

Instytut Niskich Temperatur i Badań strukturalnych im.
Włodzimierza Trzebiatowskiego, Polskiej Akademii Nauk



ROZPRAWA DOKTORSKA

Nicole Nowak

*Otrzymywanie oraz badanie kompozytów na bazie
nanokrystalicznych apatytów domieszkowanych biologicznie
aktywnymi jonami przeznaczonych do wypełnień ubytków
tkankowych oraz regeneracji tkanek.*

W formie spójnego tematycznie cyklu artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych

Praca doktorska wykonana w Oddziale Fizykochemii Biomedycznej oraz realizowana w ramach projektu „Multidyscyplinarne studia doktoranckie - nanotechnologia w biomedycynie”, nr umowy z Narodowym Centrum Badań i Rozwoju: POWR.03.02.00-00-I030/17-00, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej.

Promotor: prof. dr hab. Rafał J. Wigiłusz

Wrocław 2023

Niniejszą pracę dedykuję sobie

Pragnę serdecznie podziękować
prof. dr hab. Rafałowi J. Wigłuszowi,
promotorowi niniejszej pracy,
za przyjęcie mnie do swojego zespołu naukowego,
wszelką pomoc merytoryczną,
oraz za wszystkie cenne wskazówki naukowe.

Dziękuję również wszystkim przyjaciołom,
koleżankom i kolegom w szczególności
Janowi A. Zienkiewiczowi,
Dominice Czekanowskiej,
Natalii Charczuk,
Justynie Rewak-Soroczyńskiej,
Marcie Kardach
za ich nieocenioną pomoc,
życzliwość i wsparcie naukowe.

Na koniec chciałabym z całego serca podziękować moim rodzicom
Beacie i Arkadiuszowi,
za nieustającą wiarę we mnie i
wsparcie w chwilach zwątpienia.

Spis treści

1. Życiorys naukowy autora.....	6
2. Wstęp.....	10
2.1 Cel pracy.....	10
2.2 Regeneracja tkanki kostnej i nerwowej w ujęciu medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej	11
2.3 Nanometryczne związki o strukturze apatytu i ich zastosowanie w biomedycynie	16
2.4 Ogólna charakterystyka jonów lantanowców	18
2.5 Charakterystyka fizykochemiczna i biologiczna związków europu	21
2.6 Charakterystyka fizykochemiczna i biologiczna terbu	24
2.7 Właściwości biologiczne wanadu i jego związków	27
2.8 Właściwości biologiczne rubidu i jego związków	29
2.9 Właściwości biologiczne strontu i jego związków	31
2.10 Wybrane metody syntezy nanomateriałów	33
2.10.1 Metoda hydrotermalna.....	33
2.10.2 Metoda współstrącaniowa	33
2.11 Opis wykorzystywanych metod do oceny właściwości fizykochemicznych.....	34
2.11.1 Proszkowa dyfraktometria rentgenowska.....	34
2.11.2 Skaningowa mikroskopia elektronowa.....	35
2.11.3 Wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa	36
2.11.4 Technika atomowej spektroskopii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej	36
2.11.5 Spektroskopia w podczerwieni.....	37
2.11.6 Spektroskopia fotoluminescencyjna.....	38
2.12 Opis wykorzystywanych metod do oceny właściwości biologicznych .	39
2.12.1 Test cytotoksyczności.....	39
2.12.2 Ocena żywotności komórek za pomocą techniki mikroskopii fluorescencyjnej	40
2.12.3 Test hemolityczny.....	40

2.12.4 Ocena morfologii krwinek czerwonych za pomocą techniki mikroskopii świetlnej	41
3. Prezentacja wyników badań	42
3.1 Praca “ <i>A study of vanadate group substitution into nanosized hydroxyapatite doped with Eu³⁺ ion as a potential tissue replacement material</i> ”	43
3.2 Praca “ <i>Synthesis and investigation of physicochemical properties and biocompatibility of Tb³⁺ and Sr²⁺ ions co-doped phosphate-vanadate hydroxyapatite</i> ”	69
3.3. Praca “ <i>Structural, spectroscopic, and biological characterization of novel rubidium(I) and europium(III) co-doped nano-hydroxyapatite materials and their potential use in regenerative medicine</i> ”	90
4. Wnioski i podsumowania	113
5. Streszczenie	115
6. Summary	116
7. Bibliografia.....	117

1. Życiorys naukowy autora

Lista publikacji

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

1. Nowak, N.; Wiglusz, R.J. A Study of Vanadate Group Substitution into Nanosized Hydroxyapatite Doped with Eu³⁺ Ions as a Potential Tissue Replacement Material. *Nanomaterials* 2022, 12, 77. <https://doi.org/10.3390/nano12010077>
2. Charczuk, N.; Nowak, N.; Wiglusz, R.J. Synthesis and Investigation of Physicochemical Properties and Biocompatibility of Phosphate–Vanadate Hydroxyapatite Co-Doped with Tb³⁺ and Sr²⁺ Ions. *Nanomaterials* 2023, 13, 457. <https://doi.org/10.3390/nano13030457>
3. Nowak, N., Czekanowska, D., Reeks, J. M., & Wiglusz, R. J. (2022). Structural, Spectroscopic, and Biological Characterization of Novel Rubidium(I) and Europium(III) Co-Doped Nano-Hydroxyapatite Materials and Their Potential Use in Regenerative Medicine. *Nanomaterials*, 12(24), 4475. <https://doi.org/10.3390/nano12244475>

Pozostałe publikacje

1. Zawisza, K., Sobierajska, P., Nowak, N., Kedziora, A., Korzekwa, K., Pozniak, B., Tikhomirov, M., Miller, J., Mrowczynska, L., & Wiglusz, R. J. (2020). Preparation and preliminary evaluation of bio-nanocomposites based on hydroxyapatites with antibacterial properties against anaerobic bacteria. *Materials Science and Engineering C*, 106. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110295>
2. Zienkiewicz, J. A., Strzep, A., Jedrkiewicz, D., Nowak, N., Rewak-Soroczynska, J., Watras, A., Ejfler, J., & Wiglusz, R. J. (2020). Preparation and characterization of self-assembled poly(L-lactide) on the surface of β-tricalcium diphosphate(v) for bone tissue theranostics. *Nanomaterials*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/nano10020331>
3. Lubojanski, A., Dobrzynski, M., Nowak, N., Rewak-Soroczynska, J., Szytler, K., Zakrzewski, W., Dobrzynski, W., Szymonowicz, M., Rybak, Z., Wiglusz, K., Wiglusz, R.J. Application of Selected Nanomaterials and Ozone in Modern Clinical Dentistry. *Nanomaterials (Basel)*. 2021 Jan 20;11(2):259. <https://doi.org/10.3390/nano11020259>
4. Kuroпка, P., Dobrzynski, M., Bazanow, B., Stygar, D., Gebarowski, T., Leskow, A., Tarnowska, M., Szyszka, K., Malecka, M., Nowak, N., Strek, W., Wiglusz R.J., A study of the graphene oxide impact on viral infection related to A549 and TC28a2 human cell lines. – *Materials* <https://doi.org/10.3390/ma14247788>
5. Szyszka, K., Nowak, N., Kowalski, M. R., Zurkowski, J., Wiglusz R.J., Anomalous luminescence properties and cytotoxicity assessment of Sr₃(PO₄)₂ co-doped with Eu^{2+/3+} ions for luminescence temperature sensing. – *Journal of Materials Chemistry C* <https://doi.org/10.1039/D2TC00891B>

6. Rewak-Soroczynska, J., Nowak, N., Targonska, S., Piecuch, A., & Wiglusz, R. J. (2022). The Study of Nanosized Silicate-Substituted Hydroxyapatites Co-Doped with Sr²⁺ and Zn²⁺ Ions Related to Their Influence on Biological Activities. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(12), 6229–6246. <https://doi.org/10.3390/cimb44120425>
7. Sobierajska, P., Nowak, N., Rewak-Soroczynska, J., Targonska, S., Gorsman, Ł., Wiglusz, R.J. Investigation of topography effect on antibacterial properties and biocompatibility of nanohydroxyapatites activated with zinc and copper ions: In vitro study of colloids, hydrogel scaffolds and pellets,– *Materials Science & Engineering C* <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112547>

Udział i współdział w konferencjach naukowych

- Open Reading International Conference for Students of Physics And Natural Sciences (19-23.03.2019); **Nowak, N.**, Rewak-Soroczynska, J., Piecuch, A., Szustakiewicz, K., Kuroпка, P., Dobrzynski, M., and Wiglusz, R.J., “Studies and evaluation of anticancer properties of poly(L-lactide)/Sr²⁺, Eu³⁺ and Cu²⁺ ions co-doped hydroxyapatite porous sponge.” **POSTER.**
- Open Reading International Conference for Students of Physics And Natural Sciences (19-23.03.2019); Rewak-Soroczynska, J., **Nowak, N.**, Targonska, S., Piecuch, A., and Wiglusz, R.J., “New approach to antibacterial activity and safety evaluation of nanosized silicon-substituted hydroxyapatite co-doped with Zn²⁺ and Sr²⁺ ions.” **POSTER.**
- PANIC 2020 (12-14.10.2020); Zima, P., **Nowak, N.**, Szyszka, K., Wiglusz, R.J., “Influence of vanadate groups substitution on structural and spectroscopic properties of fluoroapatite doped with Eu³⁺ ions” **POSTER.**
- PANIC 2020 (12-14.10.2020) **Nowak, N.**, Zima, P., Szyszka, K., Wiglusz, R.J., “Luminescence and biological characterization of new nanosized Eu³⁺ ions doped vanadate-apatite solid state solution.” **ORAL PRESENTATION.**
- Bliżej Chemii (09-10.01.2021); Charczuk, N., **Nowak, N.**, Wiglusz, R.J., „Zastosowania biomedyczne nanoapatytów domieszkowanych jonami lantanowców.” **POSTER.**
- Festival of Life and Earth Sciences (02.02.2021); Charczuk, N., **Nowak, N.**, Wiglusz, R.J., „Biomedical applications of lanthanide ion-doped nanoapatites.” **POSTER.**
- XVII Wrocławskie Sympozjum Chemiczne (15-16.05.2021); Charczuk, N., **Nowak, N.**, Wiglusz, R.J., „Hydroksyapatyt jako matryca w systemach kontrolowanego dostarczania leków.” **POSTER.**
- Open Readings 2022, 65th International Conference for Students Of Physics And Natural Sciences (15-18.03.2022) **Nicole Nowak**, Gebarowski Tomasz and Rafal J. Wiglusz „Collagen based scaffold with hydroxyapatite doped with rubidium ions enhances viability and forming of cellular network of dental pulp stem cells” – **POSTER.**

- AMBRA 1st International Conference on Advanced Materials for Bio-Related Applications; **Nowak, N.**, Czekanowska, D. & Wiglusz, R.J., “New approach of nanosized hydroxyapatite crystals doped with rubidium and europium ions.” **ORAL PRESENTATION.**
- Open Readings 2023, 66th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences (18-21.04.2013) **Nowak, N.**, Czekanowska, D., Gebarowski, T., Wiglusz, R.J., “Enhanced bioimaging properties of nanosized fluoroapatite composites, doped with europium(III) ions via incorporation of rubidium(I) ions” **ORAL PRESENTATION.**
- Open Readings 2023, 66th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences (18-21.04.2013) Czekanowska, D., **Nowak, N.**, Wiglusz, R.J., “Biocompatible Hydroxyapatites Co-Doped with Terbium(III) And Rubidium(I) Ions As Highly Functional Materials For Biomedical Applications” **POSTER.**
- PANIC Summer School 2023 (15-19.05.2023) Czekanowska, D., **Nowak, N.**, Wiglusz, R.J., “Biocompatible Fluorapatites co-doped with Terbium(III) And Rubidium(I) Ions as Highly Functional Materials for Biomedical Applications” **POSTER.**

Szkoły i szkolenia

- Ukończenie kursu: Kurs Dla Osób Odpowiedzialnych Za Planowanie, Wykonywanie Procedur i Doświadczeń Oraz Uśmiercających Zwierzęta. Organizator POLLASA (15.02.2021 – 03.03.2021).
- Ukończenie kursu: Kurs Teoretyczny Dla Osób Uczestniczących w Wykonywaniu Procedur Doświadczalnych. Organizator POLLASA (10.05.2021 – 12.05.2021) .
- Zajęcia z metodologii badań naukowych i komercjalizacji wyników oraz z ochrony własności intelektualnej (Workshop w ramach projektu pt.: „Multidyscyplinarne studia doktoranckie - nanotechnologia w biomedycynie”, nr Umowy zawartej z Narodowym Centrum Badań i Rozwoju: POWR.03.02.00-00-I030/17-00,) – Zajęcia Leadership **6.12.2021 – 07.12.21/09.12.2021.**
- Warsztaty pomiarowe w ramach zajęć z metodologii badań naukowych i komercjalizacji wyników oraz z ochrony własności intelektualnej (w ramach projektu pt.: „Multidyscyplinarne studia doktoranckie - nanotechnologia w biomedycynie”, nr Umowy zawartej z Narodowym Centrum Badań i Rozwoju: POWR.03.02.00-00-I030/17-00, - **28.02.2022.**
- Essential Molecular Biology – ‘Hands on’ Laboratory Course, 21st edition at Faculty of Medicine, University of Porto. **27.06 – 15.07.2022.**

Współdziałal w projektach naukowych

- Stypendium w ramach projektu Multidyscyplinarne studia doktoranckie - nanotechnologia w biomedycynie, nr umowy z Narodowym Centrum Badań i Rozwoju: POWR.03.02.00-00-I030/17-00, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej.
- Stypendium w ramach projektu finansowanym przez NCN "Preparation and modulation of spectroscopic properties of $YXZO_4$, where X and Z - P^{5+} , V^{5+} , As^{5+} , doped with "s²-like" ions and co doped with rare earth ions" (No. UMO-2019/33/B/ST5/02247).

