee, A., Odom, T. W. (2017). Gold Nanoparticle Size and Shape Effects on Cellular Uptake and Intracellular Distribution of siRNA Nanoconstructs. *Bioconjugate chemistry*, 28(6), 1791–1800.
- [327] Costanzo, M., Carton, F., Malatesta, M. (2017). Microscopy techniques in nanomedical research. *Microscopie*, 27(1), 66-71.
- [328] Rio-Echevarria, I. M., Ponti, J., Bogni, A., Gilliland, D., Altissimo, M., Pascolo, L., Ceccone, G., Gianoncelli, A. (2019). XRF mapping and TEM analysis of coated and uncoated silica nanoparticles in A549 cells and human monocytes. *X-Ray Spectrometry*, 48(2), 94-101.
- [329] Reifarth, M., Hoepfner, S., Schubert, U. S. (2018). Uptake and Intracellular Fate of Engineered Nanoparticles in Mammalian Cells: Capabilities and Limitations of Transmission Electron Microscopy-Polymer-Based Nanoparticles. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 30(9), 10.1002/adma.201703704.
- [330] Rothen-Rutishauser, B., Kuhn, D. A., Ali, Z., Gasser, M., Amin, F., Parak, W. J., Vanhecke, D., Fink, A., Gehr, P., & Brandenberger, C. (2014). Quantification of gold

nanoparticle cell uptake under controlled biological conditions and adequate resolution. *Nanomedicine (London, England)*, 9(5), 607–621.

[331] Malatesta M. (2021). Transmission Electron Microscopy as a Powerful Tool to Investigate the Interaction of Nanoparticles with Subcellular Structures. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12789.

[332] Andrian, T., Riera, R., Pujals, S., Albertazzi, L. (2021). Nanoscopy for endosomal escape quantification. *Nanoscale Advances*, 3(1), 10-23.

[333] Ostrowski, A., Nordmeyer, D., Boreham, A., Holzhausen, C., Mundhenk, L., Graf, C., Meinke, M. C., Vogt, A., Hadam, S., Lademann, J., Rühl, E., Alexiev, U., Gruber, A. D. (2015). Overview about the localization of nanoparticles in tissue and cellular context by different imaging techniques. *Beilstein journal of nanotechnology*, 6, 263–280.

Załączniki

Załącznik nr 1

Tabela 11. Odczynniki chemiczne stosowane do syntezy nanocząstek.

Nazwa odczynnika	Producent, nr kat
Tlenek itru (III) Y_2O_3 (99,9% trace metals basis)	Sigma Aldrich, 205168
Tlenek iterbu (III) Yb_2O_3 (99,9% trace metals basis)	Sigma Aldrich, 246999
Tlenek erbu (III) Er_2O_3 (99,9% trace metals basis)	Sigma Aldrich, 289248
Kwas trifluorooctowy CF_3COOH (ang. trifluoroacetic acid, TFA, ReagentPlus®, 99%)	Sigma-Aldrich, T6508
Sól sodowa kwasu trifluorooctowego $Na(CF_3COO)$ (97%)	ACROS Organics™, 10367760
Kwas oleinowy (ang. <i>oleic acid</i> , OA, 65,0-88,0% (GC))	Sigma Aldrich, 27728
1-oktadeken (ang. <i>1-octadecene</i> , ODE, 90%)	Sigma Aldrich, O806
Cykloheksan (99%)	Chempur, 412564208
Etylowy alkohol bezwodny (99,8% czda-basic)	POCH, BA6480111
Kwas chlorowodorowy (kwas solny, HCl) (36,5-38,0%)	Sigma Aldrich, H1758
Odczynniki do kapsulkowania warstwą SiO_2	Producent, nr kat
IGEPAL CO-520	Sigma-Aldrich, 238643
Tetraetylokrzemian (TEOS, 98%)	Sigma-Aldrich, 131903
Amoniak (28-30%)	Merck, 1054231000

Wszystkie zastosowane odczynniki chemiczne posiadały najwyższy z dostępnych stopni czystości.

Tabela 12. Odczynniki stosowane do przygotowania preparatów do TEM.