Współdziałal w tworzeniu wniosków patentowych

- Współdziałal w tworzeniu i opracowaniu wniosku patentowego pt. "Formuła wypełniacza tkankowego w medycynie estetycznej" – wniosek zgłoszony

2. Wstęp

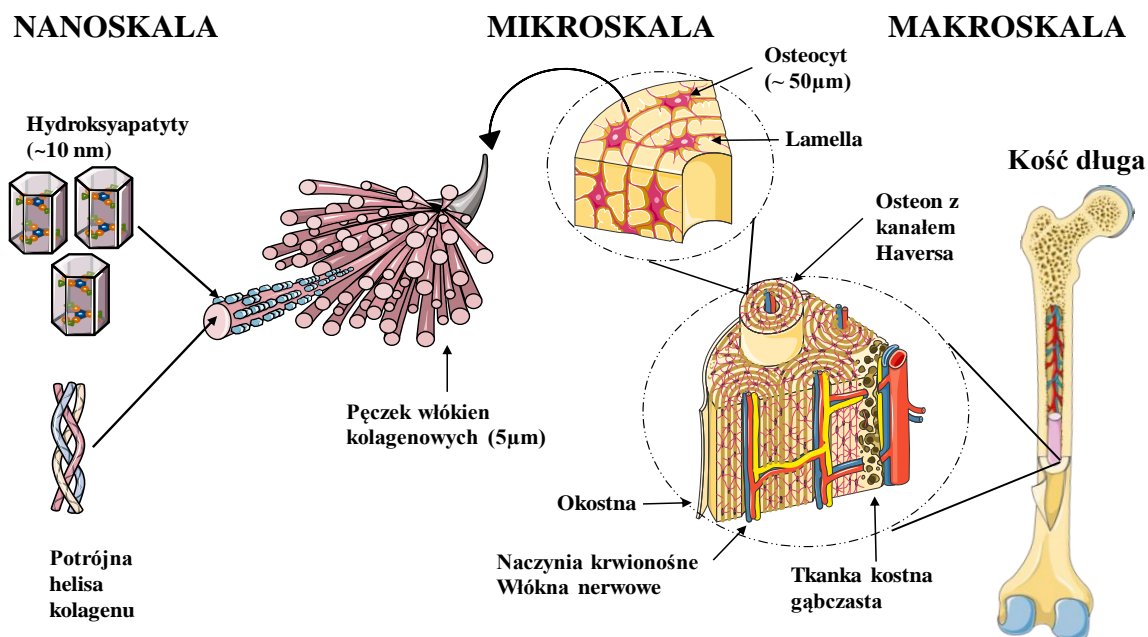
2.1 Cel pracy

Celem pracy doktorskiej było zaprojektowanie, otrzymanie oraz scharakteryzowanie nowych biokompozytów na bazie syntetycznych nanorozmiarowych apatytów fosforanowo-wanadowych, które mogą znaleźć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej oraz inżynierii tkankowej do odbudowy uszkodzeń kostnych i tkanek towarzyszących. Struktura apatyty tworzy nieorganiczne rusztowanie aktywnych biologicznie kompozytów. Ponadto, syntetyczny apatyt służy jako matryca do uwalniania biologicznie aktywnych jonów w celu stopniowej regeneracji komórek i tkanek. Jony Eu^{3+} jako optycznie aktywna domieszka wykorzystywane są w różnych matrycach nieorganicznych i organicznych jako sondy optyczne służące do bioobrazowania, zwłaszcza w badaniach *in vitro*. Jony Eu^{3+} mogą być również wykorzystywane jako nośniki leków i służyć do monitorowania uwalniania się substancji aktywnej w czasie. Inne optycznie czynne jony, takie jak jony Tb^{3+} , znane ze swojej zielonej emisji w zakresie spektralnym od 480 do 560 nm, mogą służyć jako alternatywa dla jonów Eu^{3+} . Pierwiastki biologicznie aktywne takie jak stront, wanad czy rubid znane są ze swoich właściwości indukujące proliferację zdrowych komórek oraz przyspieszające procesy metaboliczne związane z szybszą regeneracją tkanek. Taka domieszka poprawia właściwości biologiczne syntetycznego materiału o strukturze apatyty i wpływa na poprawę jego biogodności tkankowej.

Podczas realizacji pracy doktorskiej skupiono się na otrzymaniu nanometrycznych związków o strukturze apatyty domieszkowanych jonami lantanowców Eu^{3+} i Tb^{3+} jak również jonami aktywnymi biologicznie takimi jak Sr^{3+} , V^{5+} oraz Rb^{+} . Otrzymane materiały zostały przebadane pod kątem właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych. Specjalnie zaprojektowane nanometryczne związki o strukturze apatyty domieszkowane jonami optycznie czynnymi mogą posłużyć jako biosondy do monitorowania tkanek i komórek. Natomiast, dodatkowa domieszka w postaci jonów biologicznie czynnych przyspieszy regenerację tkanki kostnej i towarzyszącej jej tkance nerwowej oraz chrzęstnej.

2.2 Regeneracja tkanki kostnej i nerwowej w ujęciu medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej

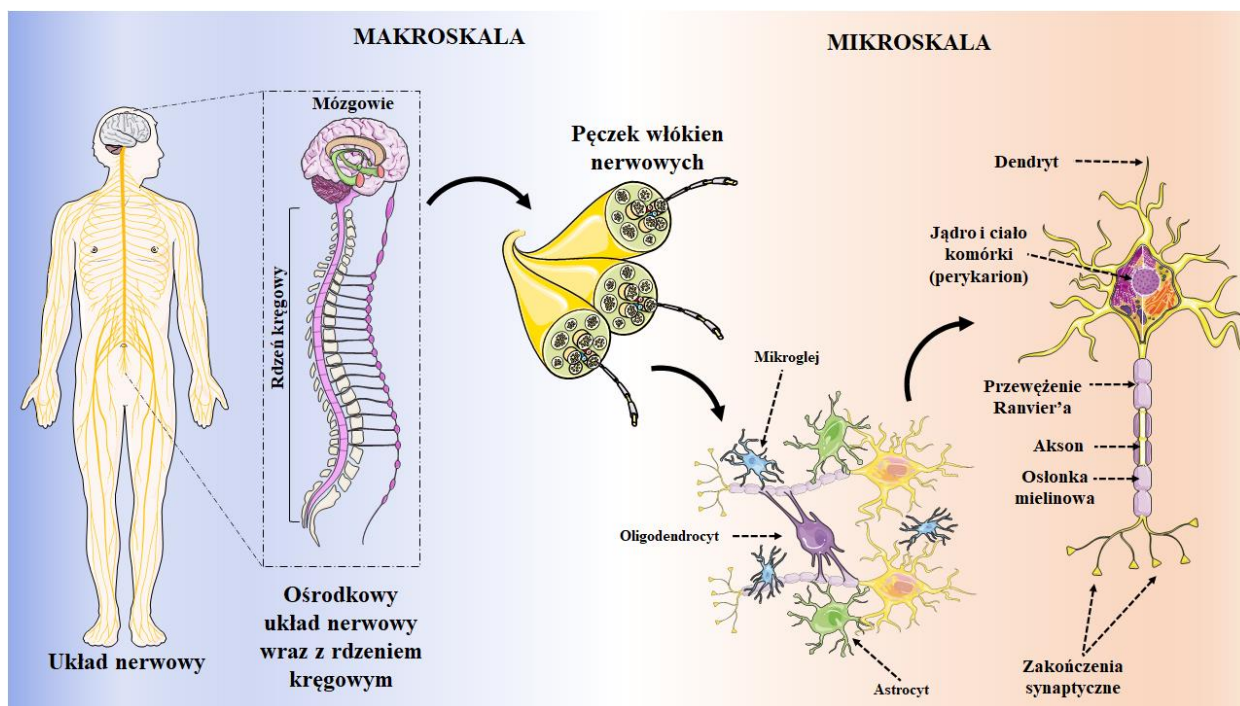
Układ kostny kręgowców jest bardzo złożoną konstrukcją, nie tylko ze względu na liczbę i różnorodność wielkości czy kształtu samych kości, ale także ze względu na złożoność tkanek znajdujących się w ich stałym i nierozłącznym sąsiedztwie [1,2]. Jednostkę funkcjonalną kości tworzą koncentryczne kręgi otaczające kanał Havers'a, natomiast cała struktura nazywana jest systemem Havers'a lub osteonem. System ten tworzy kompleksową strukturę, w której zlokalizowane są sieci naczyń krwionośnych oraz sieci włókien nerwowych, umożliwiając w ten sposób dostarczanie składników odżywczych oraz usuwanie produktów przemiany materii jak również przekazywanie impulsów nerwowych [2]. Równie ważną i nieodłączną częścią struktury kostnej jest tkanka chrzęstna. Zlokalizowana jest na powierzchniach struktur kostnych tworząc powierzchnię stawową. Oprócz tego, ważną rolę fizjologiczną i strukturalną układu kostnego jest to, że stanowi on punkt przyczepu dla ścięgien, więzadeł i mięśni szkieletowych. Tak skomplikowana, ale jednocześnie sprawnie funkcjonująca konstrukcja umożliwia skoordynowane poruszanie w przestrzeni trójwymiarowej [3]. Rysunek 1 przedstawia schematyczną budowę układu kostnego rozpoczynając od nanoskali, gdzie związki o strukturze hydroksyapatytu tworzą wraz z włóknami kolagenowymi macierz zewnątrzkomórkową, gdzie w mikroskali osadzone są podstawowe komórki kostne, osteocyty. W makroskali zawarte są natomiast większe elementy tzw. osteony, które razem tworzą tkankę kostną zbitą, budującą zewnętrzną strukturę kości. Urazy kości, zwłaszcza w przypadku poważnych złamań, takich jak złamania otwarte, stanowią problem nie tylko w regeneracji samej tkanki kostnej, ale także w tkankach sąsiadujących z uszkodzoną kością, takich jak chrząstka, tkanka mięśniowa czy nerwowa, a także skóra [4–6]. Regeneracja i gojenie tkanki kostnej to fizjologiczny proces naprawczy organizmu. W optymalnych warunkach procesy naprawcze mogą doprowadzić do całkowitej odnowy struktury kości i tkanek miękkich, jednak możliwości naprawcze tkanki nerwowej są dość ograniczone [7]. Wiąże się to z długim procesem rekonwalescencji i często nie przynosi pożądaných efektów, szczególnie w przypadku uszkodzonych struktur, takich jak czaszka i kręgosłup, które chronią najważniejsze części ludzkiego ciała mózg i rdzeń kręgowy [8,9].



Rysunek 1. Schematyczna budowa układu kostnego. Rysunek stworzony za pomocą grafik Servier Medical Art. Źródło: opracowanie własne.

Układ nerwowy stanowi kompleksową strukturę wyspecjalizowanych komórek, która jest integralną częścią żywych organizmów. Jego funkcją jest odbieranie bodźców ze środowiska zewnętrznego, przekazywanie, przetwarzanie, a następnie wysyłanie sygnału zwrotnego, co wiąże się z odpowiednią reakcją organizmu. U kręgowców układ nerwowy składa się z ośrodkowego układu nerwowego – OUN lub CUN (z ang. Central Nervous System) oraz z obwodowego układu nerwowego – PNS (z ang. Peripheral Nervous System). OUN to najważniejsza część systemu nerwowego, w którego skład wchodzi mózg, rdzeń przedłużony oraz rdzeń kręgowy [10,11]. Natomiast elementy składowe PNS to zwoje nerwowe, nerwy czaszkowe, nerwy rdzeniowe, nerwy układu autonomicznego oraz zakończenia nerwowe, które rozgałęziają się, aby unerwić każdą część ciała. Na poziomie komórkowym system nerwowy zdefiniowany jest obecnością specjalnego typu wydłużonych komórek zwanych neuronami. Neurony posiadają dendryty, są to specjalne wypustki cytoplazmatyczne, tworzące tak zwane drzewo dendrytyczne oraz zlokalizowane na przeciwnym biegunie aksony, które umożliwiające szybkie i precyzyjne odbieranie i przekazywanie sygnałów z jednej komórki do drugiej [10,11]. Samym neuronom towarzyszą inne wyspecjalizowane komórki znane jako komórki glejowe. Stanowią one podporę dla neuronów, zapewniając im wsparcie zarówno strukturalne, metaboliczne i naprawcze. Oprócz tego utrzymują homeostazę, a także tworzą osłonkę mielinową przez co wpływają na szybkość przekazywania impulsów nerwowych [12]. Dla lepszego zobrazowania budowy układu nerwowego na Rysunku 2 znajduje się uproszczony schemat budowy układu nerwowego rozpoczynając od budowy pojedynczej komórki nerwowej oraz lokalizację komórek glejowych. Większe elementy budujące układ nerwowy to włókna oraz pęczki włókien nerwowych, co łącznie buduje zarówno ośrodkowy oraz obwodowy układ nerwowy. Neurony powstają w

procesie neurogenezy, w którym to komórki układu nerwowego produkowane są przez nerwowe komórki macierzyste (ang. Neural Stem Cells) NSC [13–15]. U ssaków proces ten zachodzi najbardziej intensywnie podczas rozwoju embrionalnego, czego w efekcie końcowym powstaje dobrze rozwinięty ośrodkowy i obwodowy układ nerwowy [16]. W przypadku mózgu ssaków wzmożony proces neurogenezy występuje w obszarze znanym jako hipokamp, którego funkcją jest tworzenie nowych wspomnień deklaratywnych [17]. Istnieją jednak doniesienia, że u ludzi neurogeneza w rejonie hipokampu gwałtownie spada tuż po urodzeniu, a po około 2 latach utrzymuje się na bardzo znikomym poziomie [17]. Dlatego w dorosłym życiu proces ten obserwowany jest tylko w określonych częściach ośrodkowego układu nerwowego, takich jak zakręt zębaty hipokampu a dokładniej w warstwie podziernistej, znajdującej się pomiędzy wnęką i warstwą ziarnistą. Tam, powstałe z nerwowych komórek macierzystych nowe neurony zaangażowane są w tworzenie pamięci i uczenie się [18]. Neurogeneza obserwowana jest też w strefie podkomorowej, występującej podwyściółkowo w obszarach komór bocznych mózgowia, gdzie nerwowe komórki macierzyste migrują do opuszki węchowej, gdzie różnicują się w interneurony uczestniczące w odbieraniu bodźców węchowych [19–21].



Rysunek 2. Schematyczna budowa układu nerwowego człowieka. Rysunek stworzony za pomocą grafik Servier Medical Art. Źródło: opracowanie własne.

Zdolność regeneracyjna oraz możliwości autonaprawy tkanki nerwowej są ograniczone tylko do dwóch małych obszarów znajdujących się w ośrodkowym układzie nerwowym. Z tych powodów urazy układu nerwowego są poważnym problemem klinicznym, wymagającym długotrwałej terapii i często zagrażającym życiu. Dlatego współczesne procedury terapeutyczne medycyny regeneracyjnej opierają się na zastosowaniu materiałów bioaktywnych, które aktywują komórki nerwowe o wzmożonym potencjale regeneracyjnym. Wyzwanie dotyczy oceny materiałów umożliwiających lepszą stymulację regeneracji tkanki nerwowej. Jednak do projektowania takich materiałów niezbędne jest zdobycie podstawowej wiedzy dotyczącej oddziaływań między materiałem a komórkami tkanki nerwowej, z uwzględnieniem różnic w ich potencjale strukturalnym i czynnościowym na poziomie komórkowym. Uwzględnienie delikatnej, ale jednocześnie stymulacji tkanki nerwowej biozgodnymi i bioaktywnymi materiałami wydaje się być najbardziej atrakcyjnym trendem terapeutycznym, który doprowadzi do poprawy warunków życia wielu osób dotkniętych zaburzeniami neurologicznymi. Dlatego tak ważny jest dobór odpowiedniej strategii i metod leczenia, które jednocześnie pobudzą pulę komórek macierzystych w organizmie do szybszej regeneracji zarówno kości, jak i towarzyszących im włókien oraz komórek nerwowych [1,22,23].

Fizjologiczne procesy naprawy tkanek i narządów obejmują różnorodne czynniki wzrostu, hormony i cytokiny, ale przede wszystkim komórki macierzyste. Najważniejszymi kostnymi cegiełkami biologicznymi są prekursorzy osteoblastów zwanych multipotencjalnymi komórkami

mezenchymalnymi, które odpowiednio pobudzone mogą przyczynić się do szybszej regeneracji tkanki kostnej. Podczas urazu, w miejscu ubytku kostnego, działanie mediatorów i czynników wzrostu prowadzi do różnicowania się komórek mezenchymalnych w osteoblasty. Naturalnymi, biologicznymi czynnikami stymulującymi osteoindukcję, zwłaszcza w miejscu uszkodzenia tkanki kostnej, są cytokiny prozapalne, takie jak interleukina 1 (IL-1), interleukina 6 (IL-6), interleukina 11 (IL-11), interleukina 18 (IL-1) -18) i czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α). Wszystkie wymienione interleukiny są produkowane i wydzielane przez komórki mezenchymalne i zapalne [24]. Głównym celem tych cytokin jest indukcja dalszych mediatorów w celu zwabienia innych komórek zapalnych i nasilenia syntezy białek macierzy pozakomórkowej (ECM), a tym samym rekrutacji endogennych komórek fibrogenicznych do miejsca złamania, a w konsekwencji usprawnienia procesu gojenia kości. Ponadto, są one również znane jako regulatory tworzenia i przebudowy kości śródchrzęstnej. Sygnalizacja TNF- α odgrywa jednak ważną rolę w naprawie złamań, a brak TNF- α skutkuje upośledzeniem gojenia się złamań [25]. Zarówno białka morfogenetyczne kości (BMP), jak i transformujące czynniki wzrostu (TGF) odgrywają kluczową rolę w procesie przebudowy i gojenia kości. Wydzielane cząsteczki sygnałowe, takie jak BMP, regulują procesy, takie jak naprawa i tworzenie kości i chrząstek. Ponadto jako morfogeny plejotropowe, BMP odgrywają kluczową rolę we wzroście, różnicowaniu i apoptozie chondroblastów, osteoblastów i komórek nerwowych [26–28]. Udowodniono również, że BMP-2, BMP-6 i BMP-9 indukują różnicowanie osteoblastów mezenchymalnych komórek progenitorowych. Wszystkie komórki biorące udział w procesie regeneracji kości wytwarzają i uwalniają transformujące czynniki wzrostu do środowiska pozakomórkowego. Czynniki te nie tylko przyciągają mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) do miejsca złamania, ale także stymulują proliferację MSC oraz chondrocytów i osteoblastów [27–30]. TGF- β są silnymi chemotaktycznymi stymulatorami mezenchymalnych komórek macierzystych i wzmacniają proliferację MSC, preosteoblastów, chondrocytów i osteoblastów [31]. Potencjalnie TGF- β są uważane za czujniki molekularne, które reagują na zaburzenia ECM, uwalniając aktywne TGF- β jako czynniki sprzyjające migracji, mobilizując w ten sposób migrację MSC z krwi obwodowej lub otaczających tkanek i rekrutując MSC do udziału w naprawie i przebudowie tkanek [31]. Niektóre badania wykazały, że TGF- β były aktywowane w macierzy naczyniowej zarówno w szczurzych, jak i mysich modelach mechanicznego uszkodzenia tętnic [32]. Aktywny TGF- β uwolniony z uszkodzonych naczyń indukował migrację MSC. Ponadto, inne badania przedstawiają zależny od dawki proces gojenia się złamań czaszki u królików po leczeniu TGF- β 1 oraz zwiększoną stymulację, rekrutację i proliferację osteoblastów w miejscu ubytku [33].

Nerwowe komórki macierzyste (NSC) to pula komórek dająca początek neuronalnym komórkom progenitorowym, a ostatecznie neuronom, astrocytom i oligodendrocytom.

Neurogeneza w tym regionie jest regulowana przez różne czynniki na poziomie proliferacji komórek, determinacji losu i przeżycia. Sygnalizacja TGF- β odgrywa ważną rolę w utrzymaniu i proliferacji NSC [34]. W przypadku uszkodzeń mózgu lub neurodegeneracji, TGF- β 1 jest regulowany w górę i aktywowany w komórkach astrogleju, neuronach i mikrogleju oraz koordynuje odpowiedzi komórkowe związane z korzystnym lub szkodliwym wpływem na neurogenezę w zależności od kontekstu komórkowego [35]. Co ciekawe, białka morfogenetyczne kości i transformujące czynniki wzrostu, znane również jako czynniki neurotroficzne (NTF), to rodzina biomolekuł, które wspierają wzrost, przeżycie i różnicowanie zarówno rozwijających się, jak i dojrzałych neuronów [36].

Biorąc pod uwagę ilość oraz złożoność powyższych czynników biologicznych wpływających na naturalne procesy regeneracji zarówno tkanki kostnej jak i towarzyszącej jej tkanki nerwowej niezmiernie ważne staje się opracowywanie nowych metod terapii, które mogłyby zostać wykorzystywane zarówno w inżynierii tkankowej jak i medycynie regeneracyjnej.

2.3 Nanometryczne związki o strukturze apatyty i ich zastosowanie w biomedycynie

Materiały wapniowo-fosforanowe (CaP) charakteryzują się szerokim wachlarzem zastosowań jako m.in. katalizatory oraz nośniki katalizatorów, materiały wykorzystywane w inżynierii chemicznej, absorbenty oraz jako biomateriały [37]. Biorąc pod uwagę docelowe zastosowanie materiałów wapniowo-fosforanowych istotnym staje się przede wszystkim otrzymanie odpowiedniego krystalicznego materiału o odpowiednim rozmiarze w skali nanometrycznej. Najważniejszym nieorganicznym elementem budującym rusztowanie dla kości i zębów są nanokrystaliczne materiały wapniowo-fosforanowe o strukturze hydroksyapatytu wapnia, niemniej w tkance kostnej mogą pojawić się również takie materiały nieorganiczne jak fosforan wapnia, fosforan magnezu, czy węgiel wapnia [38–42].

Krystaliczna struktura oraz skład chemiczny naturalnie występujących apatyty może być różna w zależności od miejsca występowania, na przykład związki o strukturze apatyty występujące w kościach i zębach mogą posiadać zdecydowanie inną strukturę i skład niż te występujące w skałach osadowych [43,44]. To samo dotyczy syntetycznych związków o strukturze apatyty, gdzie skład chemiczny, rozmiar oraz struktura będą zależeć od warunków reakcji chemicznej oraz od użytych substratów [45,46].

Ogólny wzór chemiczny związków o strukturze apatyty można przedstawić jako $M_{10}(TO_4)_6X_2$, gdzie M to najczęściej jony metali na +2 stopniu utlenienia, typu Ca^{2+} . Stwarza to możliwość podstawienia ich przez inne jony, na przykład dwuwartościowe jony takie jak Mn^{2+} , Sr^{2+} ale również jednowartościowe jony typu Na^+ , K^+ , Ag^+ , Rb^+ , oraz trójwartościowe jony metali

ziem rzadkich, takie jak jony Eu^{3+} , czy Tb^{3+} [45,47]. Pozycja tetraedryczna „T” obsadzona jest przez jony P^{5+} , gdzie w połączeniu z tlenem tworzy grupę fosforanową PO_4^{3-} . Grupa ta może być zastąpiona z powodzeniem przez inne grupy anionowe, takie jak SiO_4^{4-} , VO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , MnO_4^{3-} , BeF_4^{2-} , BO_4^{5-} [48,49]. Ostatnie miejsce „X” obsadzone jest przez grupy hydroksylowe OH^- , aniony fluorkowe F^- , chlorkowe Cl^- czy też grupy węglanowe CO_3^{2-} [43,47–49]. I tak wśród rodziny minerałów fosforanów wapnia, do których należą apatyty wymienić można najczęściej występujące: hydroksyapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - HAp, fluorapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ - FAp, chlorapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$ - ClAp oraz apatyt węglanowy - CO_3Ap [43–47]. Apatyt stechiometryczny krystalizuje w układzie jednoskośnym w grupie przestrzennej $P2_1/b$, natomiast tzw. niestechiometryczne związki o strukturze apatyty krystalizują w układzie heksagonalnym w grupie przestrzennej $P6_3/m$ [47,48].

Nanostrukturalne związki o strukturze apatyty są głównymi składnikami wielu matryc biologicznych, tworząc fazę stałą występującą w kościach kręgowców, szkliwie zębów i zębienie [44,50]. Jak już wspomniano oprócz naturalnie występujących związków o strukturze apatyty często otrzymuje się ich syntetyczne analogi. W związku z tym możliwe jest wykorzystanie biokompatybilności naturalnie występujących w związkach o strukturze apatyty i zaprojektowanie matryc o ulepszonych i kontrolowanych właściwościach mechanicznych i biochemicznych. Syntetyczne związki bazujące na strukturze apatyty są z powodzeniem wykorzystywane w takich dziedzinach naukowych jak nanotechnologia, biomedycyna, inżynieria tkankowa czy teranostyka (*ang.* theranostics - therapeutics and diagnostics). Przykładowe zastosowania nanoceramiki apatytowej obejmują rusztowania, chirurgię szczękowo-twarzową do regeneracji ubytków kostnych oraz bioobrazowanie [51]. Substytucja pierwiastkowa jonów wapnia na inne jony biologicznie czynne stwarza możliwości uzyskania pożądanych właściwości związków do zastosowań biomedycznych. Jak już wspomniano miejsce jonów wapnia (Ca^{2+}) mogą zajmować różne jony, które mają podobny stopień utlenienia i promień jonowy, włącznie z optycznie czynnymi jonami lantanowców, czy jonami pierwiastków ziem alkalicznych [52,53]. Domieszkowanie aktywnymi optycznie jonami może poprawić właściwości luminescencyjne tych materiałów, rozszerzając w ten sposób zastosowania ich jako markerów do bioobrazowania [54,55].

Po sukcesie w dziedzinach nauk fizycznych, chemicznych i medycznych, nanotechnologia zaczęła obecnie rewolucjonizować nauki biologiczne czy farmaceutyczne. Szczególne zalety nanomateriałów obejmują lepszą farmakodynamikę, farmakokinetykę, zmniejszoną toksyczność i zdolność celowania [56–58]. Biokompatybilność i stymulacja osteoindukcyjna w kierunku komórek kostnych to dobrze znane właściwości związków o strukturze hydroksyapatytu wapnia. Wysoko rozwinięta powierzchnia właściwa syntetycznego hydroksyapatytu stwarza możliwości tworzenia silnego wiązania z żywymi tkankami, takimi jak kość i tkanka zębowa [46,59].

Dodatkowo, dzięki właściwościom fotostabilności luminescencji jonów metali ziem rzadkich, hydroksyapatyty wapniowe mogą być stosowane jako biokompatybilne biosensory do obrazowania komórek lub tkanek [60]. Zarówno naturalny, jak i syntetyczny hydroksyapatyt wapnia jest szeroko stosowany do tworzenia trójwymiarowych rusztowań do wypełnień kości i zębów [61–63]. W wielu badaniach potwierdzono, że zwłaszcza rusztowania na bazie związków o strukturze hydroksyapatytu wapnia w połączeniu z biodegradowalnymi biomateriałami polimerowymi, takimi jak kolagen, kwas polilaktydowy, chitozan czy alginian, dają obiecujące efekty ze względu na ich zdolność do oddziaływania z żywymi tkankami, wysoką biogodnością oraz indukcją proliferacji komórek i wzrostu tkanki kostnej [3,23,64–67].

Co ciekawe fluorapatyt wapnia jako bardziej odporny na demineralizację związaną z tworzeniem kości, uznaje się za lepszy i stabilniejszy substytut hydroksyapatytu wapnia w zastosowaniach biomedycznych [68]. Badania fizykochemiczne dowodzą, że w porównaniu z hydroksyapatytem wapnia, fluorapatyt wapnia charakteryzują się większą gęstością wraz ze wzrostem stężenia jonów fluorkowych w matrycy apatytowej. Ponadto, poprzez powolną i stopniową demineralizację zmniejszona zostaje również reaktywność jonów aktywnych zawartych w matrycy [51]. Uwolnione jony aktywne w postaci jonów fluorkowych mają istotne znaczenie w procesach fizjologicznych w organizmie. Fluor jako jeden z istotnych pierwiastków śladowych odgrywa ważną rolę w metabolizmie kości i zębów, przyspieszając proces tworzenia kryształów fosforanu wapnia oraz proces mineralizacji w kościach [51,69,70]. Fluor jako pierwiastek wykazuje również właściwości przeciwbakteryjne, a dodatek jonów fluoru w pastach do zębów może znacząco przyczynić się do redukcji powstawania próchnicy nazębnej [71,72]. Dlatego poprzez dobór odpowiedniej metody syntezy oraz jej warunków, temperatury obróbki termicznej jak i zawartość jonów biologicznie czynnych w syntetycznym fluorapatycie wapnia możliwe staje się otrzymanie wysoce biogodnej i bioaktywnej ceramiki o odpowiedniej porowatości i gęstości. Dlatego też stosowanie odpowiednio zaprojektowanych fluorapatytów stwarza okazję zastosowania bardziej wytrzymałych ceramik o lepszych właściwościach biologicznych, większej biogodności oraz dodatkowych właściwościach antybakteryjnych, które z powodzeniem mogłyby zostać wykorzystywane w medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.