Nazwa odczynnika	Producent, nr kat
Paraformaldehyd (PFA)	SERVA, 31628.02
Aldehyd glutarowy (glutaraldehyd, GA, 25%)	Agar SCIENTIFIC, R1010
Kakodylan sodu	Agar SCIENTIFIC, R1103
Buforowana fosforanem sól fizjologiczna (PBS)	Sigma-Aldrich, P3813
Czterotlenek osmu (OsO_4)	SERVA, 31251.03
Alkohol etylowy bezwodny 99,8% (etanol absolutny, czda)	POCH, 396480111
Alkohol etylowy 96%	POCH, 396420420
Octan uranylu	SERVA, 77870.01
Cytrynian ołowiu	Agar SCIENTIFIC, R1210

Tabela 13. Skład żywicy epoksydowej do zatapiania materiału TEM.

Skład żywicy	Funkcja	Użyte Proporcje	Producent, Nr kat.
Glycid ether 100 (EPON 812)	Żywica epoksydowa o niskiej lepkości	34,3 ml	SERVA, 21045.02
MNA (Methylnadic anhydride)	Utwardzacz	22,2 ml	SERVA, 29452.01
DDSA (Dodecenylnsuccinic anhydride)	Utwardzacz	15,0 ml	SERVA, 20755.01
DMP-30 (2,4,6 tris(dimethylaminomethyl)phenol)	Akcelerator	1,5 ml	Agar SCIENTIFIC, R1065

Tabela 14. Drobny sprzęt do przygotowania preparatów TEM.

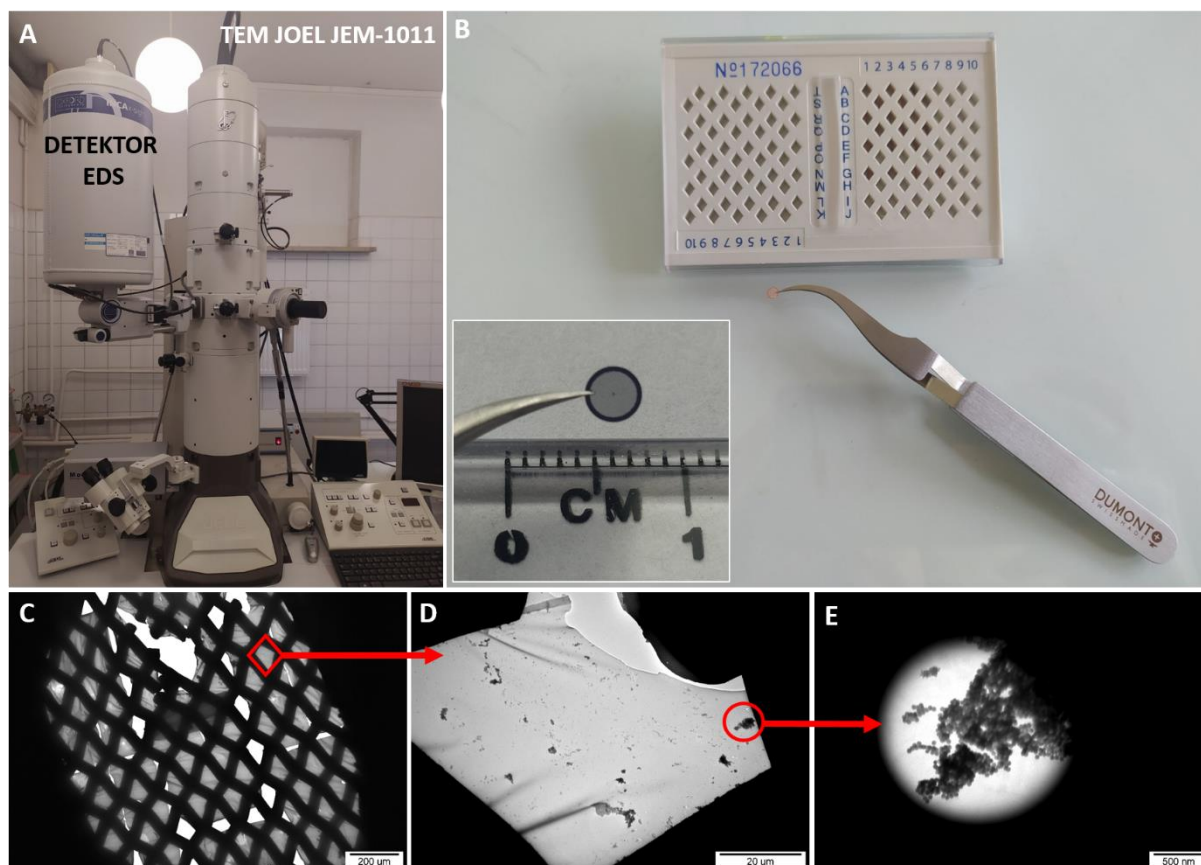
Sprzęt do zatapiania materiału w żywicy	Producent, nr kat.
Żelatynowe kapsułki (Size 1)	Electron Microscopy Sciences, 70102
Płaskie formy zagnieżdżone wykonane z gumy silikonowej	Agar SCIENTIFIC, G3531 Agar SCIENTIFIC, G369
Siatki do obrazowania TEM	Producent, nr kat.
Siatki miedziane lub nikłowe pokryte błoną formwarową (300 mesh) (do obrazowania samych NPs)	Electron Microscopy Sciences, FF300-Cu Electron Microscopy Sciences, FF300-NI-50
Siatki miedziane z kwadratową strukturą o średnicy 3,05 mm i grubości 18 µm (300 mesh) (do obrazowania UCNPs w komórkach)	Electron Microscopy Sciences, G300-18
Siatki nikłowe z kwadratową strukturą o średnicy 3,05 mm (300 mesh) (do analizy EDS)	Agar SCIENTIFIC, AGG2300N
Sprzęt do krojenia preparatów TEM	Producent
Nóż diamentowy ultra 45° Zakres grubości cięcia: 30 - 150 nm	Diatome