2.4 Ogólna charakterystyka jonów lantanowców

Lantanowce to grupa, która składa się z pierwiastków należących do bloku *f* szóstego okresu w układzie okresowym pierwiastków chemicznych. Należą one do grupy metali przejściowych, co więcej posiadają szczególne właściwości, które odróżniają je od pozostałych

pierwiastków w układzie okresowym. Grupa ta składa się z 15 pierwiastków o liczbach atomowych od 57 do 71 odpowiednio od lantanu (Ln) do lutetu (Lu). Warto dodać, że lantanowce wraz z dwoma podobnymi chemicznie pierwiastkami skandem (Sc) oraz z itrem (Y) tworzą grupę pierwiastków ziem rzadkich lub metali ziem rzadkich. Spośród nich wyróżniamy lekkie metale ziem rzadkich o najmniejszej liczbie atomowej, reprezentowane przez lantan (La), cer (Ce), prazeodym (Pr), neodym (Nd), promet (Pm), samar (Sm), europ (Eu) oraz gadolin (Gd). Natomiast, terb (Tb), dysproz (Dy), holm (Ho), erb (Er), tul (Tm), iterb (Yb) i lutet (Lu) przez to, że mają wyższą masę atomową w stosunku do lekkich metali ziem rzadkich, znane są jako ciężkie metale ziem rzadkich [73]. Niektóre dane donoszą o występowaniu grupy pośredniej metali ziem rzadkich do której należą samar, europ oraz gadolin [74]. Lantanowce charakteryzują się niezwykle podobną strukturą elektronową co ma swoje odzwierciedlenie w właściwościach zarówno fizycznych jak i chemicznych. Posiadają one strukturę elektronową typu $4f^n 5^{0-1} 6s^2$ i co ważne, wraz ze wzrastającym ładunkiem jądra liczba powłok elektronowych nie zmienia się, zmianie ulega jedynie liczba elektronów na podpowłoce $4f$. Promienie jonowe i atomowe lantanowców maleją wraz ze wzrostem liczby atomowej, zjawisko to nazywamy kontrakcją lantanowców [75,76]. Efekt ten wynika ze słabego ekranowania jądra atomowego przez elektrony znajdujące się na podpowłoce $4f$ przy jednoczesnym przyciąganiu elektronów na powłoce $6s$ w kierunku jądra atomowego. Wzrost liczby elektronów na podpowłoce $4f$ powoduje, że jądro coraz słabiej oddziałuje na elektrony znajdujące się na podpowłokach zewnętrznych, co skutkuje mniejszym promieniem jonowym w szeregu lantanowców wraz ze wzrostem liczby atomowej. Wyjątek mogą stanowić promienie atomowe europu o liczbie atomowej 63 oraz iterbu o liczbie atomowej 70, gdzie ich wartość bardzo wzrastają, natomiast jony tych pierwiastków występują zarówno na +3 jaki i +2 stopniu utlenienia [77]. Większość lantanowców to reaktywne, błyszczące, srebrzyste metale, których podstawowym stopniem utlenienia jest +3. Niemniej jednak, nie jest to jedyny stopień utlenienia, na którym występują lantanowce. Neodym, prazeodym, samar, europ, dysproz, tul oraz iterb występują na +2 stopniu utlenienia. Natomiast, cer, prazeodym, neodym terb oraz dysproz mogą zostać utlenione z +3 stopnia do +4 [78].

Luminescencja lantanowców jest związana z trzema mechanizmami przejść elektronowych. Pierwszy rodzaj przejścia związany jest z wewnątrz konfiguracyjnymi przejściami elektronowymi w obrębie podpowłoki f ($4f \rightarrow 4f$), kolejny wiąże się z przejściami między podpowłokami $4f \rightarrow 5d$ oraz ostatni rodzaj powiązany jest z przejściami z przeniesieniem ładunku ang. *charge transfer* „CT” (ligand-metal lub metal-ligand) [79]. Przejścia $f-f$ są zabronione regułami wyboru parzystości Laporte’a i w konsekwencji są zabronione przez mechanizm dipola elektrycznego. Niemniej w sytuacji, gdy jon lantanowca znajduje się pod wpływem pola liganda, niecentrosymetryczne interakcje umożliwiają mieszanie się stanów elektronowych o przeciwnej parzystości w funkcje falowe $4f$. W ten sposób reguły wyboru nieco

się rozluźniają, natomiast, samo przejście staje się częściowo dozwolonym i jest to tak zwane indukowane elektrycznie przejście dipolowe. Mimo, że magnetyczne przejścia dipolowe są dozwolone to charakteryzują się jednak słabą intensywnością [79,80]. Dodatkowo, biorąc pod uwagę dość silne ekranowanie podpowłoki $4f$ przez $5d$ i $6s$ są one izolowane i słabo oddziałując z otoczeniem nie biorą udziału w tworzeniu wiązań. Dlatego też czynniki zewnętrzne nieznacznie wpływają na jon lantanowców, a pasma emisji i absorpcji są dość wąskie i wymagają intensywnych źródeł wzbudzenia. Następnym rodzajem są przejścia $4f \rightarrow 5d$, w których to przeniesienie elektronu z podpowłoki f do podpowłoki d jest dozwolone regułą parzystości. Przejścia $f-d$ są szersze od przejść $f-f$, ponieważ zewnętrzne orbitale $5d$ oddziałują bezpośrednio z orbitalami liganda, a ich energia w dużej mierze zależy od otoczenia, w którym znajduje się jon lantanowca. Przejścia $4f-5d$ są powszechnie obserwowane dla takich jonów lantanowców jak Ce^{+3} , Pr^{+3} oraz Tb^{+3} oraz dla dwuwartościowych jonów Eu^{+2} , Sm^{+2} i Yb^{+2} [79]. Przejścia CT (ang. Charge Transfer) również są przejściami dozwolonymi regułą Laporte'a i zachodzą z przeniesieniem elektronu walencyjnego z liganda na orbital metalu lub z procesem odwrotnym, z jonu metalu na ligand. Jeśli orbitale molekularne liganda są zajęte, może nastąpić przeniesienie ładunku z orbitali liganda na puste lub częściowo wypełnione orbitale d metalu. Absorpcja powstająca w wyniku tego procesu nazywa się przeniesienie ładunku z ligandu na metal (LMCT), a samo przejście skutkuje pojawieniem się intensywnych pasm. W odwrotnej sytuacji, gdy metal występuje na niskim stopniu utlenienia, natomiast ligand ma nisko położone puste orbitale to w tym przypadku może nastąpić przeniesienie ładunku z metalu na ligand (MLCT). Przejścia te są powszechne dla związków koordynacyjnych zawierających ligand akceptorowy π . Przejścia charge transfer z metalu na ligand skutkują pojawieniem się szerokich i intensywnych pasm. Przejścia te niemniej wymagają wzbudzenia przez intensywne długości fali zazwyczaj w zakresie światła UV oraz są wysoce zależne od symetrii otoczenia centralnego jonu [79].

Jony lantanowców ze względu na swoje właściwości luminescencyjne oraz wysoką biogodność znalazły swoje zastosowanie w nanomateriałach organicznych jak i nieorganicznych jako czułe biosondy. Ich przewaga nad organicznymi fotobarwnikami polega na tym, że biologiczne barwniki organiczne takie jak na przykład GFP (ang. *Green Fluorescence Protein*), szybko ulegają fotowysielaniu oraz są toksyczne dla żywych komórek. Dlatego nie można ich stosować do barwienia żywych komórek a jedynie w znakowaniu preparatów utrwalonych. Ponadto, powszechnie wykorzystywane barwniki organiczne znane są ze swojego relatywnie szerokiego pasma emisji i absorpcji, co jest dość problematyczne, zwłaszcza przy stosowaniu więcej niż jednego barwnika fluorescencyjnego ze względu na to, że ich pasma mogą się nakładać. Dlatego stosowanie nanomateriałów domieszkowanych jonami lantanowców do biodetekcji może stanowić lepszą alternatywę ze względu na dokładną optymalizację struktury w

procesie syntezy, wysoką fotostabilność, wąskie pasma absorpcji i emisji oraz dłuższe czasy zaniku luminescencji czy ich biokompatybilność.

2.5 Charakterystyka fizykochemiczna i biologiczna związków europu

Europ jest pierwiastkiem chemicznych z szeregu lantanowców o symbolu chemicznym **Eu**. Posiada liczbę atomową 63 co oznacza, że na swojej powłoce walencyjnej posiada dokładnie taką samą liczbę elektronów, a konfigurację elektronową można zapisać w sposób $[\text{Xe}]4f^7 6s^2$. Europ jest niezwykle ciekawym pierwiastkiem ze względu na fakt, że jest to najrzadziej występujący pierwiastek na Ziemi i jednocześnie jest on najbardziej reaktywnym spośród wszystkich lantanowców. Jony europu występują na dwóch różnych stopniach utlenienia +3 oraz +2. Niemniej, jak już wspomniano wcześniej spotyka się też inne lantanowce, które również mogą być dość łatwo zredukowane z +3 do +2 stopnia utlenienia [81,82]. Ma to istotne znaczenie przy pomiarach spektroskopii luminescencyjnej lantanowców, która jest wynikiem między innymi takich zjawisk jak przejścia elektronowe z przeniesieniem ładunku, *ang.* Charge Transfer (CT). Konfiguracja elektronowa dla jonu europu na +2 stopniu utlenienia wygląda następująco $[\text{Xe}]4f^7$, natomiast europu na +3 stopniu utlenienia w sposób $[\text{Xe}]4f^6$.

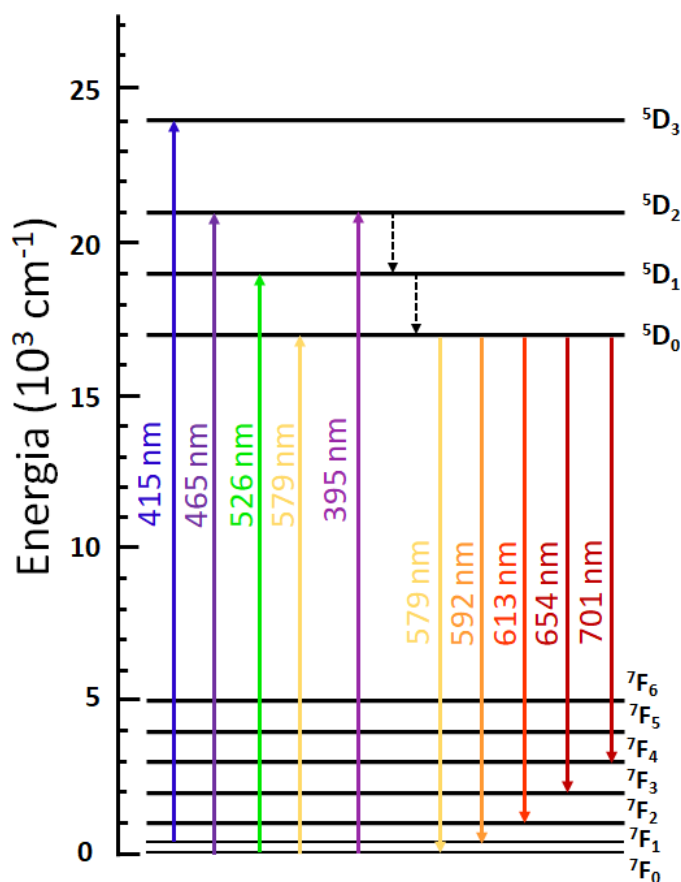
Jony Eu^{2+} wykazują stabilność chemiczną w materiałach w stanie stałym, ponadto charakteryzuje je dozwolona i relatywnie silna emisja promieniowania elektromagnetycznego z całego zakresu światła widzialnego. Jon europu na +2 stopniu utlenienia może być wykorzystany jak sonda temperaturowa ze względu na to, że jon wykazuje mocne sprzężenie z drganiami sieci krystalicznej. Ponadto, na luminescencję jonów Eu^{2+} mają wpływ takie czynniki jak sieć krystaliczna gospodarza, w którą wbudowany jest jon, struktura koordynacyjna oraz symetria i długość wiązania ligand – Eu^{2+} [83]. Dlatego podczas syntezy materiałów zawierających jony Eu^{2+} należy odpowiednio ustalić warunki reakcji i przeprowadzać syntezę w atmosferze redukującej np. CO, N_2/H_2 lub H_2 . Chociaż znane są prace, w których udało się otrzymać materiały domieszkowane jonami $\text{Eu}^{2+}/\text{Eu}^{3+}$ poprzez kompensację ładunku w atmosferze nieredukcyjnej (w powietrzu) oraz w wysokiej temperaturze [83–85].

Jony Eu^{3+} znane są ze swoich właściwości luminescencyjnych szczególnie ze swojej relatywnie silnej emisji w świetle czerwono-pomarańczowym przy wzbudzeniu w zakresie promieniowania ultrafioletowego. Dodatkowo charakteryzują się zabronionymi, wewnątrzkonfiguracyjnymi przejściami typu $f-f$. Podobnie jak jony Eu^{2+} , intensywność poszczególnych przejść elektronowych dla jonów Eu^{3+} jest zależna od sieci krystalicznej, w której znajdują się te jony [81,82,86]. Występowanie parzystej liczby elektronów w powłoce $4f$, w konfiguracji $[\text{Xe}]4f^6$ zakłócenia pola krystalicznego sieci krystalicznej matrycy gospodarza znoszą degenerację

poziomów $^{2S+1}L_J$ [86]. Dodatkowo parzysta liczba elektronów występujących na powłoce $4f$ jonu Eu^{3+} powoduje, że początkowe poziomy przejść elektronowych w widmach luminescencyjnych jak i widmach absorpcyjnych są niezdegenerowane ($J=0$), co jest swoistą cechą wyróżniającą go spośród reszty lantanowców.