Tabela 15. Odczynniki stosowane w hodowli skrawków hipokampa.

Odczynniki	Producent, nr kat.
DMEM GlutaMAX™ supplement	Gibco, 10569010
Surowica końska (ang. <i>Horse Serum</i> , HS, heat inactivated)	Gibco, 26050088
HBSS (ang. <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)	Gibco, 14175095
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)	Gibco, 15630080
B-27 Supplement	Gibco, 17504044
ITS Supplement (Insulin-Transferrin-Selenium, 100x)	Gibco, 41400045
AAS (Antibiotic Antimycotic Solution, 100×)	Sigma, A5955

Barwniki fluorescencyjne	Producent, nr kat.
Jodek propidyny (1,0 mg/ml)	Sigma, P4864-10ML
Hoechst 33258 (2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi1H-benzimidazole trihydrochloride hydrate, bisBenzimide)	Abcam, ab228550

Załącznik nr 2



Rycina 79. (A) Detektor EDS INCAxsight przyłączony do TEM JEOL JEM-1011, (B) pojemnik na siatki do analizy TEM-EDS, wstawka - siatka niklowa pokryta błoną formwarową przed analizą, (C) siatka niklowa pokryta błoną formwarową na powiększeniu $\times 5000$, na którą naniesiono roztwór nanocząstek, (D) jedno oczko z siatki niklowej, (E) zakres wiązki skupionej na analizowanym obszarze z nanocząstkami.

Ilość Y w nanocząstkach NaYF₄:Er,Yb o średnicy 20 nm

$$V = \frac{4}{3}\pi R^3$$

$$d = m/v$$

$$m = dv$$

$$d = 4,21 \text{ g/cm}^3$$

$$V = \frac{4}{3} \times 3,14 \times 10^3 \text{ nm}^3 = 4,19 \times 10^3 \text{ nm}^3 = 4,19 \times 10^3 \times 10^{-21} \text{ cm}^3 = 4,19 \times 10^{-18} \text{ cm}^3$$

$$m = 4,21 \text{ g/cm}^3 \times 4,19 \times 10^{-18} \text{ cm}^3 = 17,64 \times 10^{-18} \text{ g}$$

Pierwiastki w UCNP NaYF₄:Er,Yb:

1 Na

1 ziem rzadkich - 0,78Y + 0,2Yb + 0,02Er

4 F

6 pierwiastków – 100%

1 pierwiastek ziem rzadkich – x

$$x = 16,7\%$$

1 ziem rzadkich – 16,7%

$$0,78Y - x$$

$$x = 13\% (Y=13\%)$$

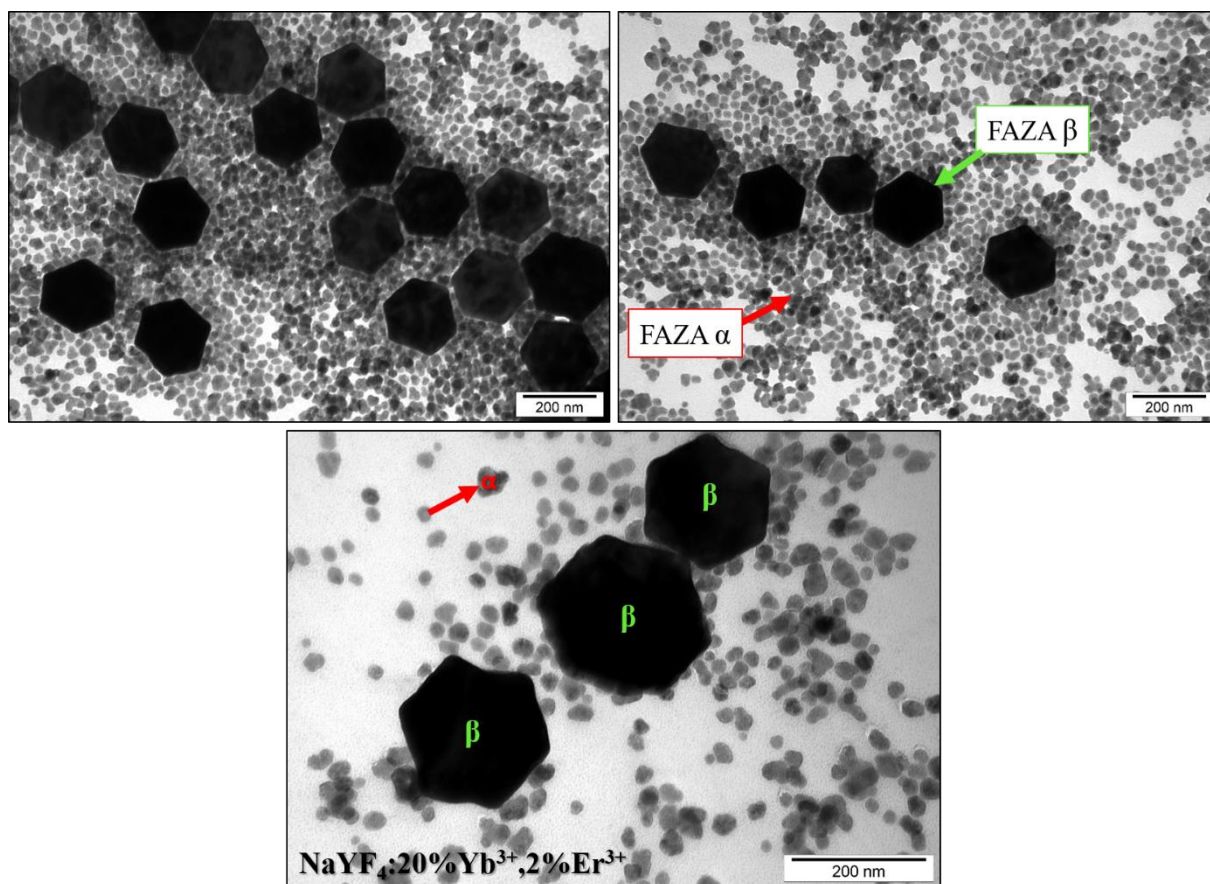
$17,64 \times 10^{-18} \text{ g}$ – masa 1 UCNP (wszystkie pierwiastki)