Luminescencyjne widma emisyjne jonu europu na +3 stopniu utlenienia charakteryzuje bardzo efektywna emisja w świetle widzialnym, która jest następstwem przejść elektronowych ze wzbudzonego poziomu 5D_0 do poziomów podstawowych 7F_J , gdzie $J=0-6$. Warto również zwrócić uwagę na przejścia z poziomu 5D_0 do 7F_5 i 7F_6 , są to przejścia posiadające charakter indukowanego elektrycznie przejścia dipolowego, a rejestracja tych widm możliwa jest w zakresie pomiarowym odpowiednio od 740–770 nm i 810–840 nm. Widma emisyjne tych przejść są relatywnie słabe, a ponadto ze względu na ograniczenia zakresu długości fali rejestrowanej przez detektory aparatury pomiarowej są one rzadko prezentowane. Emisja z poziomów bardziej wzbudzonych 5D_1 , 5D_2 , 5D_3 do poziomów podstawowych $^7F_{0-6}$ również jest możliwa i rejestrowana, ale również dość rzadko, ponieważ wymaga określonych warunków pomiarowych. Przykładowo przejścia w poziomie wzbudzonego 5D_1 do poziomów $^7F_{0,1,2}$ obserwowana w materiale GaN(Mg) domieszkowanym jonami Eu^{3+} w temperaturze poniżej 200 K [87]. Dodatkowo przejścia z poziomu 5D_1 oraz 5D_2 do poziomów podstawowych zaobserwowano również w materiale KY_3F_{10} domieszkowanym 1 mol% Eu^{3+} w temperaturach 77 K oraz 4.2 K [88]. Przejścia z poziomu 5D_0 do poziomów podstawowych $^7F_{0,1,2,3,4}$ są stosunkowo łatwo rejestrowane dla materiałów nieorganicznych takich jak hydroksy- czy fluorapatyty domieszkowane jonami Eu^{3+} . Pierwszym przejściem obserwowanym podczas rejestracji widma emisji to przejście $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$, które w zakresie pomiarowych obserwowane jest od 570–585 nm. Obserwacja przejścia 0-0 jest możliwa tylko w przypadku, gdy jony Eu^{3+} zajmują miejsca o lokalnej symetrii C_n , C_m , C_s , gdzie $n = 1, 2, 3, 4, 6$. Jest to zgodne z teorią, gdzie przejście zachodzi tylko w symetrii punktowej, która zawierają człony liniowe w hamiltonianie pola krystalicznego [89,90]. Pojawienie się zabronionego przejścia, zgodnie z teorią Judda-Ofelta, jest doskonałym przykładem naruszenia reguł wyborów. Najbardziej możliwym wyjaśnieniem naruszenia tych reguł jest to, że przejście wywołane jest zaburzeniem pola krystalicznego, znanym również jako „*J-mixing*”. Niedozwolone przejście z poziomu $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ może być również spowodowane mieszaniem się nisko położonych stanów z przeniesieniem ładunku [89,90]. Co ciekawe, istnieje pewna korelacja między tymi dwoma mechanizmami, ponieważ mieszanie J jest zwiększane przez silne efekty pola krystalicznego, co wskazuje, że te dwa efekty mogą być współzależne [86,90]. Następne obserwowane przejście w zakresie pomiarowym od 585–600 nm następuje z poziomu $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ [86,91]. Jest ono relatywnie intensywne i silnie zależne od środowiska otaczającego jony Eu^{3+} i odnosi się bezpośrednio do krystalicznego rozszczepienia poziomu 7F_1 . Ma ono charakter magnetycznego przejścia dipolowego, a jego obserwacja niesie ze sobą

informację o występowaniu więcej niż jednego miejsca krystalograficznego jonu Eu^{3+} w strukturze krystalicznej komórki gospodarza [92]. Następne i relatywnie intensywne przejście o charakterze indukowanego magnetycznie przejścia dipolowego można zaobserwować w przedziale od 610–630 nm. Jest to przejście z poziomu ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ i znane jest również jako „hipertensywna przejście” ze względu na to, że jest ono silnie zależne od otoczenia jonów Eu^{3+} . Ostatnie dwa rejestrowane przejścia, oba o charakterze indukowanego magnetycznie przejścia dipolowego występują w zakresie od 640 do 660 nm oraz od 680 do 710 nm następują odpowiednio z poziomu ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_3$ i 7F_4 . Pierwsze z nich należy do przejść zabronionych regułami wyboru, natomiast drugie jest zależne od lokalnego otoczenia jonów Eu^{3+} w komórce gospodarza, ale w mniejszym stopniu niż tzw. „hipertensywna przejście”. Ze względu na, że jony Eu^{3+} wykazują bardzo efektywną emisję w świetle widzialnym predysponuje jony Eu^{3+} do ich wykorzystania jako czułą sondę luminescencyjną.



Rysunek 3. Uproszczony diagram energetyczny jonów Eu^{3+} z zaznaczonymi poziomami absorpcji (strzałki w górę) oraz emisji (strzałki w dół) i przejścia bezpromieniste (strzałki przerywane). Na podstawie [93].

Jak już wspomniano, jony lantanowców metali ziem rzadkich (np. jony Eu^{3+}) mają niezwykle właściwości luminescencyjne i są szeroko stosowane w spektroskopii optycznej. Ze względu na podobne promienie jonowe i właściwości chemiczne, lantanowce oraz pozostałe

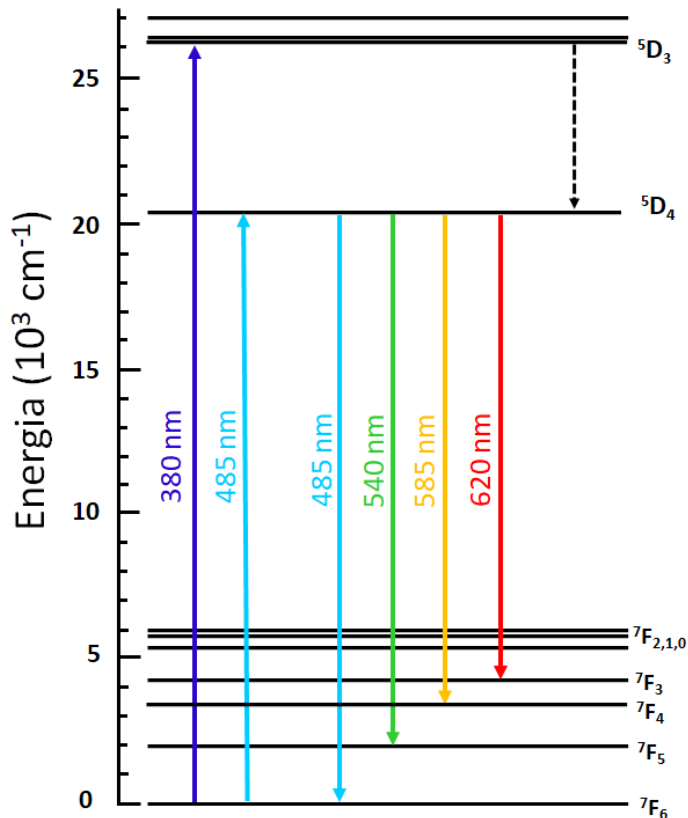
metale ziem rzadkich mogą z łatwością zastąpić wapń (Ca^{2+}) w strukturze krystalicznej związków o strukturze hydroksyapatytu wapnia [94,95]. Zastąpienie jonów Ca^{2+} jonami Eu^{3+} w sieci krystalicznej związków o strukturze apatyty wprowadza możliwość otrzymywania nowych materiałów o lepszych właściwościach fotoluminescencyjnych [96,97]. Ponadto, apatyty domieszkowane jonami Eu^{3+} charakteryzują się doskonałą biogodnością i biodegradowalnością. Mogą więc znaleźć zastosowanie w biomedycynie jako fluorescencyjne materiały do znakowania komórek lub tkanek [98,99].

Europ jest jak dotąd najbardziej reaktywnym pierwiastkiem spośród szeregu lantanowców, jednak wykazuje on biokompatybilne działanie wobec żywych komórek i tkanek [83,98,100]. Dane literaturowe potwierdzają również, że jony Eu^{3+} wykazują pozytywne działanie na procesy metaboliczne zachodzące w obrębie tkanki kostnej, a przez to wpływają na poprawę gęstość kości. Zwłaszcza gdy są inkorporowane w krystaliczną sieć związków wapniowo fosforanowych, takich jak np. hydroksyapatyt, czy fluorapatyty [99,101]. Dzięki uzyskaniu wysokiej struktury krystalicznej materiału macierzystego, jony Eu^{3+} wbudowane w strukturę apatytową wykazują wysoką intensywność luminescencji i mogą być stosowane jako biokompatybilne sondy do obrazowania komórek lub tkanek. Inne ciekawe zastosowanie biomedyczne jonów Eu^{3+} to wykorzystanie ich jako nośnik leków np. poprzez dołączenie ibuprofenu w porowatych nanosferach fosforanu wapnia (ACP). Kompozyt ten wykazał biokompatybilność z komórkami śródbłonna tętnicy biodrowej świni (PIEC), a testy sprawdzające uwalnianiem leku wykazały przedłużone i powolne uwalnianie ibuprofenu w symulowanym płynie ustrojowym *ang.* Simulated Body Fluid – SBF [97,102]. Te właściwości europu domieszkowanego hydroksyapatytem z dołączonym ibuprofenem były również badane przez inny zespół naukowy, gdzie potwierdzono stopniowe uwalnianie leku. Ponadto, ze względu na obecność jonów Eu^{3+} , kompozyt wykazywał silną czerwoną emisję oraz intensywną fotoluminescencji, która wzrastała wraz ze wzrostem ilości uwalnianego leku. Dzięki swoim właściwościom bioaktywnym i luminescencyjnym taki system daje możliwość łatwego monitorowania i śledzenia uwalniania leku, co daje perspektywiczne zastosowanie w dziedzinie dostarczania i stopniowego uwalniania terapeutyków [97]. Dodatkową możliwością wykorzystania jonów Eu^{3+} w biomedycynie jest fakt, że luminofory domieszkowane jonami Eu^{3+} znajdują zastosowanie w medycynie jako detektory promieniowania rentgenowskiego w systemach obrazowania [96,103].

2.6 Charakterystyka fizykochemiczna i biologiczna terbu

Terb jest miękkim, ciągliwym, srebrzystoszarym metalem, którego nazwa pochodzi od szwedzkiej wioski Ytterby, podobnie jak iterb, erb czy itr. Terb oznaczony jest symbolem **Tb**, a jego liczba atomowa wynosi 65, natomiast konfiguracja elektronowa przedstawia się następująco

[Xe] 4f⁹6s². W skorupie ziemskiej występuje w stężeniu 1 ppm co oznacza, że jest 57 najbardziej rozpowszechnionym spośród wszystkich pierwiastków. Podstawowy stopień utlenienia jonów terbu wynosi +3, niemniej może on zostać utleniony do stopnia +4 [104]. Terb może tworzyć związki chemiczne i występować w nich na +1 oraz +2 stopniu utlenienia [105,106], dlatego też może tworzyć różne kompozyty nieorganiczne jak i organiczne o nietypowych właściwościach chemicznych oraz interesujących zastosowaniach. Jednymi z rodzajów związków terbu są halogenki i kompleksy halogenkowe, w których to jon lantanowca tworzy cztery trihalogenki w postaci TbX₃, gdzie X = F, Cl, Br, I. Wszystkie te związki oprócz TbF₃ są silnymi elektrolitami i są dobrze rozpuszczalne w wodzie. Co ciekawe jony terbu w kompleksach fluorkowych może zostać utleniony z +3 do +4 stopnia utlenienia [107]. Ze względu na silną zieloną i niebieską fluorescencję oba te związki mogą być wykorzystane jako luminofory w lampach fluorescencyjnych oraz, w przypadku TbF₃, jako zielony emiter w telewizorach projekcyjnych z lampą katodową [108]. Innym ciekawym materiałem jest terfenol-D, który jest stopem trzech pierwiastków terbu, dysprozu i żelaza o wzorze chemicznym **Tb_xDy_{1-x}Fe₂** (x ≈ 0,3). Materiały te posiadają interesujące właściwości fizykochemiczne związane z magnetostrykcją, to znaczy, że wydłużają się lub skracają pod wpływem działania pola magnetycznego. Ponadto, charakteryzują się też wysoką gęstością energii, niską prędkością dźwięku i niskim modułem Younga [109]. W związku z tym znajdują zastosowanie w czujnikach magnetomechanicznych, siłownikach oraz przetwornikach akustycznych i ultradźwiękowych [110]. W przypadku zastosowania związków terbu typowo w dziedzinie optyki warto wyjaśnić w jaki sposób powstaje -zielono-pomarańczowa emisja jonów Tb³⁺. Jon terbu na +3 stopniu utlenienia wbudowany w strukturę nanoluminoforu może posiadać wiele linii emisyjnych, jednak najbardziej charakterystyczne są rejestrowane przy długości fali 545 nm i 585 nm. Oprócz tego występują też mniej intensywne linie emisyjne zarówno w niebieskim oraz czerwonym zakresie widma [111].



Rysunek 4. Uproszczony diagram energetyczny jonów Tb^{+3} z zaznaczonymi poziomami absorpcji (strzałki w górę) oraz emisji (strzałki w dół) i przejścia bezpromieniste (strzałki przerywane). Na podstawie [112].

Luminescencyjne widma emisyjne jonu terbu na +3 stopniu utlenienia cechuje bardzo charakterystyczna emisja w świetle widzialnym, która jest następstwem przejść elektronowych z poziomów wzbudzonych do poziomów podstawowych 7F_J , gdzie $J=6, 5, 4, 3, 2$ [111,113]. Ponieważ wartości J dla jonów Tb^{3+} spełniają regułę wyboru $2J+1$, poziomy ulegają rozszczepieniu Starkowskiemu, a tym samym rozszczepieniu na podpoziomy pod wpływem pola krystalicznego. Jony terbu, w zależności od matrycy, w której się znajdują, mogą zajmować różne pozycje krystalograficzne, co dodatkowo wpływa na właściwości spektroskopowe jonów Tb^{+3} . Jony na +3 stopniu utlenienia podobnie jak jony europu na +3 stopniu utlenienia wzbudzone są przy długości fali promieniowania elektromagnetycznego z zakresu UV. Jony Tb^{+3} posiadają dwa poziomy wzbudzone między którymi przerwa energetyczna wynosi około 5900 cm^{-1} . Konsekwencją takiego rozmieszczenia poziomów jest to, że energia przekazywana jest między nimi w sposób niepromienisty. Pierwszym poziomem wzbudzonym dla jonów Tb^{+3} jest poziom 5D_4 , drugim położonym nieco wyżej jest poziom 5D_3 , niemniej ze względu na niepromienisty transfer energii poziom 5D_4 , z którego następuje emisja [111]. Przejścia promieniste które odpowiedzialne są za pojawienie się charakterystycznej zielonej emisji, możliwe są ze względu

na to, że przerwa pomiędzy pierwszym poziomem wzbudzonym 5D_4 a pierwszym poziomem podstawowym 7F_0 wynosi w przybliżeniu 15000 cm^{-1} . Poziomy podstawowe, na które zachodzi emisja to kolejno poziomy 7F_6 , 7F_5 , 7F_4 , 7F_3 oraz 7F_2 [111,114,115]. Pierwsze obserwowane przejście następuje z poziomu wzbudzonego 5D_4 do poziomu podstawowego 7F_6 można zarejestrować w rejonie spektralnym między $485 - 500\text{ nm}$. Przejście $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$ jest przejściem o relatywnie wysokiej intensywności oraz optycznie aktywnym w przypadku połączenia z ligandem chiralnym. Dodatkowo jego intensywność w zależna jest od rodzaju ligandów otaczających jon Tb^{+3} . Kolejne rejestrowane przejście dla jonów terbu na +3 stopniu utlenienia jest przejście rejestrowane w zakresie od 540 do 555 nm i następuje z poziomu 5D_4 do poziomu 7F_5 . Jego cechą charakterystyczną jest to, że jest relatywnie najbardziej intensywnie oraz wykazuje najwyższą aktywność optyczną. Ponadto, przejście to jest siłą intensywności tego przejścia może służyć jako swoista sonda emisyjna jonu Tb^{+3} . Przejście rejestrowane w zakresie 580 do 595 nm to kolejne z przejść charakterystycznych dla jonu terbu. Wywołane jest ono emisją z poziomu wzbudzonego 5D_4 do poziomu podstawowego 7F_4 i cechuje je relatywnie umiarkowana intensywność i aktywność optyczna. Przejście to jest dość wrażliwe i zależne jest od matrycy, w której znajduje się jon Tb^{+3} jak również od środowiska. Kolejne przejście jakie może pojawić się na wykresie widma emisyjnego jonów Tb^{+3} , rejestrowane przy długości fali 615 do 625 nm to przejście $^5D_4 \rightarrow ^7F_3$. Przejście do ma relatywnie słabą bądź umiarkowaną intensywność, natomiast charakteryzuje je dość silna aktywność optyczna. Ostatnie rejestrowane na widmie emisyjnym przejście zaobserwować można w obszarze od 645 do 655 nm i następuje ono z poziomu $^5D_4 \rightarrow ^7F_2$. Niemniej wykazuje ono relatywnie bardzo słabą intensywność oraz słabą aktywność optyczną, chociaż jego intensywność nie jest wrażliwa na środowisko liganda [113]. Ze względu na właściwości optyczne terbu oraz podobieństwo jego promienia jonowego do promienia jonowego wapnia, można z łatwością wbudować go w strukturę krystaliczną apatytu, co umożliwia stworzenie czulej i biologicznie aktywnej sondy do zastosowań biomedycznych [116–118].

2.7 Właściwości biologiczne wanadu i jego związków

Wanad jest twardym, srebrzystoszarym pierwiastkiem chemicznym z grupy metali przejściowych o symbolu chemicznym **V**. Jest dwudziestym najbardziej rozpowszechnionym pierwiastkiem na Ziemi, występuje między innymi w takich minerałach jak magnetyt, karnotyt $\text{K}(\text{UO}_2)\text{VO}_4 \cdot 1,5\text{ H}_2\text{O}$, wanadynit $\text{Pb}_5(\text{VO}_4)_3\text{Cl}$, patronit VS_4 . Wanad to pierwiastek, którego jony występują w szerokim zakresie stopnia utlenienia od -3 do $+5$. Niemniej jednak, najbardziej stabilnym stopniem utlenienia dla wanadu jest $+IV$ stopień utlenienia [119,120]. Pierwiastek ten jest powszechnie wykorzystywany w przemyśle jako środki suszące w lakierach i farbách, jako

wywoływacz fotograficzny, a także w czarnych barwnikach, tuszach czy pigmentach do tekstyliów, ceramiki i druku. Ze względu na swój potencjał redukcji elektronów jest również stosowany w wanadowych bateriach przepływowych redoks w elektrochemicznych systemach magazynowania [121–124]. Co ciekawe wanad, który wykorzystywany jest głównie w przemyśle ciężkim może znaleźć również zastosowanie w biomedycynie. Mimo, że jest też rozpatrywany jako potencjalnie toksyczny odgrywa istotną rolę w procesach metabolicznych organizmów żywych. Wykazano, że związki kompleksowe wanadu charakteryzują się aktywnością biologiczną poprzez ich zdolność do dezaktywacji lub aktywacji wybranych enzymów. Dodatkowo struktura grupy wanadanowej $(VO_4)^{3-}$ jest niezwykle podobna chemicznie do struktury grupy fosforanowej $(PO_4)^{3-}$ chociażby biorąc pod uwagę i porównując stałą dysocjacji anionu kwasu ortofosforowego $(H_2PO_3)^-$ która wynosi $pK_a=7,2$, natomiast anionu kwasu ortowanadowego $(H_2VO_3)^-$ wynosi $pK_a=7,8$ [125]. Biorąc pod uwagę podobieństwo wanadu do fosforu oraz to, że oba pierwiastki uczestniczą w reakcjach estryfikacji możliwa jest potencjalne zastąpienie fosforu wanadem w regulacji procesów metabolicznych z udziałem białek enzymatycznych zawierających grupy fosforanowe. Wanad występuje w organizmach zwierząt morskich, takich jak żachwy czy osłonice i z udziałem białek wiążących gromadzi się w wakuolach komórek zwanych wanadocytami. Co ciekawe w przypadku gatunku osłonicy *Phallusia nigra*, związki wanadu odgrywają istotne znaczenie w mechanizmach obronnych zwierzęcia [126]. W organizmach lądowych jony wanadu występuje w dużych ilościach również w owocnikach grzybów *Amanita muscaria* w postaci kompleksu zwanego amawadyną, gdzie sugerowany stopień utlenienia wynosi +4 [127,128]. Związki wanadu w organizmach wyższych wykazują również aktywność osteogenną. U kręgowców pierwiastek ten magazynowany jest przede wszystkim w kościach i przez to, że posiada takie same właściwości jak czynniki wzrostu takie jak EGF (epidermalny czynnik wzrostu), FGF (czynnik wzrostu fibroblastów) czy IGF insulinopodobny czynnik wzrostu, które wpływają na indukującą na procesy formowania oraz naprawy tkanki kostnej [129]. Dodatkowo, związki wanadu wpływają aktywująco na dwa kluczowe szlaki insulinowe regulowane przez PI3K oraz MAPK, które ostatecznie indukują procesy mineralizacji kości i poprawę gęstości tkanki kostnej. Testowany w badaniach kompleks oksowanadu (IV) kwasu 2,3-diketogulonowego wpływa promująco na proces produkcji kolagenu typu I w osteoblastach [119]. Z drugiej strony dowiedziono również, że związki wanadu wpływają hamująco na aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP), która jest niezbędna do uzyskania prawidłowego stopnia mineralizacji kości. W związku z tym, że enzym ten dostarcza odpowiednią ilość grup fosforanowych, które w połączeniu z jonami Ca^{2+} tworzą fazę nieorganiczną tkanki kostnej [129]. Dlatego też stosowanie wanadu jednocześnie jako czynnika pobudzającego produkcję kolagenu typu I w osteoblastach jak i czynnika hamującego działanie alkalicznej fosfatazy powinno być dobrze zaplanowane, aby zrównoważyć te dwa procesy i w

konsekwencji uzyskać optymalne stężenie, które wpływa stymulująco na procesy tworzenia i regeneracji tkanki kostnej.

Oprócz działania osteogennego u ssaków związki wanadu wykazują również działanie neurogenne. Udowodniono eksperymentalnie, że związki wanadu odgrywa istotną rolę w szlaku neuroprotekcijnym i neuroregeneracyjnym. Wanad wykazuje działanie hamujące na aktywność PTP – białkowej fosfatazy tyrozynowej, która odpowiada za hamowanie aktywności NGF (czynnika wzrostu nerwów) odpowiedzialnego za regenerację i wzrost neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym u ssaków. Wykazano, że ortowanadan sodu hamuje aktywność PTP, a tym samym przyczynia się do indukcji procesów wzrostu nerwów w hipokampie u szczurów [130]. Dodatkowo potwierdzono, że ortowanadan sodu hamuje powstawanie uszkodzeń DNA poprzez hamowanie białka p53, a tym samym zatrzymuje proces apoptozy w komórkach [131,132]. W innym badaniu potwierdzono, że wanad odgrywa istotną rolę w metabolizmie gryzoni i warunkuje prawidłowy rozwój fizjologiczny szczurów [133,134] [43,44]. W odniesieniu do tego badania potwierdzono również, że miejscowe leczenie wanadanem prowadzi do wzmocnienia gojenia się ran poprzez zwiększenie organizacji komórkowej w żywych tkankach [135].

2.8 Właściwości biologiczne rubidu i jego związków

Rubid to pierwiastek z grupy metali alkalicznych o symbolu chemicznym **Rb** posiadający liczbę atomową 37. Jest miękkim metalem o barwie srebrzystoszarej, jego nazwa pochodzi od słowa *rubidus*, oznaczający głęboką czerwień, kolor jego widma emisyjnego. Podczas analizy chemicznej, jony Rb^+ barwią płomień palnika na kolor różowo-fioletowy. Podobnie jak inne pierwiastki z grupy 1 układu okresowego, które posiadają tylko jeden elektron na powłoce walencyjnej, rubid posiad tylko jeden stopień utlenienia +1. Rubid występuje powszechnie w skorupie ziemskiej w złożach pollucytu, karnalitu, cynwaldytu, leucytu jak również lepidolitu, który to jest jego komercyjnym źródłem [136]. Pierwiastek ten występuje również w wodze morskiej i jest osiemnastym na liście najczęściej występujących pierwiastków w środowisku wodnym. Ten niepozorny pierwiastek z grupy metali przejściowych, posiada szereg zastosowań przemysłowych, fizykochemicznych i biologicznych.

Ze względu na charakterystyczny różowo-fioletowy płomień podczas analizy barwienia płomienia wykorzystywany jest jako dodatek do wyrobów pirotechnicznych nadając im kolor fioletowy. Ze względu na nadsubtelną strukturę poziomów energetycznych, rubid jest używany jako element rezonansowy w zegarach atomowych do precyzyjnego pomiaru czasu. Komercyjnie wykorzystywany jest jako oscylator rubidowy w nadajnikach elektronicznych, urządzeniach nadawczych, natomiast wzorce rubidowe są często używane w urządzeniach typu GPS jako

podstawowe wzorce częstotliwości, ze względu na to, że stanowi tańszy odpowiednik wzorców cezowych, ale przede wszystkim na jego większą dokładność. Rubid posiada dwa główne izotopy, stabilny ^{85}Rb występujący w skorupie ziemskiej w 72,2% oraz radioaktywny ^{87}Rb występujący w 27,8%, dodatkowo zsyntezowanych zostało jeszcze około trzydziestu różnych izotopów (okres półtrwania około 3 miesiące), jednak ich zastosowanie jest niewielkie. Niemniej ^{87}Rb ze względu na łatwą dostępność taniego światła lasera diodowego jak również umiarkowane temperatury niezbędne do utrzymania znacznej prężności par jest jednym z najczęściej używanych rodzajów atomów w procesie chłodzenia laserowego oraz w procesie kondensacji Bosego-Einsteina [137,138]. Inne zastosowania izotopów rubidowych obejmują datowanie geochronologiczne. Rubid 87 jest radioizotopem, którego okres półtrwania wynosi ok $4,97 \cdot 10^{10}$ lat, po tym czasie emituje cząstki β^- i antyneutrino elektronowe oraz przekształca się w ^{87}Sr . Poprzez pomiar stężenia ^{87}Sr oraz pomiar stosunku Rb/Sr można obliczyć wiek krystalizacji skały oraz zastosować pomiar do datowania próbek geologicznych [139]. W przypadku zastosowań medycznych ^{82}Rb , o okresie półtrwania 76 sekund jako podobny w działaniu oraz jako analog radioaktywnego potasu, jest wykorzystywany w pozytronowej tomografii emisyjnej do obrazowania pracy mięśnia sercowego. W guzach mózgu występowanie zmian morfologicznych pojawiających się w barierze krew-mózg skutkuje większym gromadzeniem się ^{82}Rb w większym stopniu niż w zdrowej tkance mózgowej. To pozwala na zastosowanie radioizotopu ^{82}Rb w medycynie nuklearnej do obrazowania zmian nowotworowych w tkance mózgowej [140].

Mimo, że rubid jest jednym z pierwiastków występujących w śladowych ilościach w organizmie ludzkim, to wykazano, że znajduje się on w zębach [141]. Związki rubidu takie jak na przykład RbCl testowane są też pod względem zastosowań biologicznych. Wykazano, że jony rubidu posiadają właściwości neuroprotektoryjne oraz antydepresyjne poprzez modulowanie szlaku tlenu azotu (NO) w hipokampie myszy [142]. Oprócz właściwości neuroprotektoryjnych jony rubidu wykazują działanie stymulujące proces osteogenezy [143]. Ten znajduje się w pierwszej grupie układu okresowego tak jak inne ważne pierwiastki jednowartościowe: potas, sód lub lit. Jony te ze względu na szczególne podobieństwo do jonów potasu wykazują działanie regulujące potencjał czynnościowy w błonach komórkowych wpływając na działanie pompy sodowo-potasowej. Istnienie i funkcja samych kanałów potasowych jest kluczowa dla procesów proliferacji i różnicowania komórek preosteoblastycznych [144,145]. Istnieją dowody na to, że jony Rb^+ mogą pozytywnie wpływać na regulację kanałów potasowych, zwiększając tym samym żywotność osteoblastów, a tym samym mieć pozytywny wpływ na osteogenezę [144–146]. Ponadto wykazano również hamujące działanie jonów rubidu na osteoklastogenezę i dalsze różnicowanie się osteoklastów. Niektóre badania potwierdzają hamujące działanie jonów rubidu na ekspresję genu NF- κB , który jest regulowany przez szlak sygnałowy JNK/p38MAPK [143]. Mechanizm regulacji osteoklastogenezy przez jony rubidu polega na hamowaniu szlaku sygnałowego RANK-

RANKL. RANK jest receptorem-aktywatorem jądrowego czynnika κ B, natomiast RANKL jest białkiem błonowym typu II, które jednocześnie jest aktywatorem dla liganda NF- κ B. RANKL jest ekspresjonowane w wielu tkankach takich jak tarczyca, mięśnie szkieletowe, wątroba, a także w komórkach takich jak limfocyty T oraz osteoblasty i właśnie w tych ostatnich znany jest również jako czynnik różnicowania osteoklastów [147,148]. Jony rubidu wpływają na zahamowanie ścieżki RANK-RANKL, zahamowaniu ekspresji genów NF- κ B oraz NAFT1c, które są silnie zaangażowane w różnicowanie się i dojrzewanie osteoklastów [147,149–151]. Dlatego specyficzna domieszka, taka jak pierwiastek biologicznie aktywny, taki jak jony Rb^+ , może dodatkowo poprawić biokompatybilność związków opartych na apatytach i wzmocnić właściwości osteoindukcyjne w stosunku do komórek kostnych jak i nerwowych.

2.9 Właściwości biologiczne strontu i jego związków

Stront jest metalem ziem alkalicznych, znanych również jako berylowce o symbolu chemicznym **Sr** i jest piętnastym najpowszechniej występującym pierwiastkiem na Ziemi. Występując w postaci dwuwartościowego jonu (Sr^{2+}) z łatwością może zastąpić wapń (Ca^{2+}) w takich minerałach jak węglany, siarczany, skalenoidy, miki, glinach i innych. Najpowszechniej jednak stront znaleźć można w takich minerałach jak celestyn $SrSO_4$ i stroncyjanit $SrCO_3$ z których jest on głównie pozyskiwany [152]. W przemyśle pierwiastek ten wykorzystywany był głównie do produkcji lamp katodowych do kolorowych telewizorów, ze względu na to, że zapobiegał emisji promieniowania rentgenowskiego, niemniej obecnie stosuje się zupełnie inne metody wyświetlania, dlatego zastosowanie strontu drastycznie spada. Co ciekawe, ze względu na przynależność jonów Sr^{2+} do IV grupy analitycznej, barwią płomień na kolor karmazynowoczerwony, dlatego też związki strontu takie jak $SrCO_3$ dodaje się do rac i flar sygnałowych oraz innych wyrobów pirotechnicznych [153]. Oprócz zastosowań przemysłowych stront znany jest też ze swoich właściwości biologicznych. W związku z jego podobieństwem do wapnia oraz tym, że pierwiastki te posiadają podobny promień jonowy może on z powodzeniem zajmować miejsce jonów wapniowych w apatytach oraz fosforanach wapniowych. Dlatego też w organizmie ludzkim stront prawie w 100% występuje w tkance kostnej i wpływa on znacząco na właściwości mechaniczne i wytrzymałość kości. Pierwiastek ten ma kluczowe znaczenie w metabolizmie tkanki kostnej.