$17,64 \times 10^{-18} \text{ g}$ – 100%

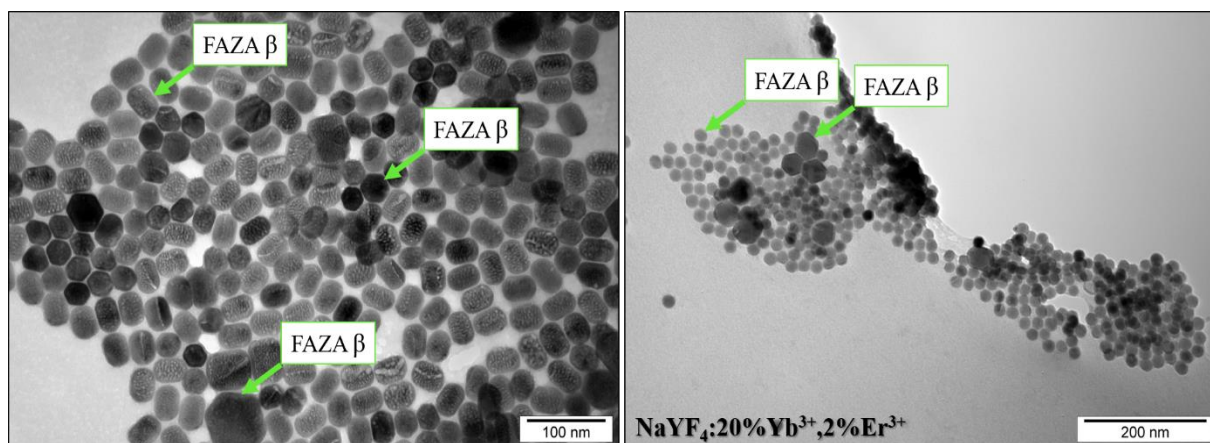
Y – 13%

$$Y = 2,29 \times 10^{-18} \text{ g}$$

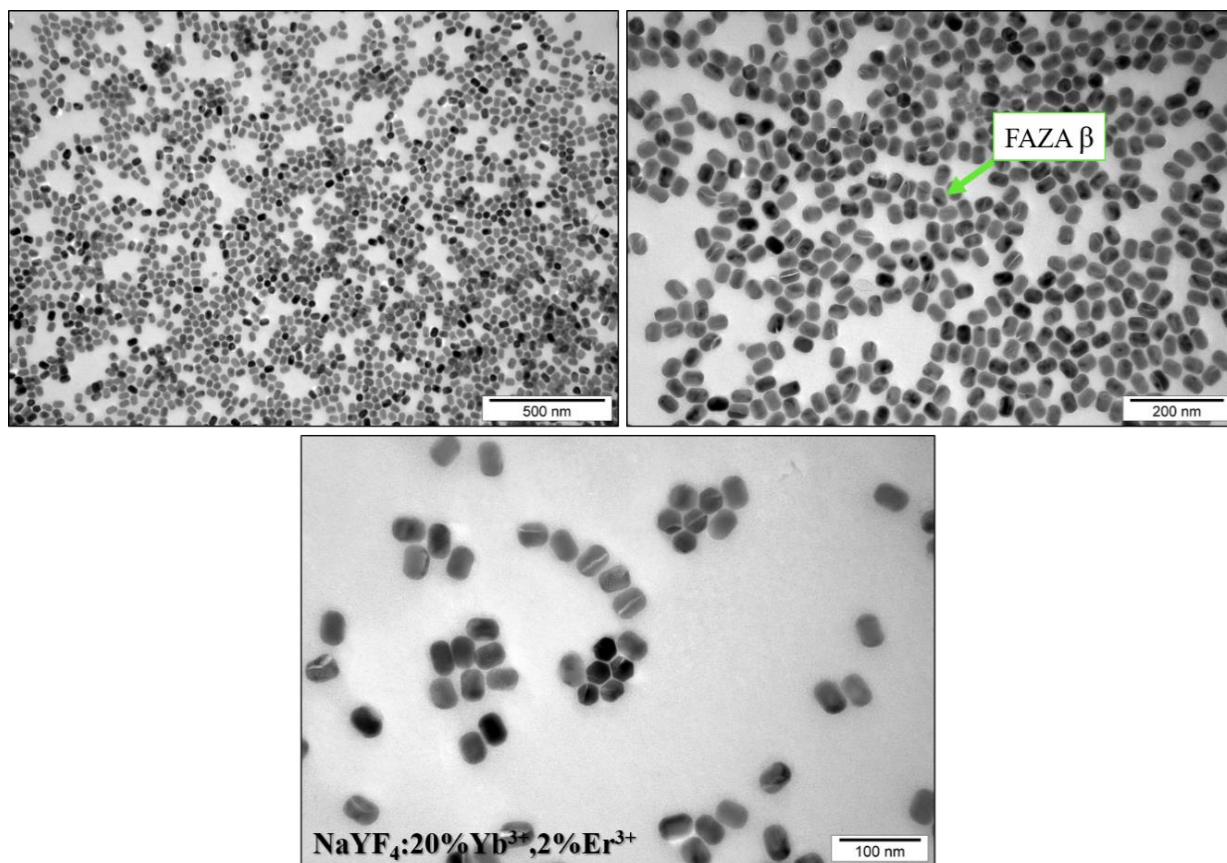
$$\underline{Y = 2,29 \times 10^{-12} \mu\text{g w 1 UCNP}}$$