Badano wpływ jonów strontu na proliferację i różnicowanie osteoblastycznej linii komórkowej ROS17/2.8, podczas hodowania komórek na porowatych rusztowaniach z fosforanu wapnia domieszkowanego strontem. Całkowite zastąpienie jonów wapnia jonami strontu wykazało pełną biokompatybilność nawet po 6 dniach inkubacji z badanym związkiem [154]. Inne dane podają wpływ pożywek zawierających jony strontu uwalniane z ceramiki hydroksyapatytowej domieszkowanej jonami Sr^{2+} na linię komórkową osteoblastów. Zastąpienie

wapnia strontem w 5% i 10%mol zwiększyły zarówno proces różnicowania, jak i mineralizacji, podczas gdy żywotność komórek monitorowana przez 2, 4 i 6 dni utrzymywała się na poziomie 100 % [155]. Udowodniono również, że ekspresja genów ALP i BMP-4 w linii komórkowej chondrocytów wzrosła po potraktowaniu jonami strontu w stosunkowo niskim stężeniu 1,0 $\mu\text{g/mL}$ i stopniowo wzrastała do 100 $\mu\text{g/mL}$, gdzie ekspresja genów osiągnęła najwyższy poziom. Co wskazuje na silne biokompatybilne właściwości strontu w stosunku do tkanki kostnej [156]. Potwierdzono również znaczący efekt strontu na indukcję procesu osteogenezy poprzez aktywację wielu szlaków sygnałowych w tym ścieżce sygnalizacji receptora wapniowego (CaSR), w szlaku sygnałowym kinazy Akt oraz Wnt zarówno w osteoblastach jak i mezenchymalnych komórkach macierzystych [157,158]. Pierwiastek ten wpływa również na regulację szlaku komórkowego OPG – RANK – RANKL i przyczynia się do zahamowania osteoklastogenezy oraz zahamowanie różnicowania i proliferacji osteoklastów. W związku z hamującymi właściwościami strontu na proces osteoklastogenezy jest on rozpatrywany jako potencjalny i skuteczny czynnik w leczeniu osteoporozy [159,160]. Oprócz samego wpływu na metabolizm tkanki kostnej oraz przyspieszenia procesu regeneracji może również wpływać na regenerację innych towarzyszących tkanek takich jak naczynia krwionośne. Dowiedziono, że stront indukuje ekspresję genów czynników angiogenicznych takich jak angiopoetyna 1 (Ap-1) czy śródbłonkowo naczyniowy czynnik wzrostu (VEGF, z ang. vascular endothelial growth factor)) co istotnie wpływa na promocje neowaskularyzacji [161,162].

Zarówno podstawienia jonów wapnia przez jony strontu w ceramikach fosforanowych dobrze sprawdza się jako kompozyty indukujące proliferację komórek kostnych, jednak znane są też inne związki strontu które pozytywnie wpływają na metabolizm kości. Jednym z nich jest dobrze znany lek na rynku, ranelinian strontu może zapobiegać złamaniom kości. W porównaniu z innymi lekami przeciw osteoporozie, indukuje zarówno działanie antyresorpcyjne, jak i kościotwórcze. Ranelinian strontu wspomaga dysocjacyjne działanie na resorpcję i tworzenie kości oraz przywraca równowagę metabolizmu kości na rzecz tworzenia kości, takie właściwości mogą pozytywnie wpływać na regenerację kości. Niektóre badania przedkliniczne wykazały pozytywny wpływ ranelinianu strontu zarówno na osteointegrację, jak i gojenie złamań [163]. Dowody z opisów przypadków powikłanych złamań kości długich sugerują, że również w takich przypadkach ranelinian strontu przyspiesza proces regeneracji się złamań [164]. Dlatego korzystny wpływ ranelinianu strontu na regenerację i tworzenie tkanki kostnej może stanowić interesującą ścieżkę w strategii gojenia złamań kostnych. Niemniej udowadnia to jak znaczącą rolę w procesach metabolicznych tkanki kostnej odgrywa stront i jak ważnym i niezbędnym jest on elementem, który wpływa na utrzymanie homeostazy układu szkieletowego. Dlatego tak ważne jest dobór odpowiednich, aktywnych biologicznie domieszek w projektowaniu nanokompozytów, które mogłyby zostać z powodzeniem wykorzystane w medycynie

regeneracyjnej i inżynierii tkankowej. Posłużyłyby one do konstruowania biozgodnych materiałów, które stanowiłyby zarówno rusztowanie w ubytkach kostnych, jak i mobilizowałyby tkankę kostną do szybszej regeneracji w przypadku ciężkich złamań czy osteoporozy.

2.10 Wybrane metody syntezy nanomateriałów

Jedną z bardziej popularnych strategii otrzymania materiałów na bazie hydroksyapatytu jest elementarne podstawianie jonów wapnia metalicznego w celu uzyskania pożądaných właściwości projektowanych związków. Miejsce jonów wapnia (Ca^{2+}) w strukturze hydroksyapatytu, bądź fluoroapatytu mogą zajmować różne jony specyficzne i bioaktywne, które mają podobny stopień utlenienia i promień atomowy, jak niektóre jony metali ziem rzadkich, a także pierwiastki alkaliczne [52,53]. Na przykład można zwiększyć właściwości luminescencyjne, rozszerzając tym samym zastosowania takich układów jako markerów do bioobrazowania [54,165]. Istnieje wiele metod syntezy syntetycznych apatytów, takich jak metoda zol-żel, solwotermalna, strąceniowa i hydrotermalna [166,167].

2.10.1 Metoda hydrotermalna

Metoda hydrotermalna ma wiele zalet, przede wszystkim zapewnia w łatwy sposób kontrolowanie stechiometrii reakcji oraz wysoką czystość otrzymanych związków przewyższającym czystość materiałów wyjściowych [168]. Metoda ta polega na krystalizacji substancji z roztworów wodnych w podwyższonej temperaturze oraz pod zwiększonym ciśnieniem. Ten rodzaj syntezy chemicznej umożliwia otrzymywanie substancji z niemalże wszystkich klas związków chemicznych, a zsyntezowane krystality mogą posiadać zarówno formę mono- jak i polikrystaliczną. Stosowanie metody hydrotermalnej umożliwia także otrzymanie czystych fazowo związków na fosforanów wapnia – Ca_3PO_4 , jak i hydroksyapatytów $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ czy fluoroapatytów – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F})_2$ [69].

2.10.2 Metoda współstrąceniowa

Metoda współstrąceniowa jest bardzo prostą jak również bardzo powszechną metodą syntezy różnego rodzaju nanometrycznych materiałów. Polega ona na strącaniu lub współstrącaniu produktu reakcji z substratów znajdujących się w mieszaninie reakcyjnej po dodaniu czynnika strącającego. Podczas reakcji współstrąceniowej wykorzystuje się współczynnik

rozpuszczalności różnych soli w roztworze wodnym [169]. Substraty używane w reakcji to sole dobrze rozpuszczalne w wodzie natomiast po dodaniu wszystkich substratów do mieszaniny reakcyjnej następuje powstanie jednej lub więcej soli nierozpuszczalnych w wodzie [170,171]. Synteza współstrąceniowa jest szybka, prosta i ekonomiczna oraz zapewnia otrzymanie wysokiej czystości nanomateriałów bez konieczności syntezy w bardzo wysokiej temperaturze czy pod wysokim ciśnieniem.

2.11 Opis wykorzystywanych metod do oceny właściwości fizykochemicznych

2.11.1 Proszkowa dyfrakcja rentgenowska

Proszkowa dyfrakcja rentgenowska to technika analityczna, którą można wykorzystać do uzyskania danych jakościowych z próbki ciała stałego, w tym samej charakterystyki struktury. Technika ta pozwala uzyskać danych ilościowych, takich jak stężenia fazy krystalicznej oraz jej struktury krystalicznej. Kiedy promieniowanie o długości fali podobnej do odległości między atomami dociera do ciała stałego, rozprasza się, wytwarzając wiele promieni, które nadal przemieszczają się przez tę strukturę. Promienie te mogą interferować ze sobą w sposób destrukcyjny lub konstruktywny – zjawisko znane jako dyfrakcja. Dyfrakcja jest najbardziej widoczna w strukturach o wysokim stopniu uporządkowania, co wyjaśnia, dlaczego omawiana metoda jest bardzo odpowiednia do analizy struktur krystalicznych. Aby wystąpiła konstruktywna interferencja, rozproszone promienie muszą znajdować się w tej samej fazie, co można wyrazić prawem Bragga (1).

$$2 d \sin \theta = n\lambda \quad (1)$$

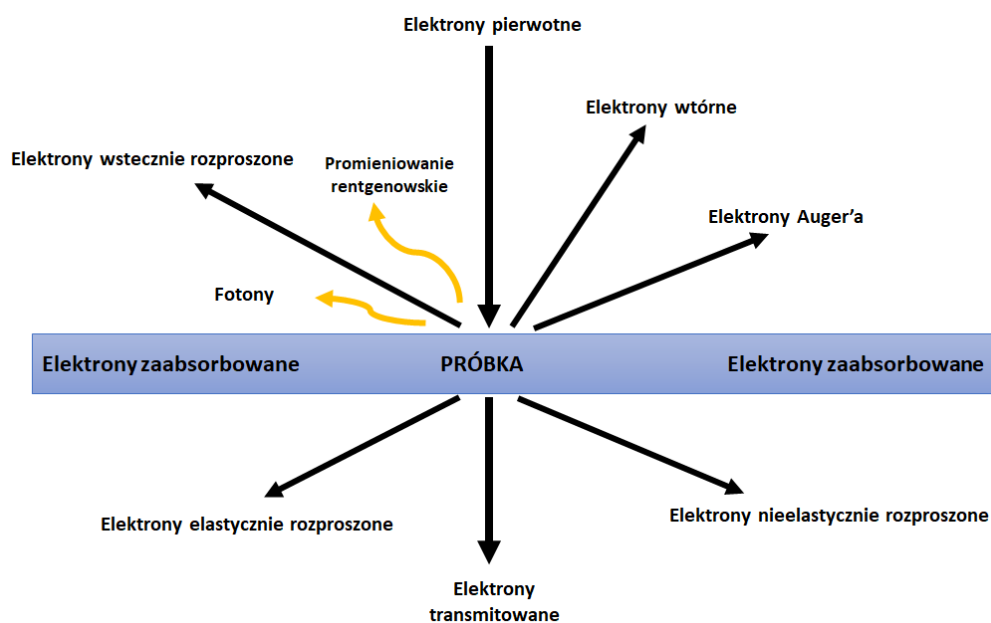
Prawo to pokazuje zależność między kątem padania pod jakim promieniowanie jest skierowane na powierzchnię - θ (theta), odległością między płaszczyznami sieci d , a długością fali promieniowania λ .

W dyfrakcji proszkowej badana próbka jest nasświetlana promieniami rentgenowskimi wytwarzanymi za pomocą lampy rentgenowskiej. Określona długość fali jest wybierana za pomocą monochromatora i prowadzona do próbki za pomocą soczewek kolimacyjnych. Gdy ugięte promienie przejdą przez próbkę, są odbijane z powrotem przez powierzchnię i kierowane do detektora przez inną kombinację soczewki kolimacyjnej i monochromatora. Na detektorze mierzone jest natężenie promieni odbitych. Ponieważ długość fali można łatwo wybrać, umożliwia to pomiar intensywności dla określonej wartości d poprzez proste dostosowanie kąta padania θ . Przedstawiając intensywność jako funkcję θ , można otrzymać wykres zwany

dyfraktogramem. Aby upewnić się, że reprezentowane są wszystkie możliwe płaszczyzny sieci, początkowa próbka jest intensywnie mielona do bardzo drobnego stanu [172].

2.11.2 Skaningowa mikroskopia elektronowa

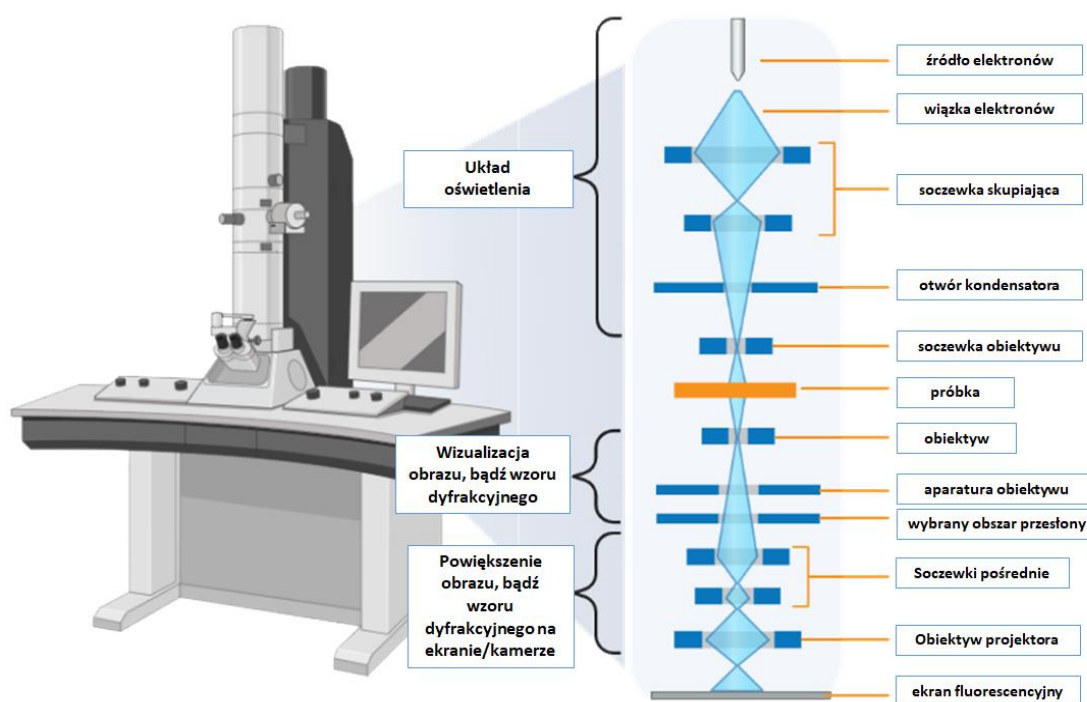
Mikroskopia elektronowa dostarcza informacji strukturalnych o materiałach, takich jak ciała stałe, kryształy i urządzenia elektroniczne w skali nanometrowej. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) to metoda obrazowania i analizy próbek w celu uzyskania informacji o powierzchni badanych materiałów. Metoda ta polega na generowaniu i ocenie elektronów wtórnych (oraz mniejszej ilości elektronów wstecznie rozproszonych) z wykorzystaniem precyzyjnie zogniskowanej wiązki elektronów w celu uzyskania obrazu o wysokiej rozdzielczości i dużej głębi ostrości. Elektrony pierwotne są generowane ze źródła przy użyciu potencjału elektrycznego i wysokiego napięcia przyłożonego do włókna wzdłuż kolumny próżniowej (włókno może być emitorem termionowym lub źródłem emisji polowej). W ten sposób powstaje precyzyjnie zogniskowana wiązka elektronów, którą można systematycznie skanować powierzchnię próbki. Optyka soczewki elektromagnetycznej służy do kształtowania i skupiania wiązki elektronów. Elektrony brzegowe powodują różne interakcje na powierzchni próbki, takie jak generowanie cząstek i fotonów (Rysunek 5). Emitowane (lub transmitowane przez wystarczająco cienką powierzchnię) cząsteczki mogą być zbierane i wykorzystywane do tworzenia obrazu, wzoru dyfrakcyjnego lub widma chemicznego. Najważniejszymi sygnałami używanymi w SEM są elektrony wstecznie rozproszone i elektrony wtórne. Utworzone obrazy są wynikiem zmian natężenia sygnału wiązki elektronów w każdym punkcie (piksela) w skanowanym obszarze próbki [172].