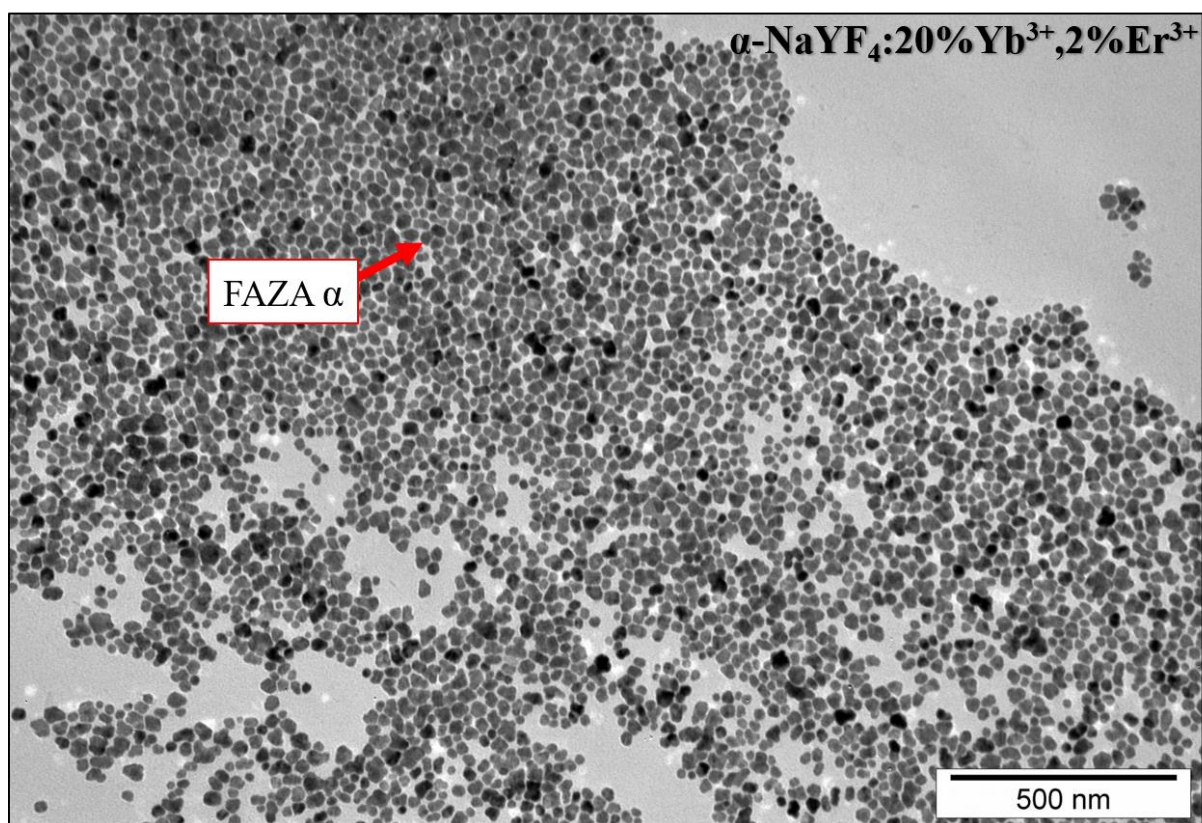
Rycina 80. Nanocząstki $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ o mieszanych fazach krystalicznych, kubicznej α oraz heksagonalnej β , otrzymane metodą współstrącania. Wybrane elektronogramy wykonane na różnych powiększeniach.



Rycina 81. Nanocząstki $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ o fazie heksagonalnej β i różnym rozmiarze otrzymane metodą współstrącania. Wybrane elektronogramy wykonane na różnych powiększeniach.



Rycina 82. Nanocząstki $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ o regularnej fazie heksagonalnej $-\beta$ i kształcie nanodrutów, otrzymane metodą współstrącania. Wybrane elektronogramy wykonane na różnych powiększeniach.



Rycina 83. Nanocząstki $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ o fazie kubicznej $-\alpha$ otrzymane metodą współstrącania.