Rysunek 5. Uproszczony diagram działania mikroskopu elektronowego. Na podstawie [172]

2.11.3 Wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) jest dobrze znana i szeroko stosowana do charakteryzowania materiałów. Dostarcza informacji na temat morfologii, struktury, budowy krystalograficznej, a nawet natury wiązań. Cechą wyróżniającą transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM) jest jej zdolność do tworzenia obrazów układów atomowych w zlokalizowanych obszarach materiałów [173,174]. Wyjątkowa rola TEM polega na tym, że elektrony jako naładowane cząstki, a zatem, w przeciwieństwie do promieni rentgenowskich czy neutronów, mogą być przyspieszane i precyzyjnie skupiane przez pola elektromagnetyczne (Rysunek 6). Rozproszone promienie mogą być zbierane przez soczewkę i ponownie ogniskowane w celu utworzenia rzeczywistego obrazu przestrzeni rzeczywistej na wzór mikroskopu optycznego, gdzie każdy punkt obrazu odpowiada określonemu punktowi obiektu [175].

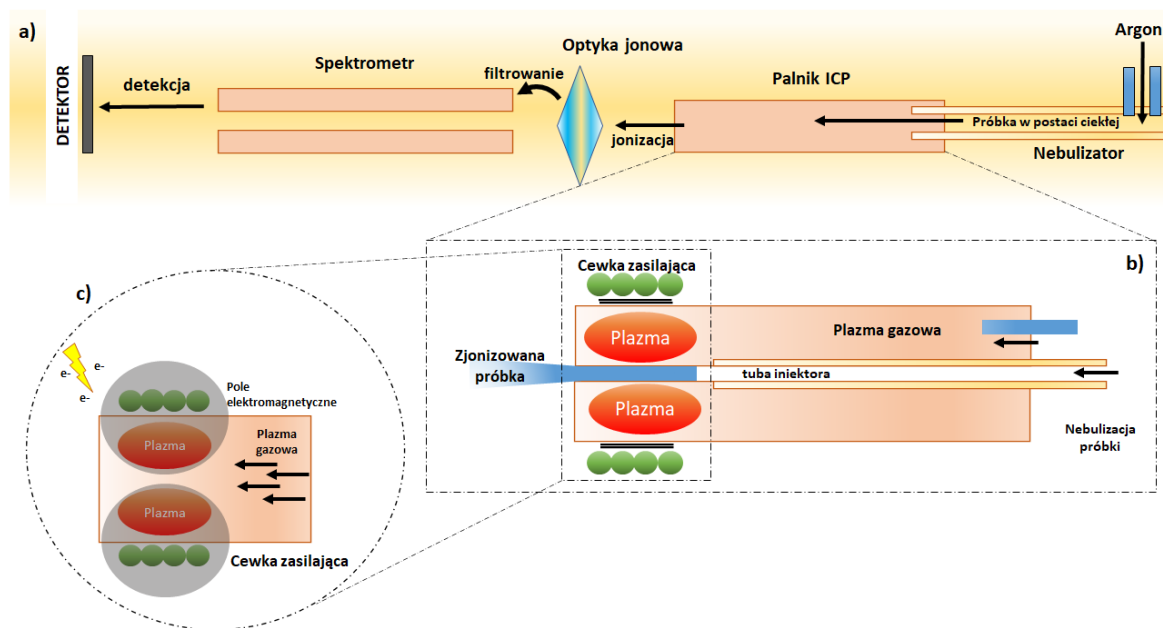


Rysunek 6. Uproszczony diagram transmisyjnego mikroskopu elektronowego.

Na podstawie [175].

2.11.4 Technika atomowej spektroskopii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej

Atomowa spektroskopia emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej, lepiej znana jako ICP-OES (ang. Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry), jest odmianą spektroskopii emisyjnej, w której wykorzystuje się indukcyjnie sprzężoną plazmę do wytwarzania wzbudzonych atomów i jonów, które emitują promieniowanie elektromagnetyczne o długości fali charakterystycznej dla danego pierwiastka. Plazma jest wysokotemperaturowym źródłem zjonizowanego gazu źródłowego, na przykład argonu i jest ona podtrzymywana i utrzymywana przez cewkę indukcyjną połączoną z generatorem częstotliwości megahercowych, generujące drgające pole magnetyczne [176,177]. Palnik ICP-OES jest elementem służącym do przekształcania próbki w formę zjonizowaną. Zazwyczaj badany materiał jest wprowadzany do układu w postaci roztworu, gdzie jest rozpylany w postaci aerozolu za pomocą nebulizatora. Aerozol jest następnie kierowany do palnika plazmowego, gdzie ulega atomizacji. Na Rysunku 7 przedstawiono typowy układ działania spektrometru emisyjnego ICP.



Rysunek 7. Uproszczony schemat działania spektrometru emisyjnego ICP. W oparciu o [176,177].

2.11.5 Spektroskopia w podczerwieni

Spektroskopia w podczerwieni to technika badania składu związków chemicznych. Jest to bardzo popularna metoda ze względu na swoją prostotę. Spektroskopia w podczerwieni jest bardzo szybką metodą uzyskiwania dokładnych wyników jakościowych. Jednak niektóre struktury, zwłaszcza cząsteczki niepolarne do dokładnej analizy wymagają również zastosowania spektroskopii Ramana. Dlatego spektroskopia w podczerwieni jest powszechnie stosowana w

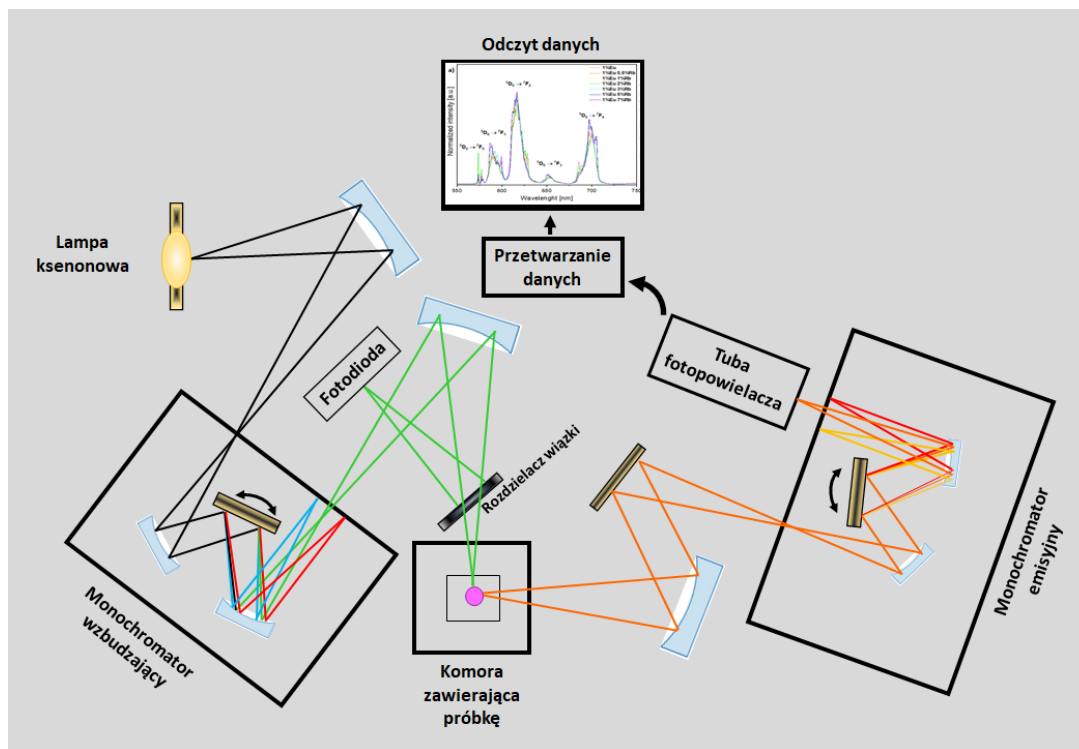
połączeniu ze spektroskopią Ramana, aby uzyskać pełniejszą wiedzę na temat częstotliwości drgań analizowanych cząsteczek [178].

Spektroskopię w podczerwieni można stosować do materiałów w stanie gazowym, ciekłym i stałym. Można analizować różne struktury stałe, w formie mikrokrystalicznej, w formie cienkich filmów lub włókien, dzięki czemu spektroskopia w podczerwieni jest bardzo wszechstronną metodą. Zwykle stosuje się zarówno materiały w postaci roztworów, jak i w postaci stałych. Podstawą spektroskopii w podczerwieni jest zmiana energii oscylacyjnej i rotacyjnej cząsteczki. Zaabsorbowane światło o określonej długości fali w obszarze podczerwieni może powoduje zwiększenie amplitudy drgań cząsteczki. Absorbowane promieniowanie podczerwone wywołuje zmiany energii oscylacyjnej cząsteczek, a biorąc pod uwagę to, że energia ta jest skwantowana, cząsteczki absorbują jedynie energię charakterystyczną dla określonych grup funkcyjnych znajdujących się w badanych materiałach. Pomiar i analiza widm spektroskopowych w podczerwieni umożliwia scharakteryzowanie w prosty sposób grup funkcyjnych jak również identyfikację badanych związków [178].

2.11.6 Spektroskopia fotoluminescencyjna

Spektroskopia fotoluminescencyjna, znana również jako spektroskopia fluorescencyjna, spektrofluorymetria czy fluorymetria to rodzaj spektroskopii elektromagnetycznej, która służy do analizy emisji promieniowania badanego materiału, po wzbudzeniu światłem z zakresu UV-Vis. W spektroskopii fotoluminescencyjnej wykorzystywane są dwa zjawiska luminescencji, pierwszy z nich to fluorescencja, która polega na przejściu ze stanu wzbudzonego S_1 do stanu podstawowego S_0 . Drugim rodzajem zjawiska jest fosforescencja, która polega na procesie przejścia ze stanu tripletowego T_1 do stanu singletowego S_0 . Dlatego też fotony emitowane mają mniejszą energię od fotonów wzbudzających, stąd widmo fluorescencji będzie przesunięte w kierunku dłuższych fal elektromagnetycznych w stosunku do widma absorpcji. Natomiast w przypadku fosforescencji, widmo będzie przesunięte w stronę fal dłuższych, w stosunku do widm absorpcji jak również widm fluorescencji. Spektrofluorymetria jest bezinwazyjna, szybka, bezkontaktowa i może być wykorzystywana do badań optoelektronicznych materiałów o różnych rozmiarach od nano do mikrometrycznych. Metoda może służyć również do pomiarów procesów relaksacji, natomiast łącząc ją z mikroskopią można mapować intensywność fluorescencji w materiale bądź mierzyć czas zaniku fotoluminescencji [179]. Urządzenia, które służą do pomiarów spektrofluorymetrycznych znane są jako spektrofluorymetry bądź fluorymetry.

Schematyczną i uproszczoną budowę takiej aparatury pomiarowej przedstawia rysunek 8.



Rysunek 8. Uproszczony schemat budowy i działania spektrofotometru do pomiarów między innymi widm emisji, widm wzbudzenia emisji czy czasów życia zaniku luminescencji.

W oparciu o [179]

2.12 Opis wykorzystywanych metod do oceny właściwości biologicznych

2.12.1 Test cytotoksyczności

Test MTT jest testem kolorymetrycznym do oceny aktywności metabolicznej komórek. W żywych komórkach enzymy komórkowej oksydoreduktazy zależnej od NAD(P)H są zdolne do redukcji barwnika tetrazoliowego MTT, bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu do jego nierozpuszczalnego formazanu, który ma purpurowy kolor. Dodaje się roztwór solubilizujący, na przykład dodecylsulfian sodu (DMSO) lub izopropanol, aby rozpuścić powstałe kryształy formazanu w barwny roztwór, a przez to zmierzyć liczbowo ilość wyprodukowanego przez komórki formazanu. Pomiar absorbancji tego barwnego roztworu można określić ilościowo, mierząc przy określonej długości fali (zwykle między 500 a 600 nm) za pomocą spektrofotometru. Stopień absorpcji światła zależy od rozpuszczalnika.

Test MTT przeprowadza się po 24, 48, 72 itd. godzinnej inkubacji z testowanymi związkami chemicznymi lub innymi materiałami, które zarówno mogą promować proliferację lub

też działać cytotoksycznie na wybrane linie komórkowe. Po upływie określonego czasu inkubacji, medium hodowlane do którego dodany był testowany czynnik należy usunąć i następnie przepłukać komórki sterylnym roztworem PBS (buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej, pH 7,4). Następnie należy usunąć roztwór PBS i dodać sterylny roztwór MTT (stężenie końcowe 0,5 mg/mL) w roztworze PBS. Komórki z roztworem MTT powinny być inkubowane od 2 do 3 godzin w temperaturze 37°C. Po inkubacji roztwór MTT należy usunąć, bez dodatkowego płukania, a następnie kryształy formazanu rozpuścić w izopropanolu lub DMSO. Absorbancję należy odczytać przy 560 nm z odniesieniem do tła przy 670 nm. W celu uzyskania wiarygodnych danych statystycznych, każde doświadczenie powinno zostać przeprowadzone trzykrotnie.

2.12.2 Ocena żywotności komórek za pomocą techniki mikroskopii fluorescencyjnej

Dodatkowo oceniano również żywotność komórek linii komórkowych za pomocą techniki mikroskopii fluorescencyjnej. Wybrane linie komórkowe wysiano, w zależności o eksperymentu oraz ilości związków, na 6-dołkowe, 12-dołkowe lub 24-dołkowe hodowlanej w gęstości 1×10^5 . Gdy komórki osiągały około 60% do 70% konfluencji dodawano do nich koloidalne roztwory otrzymanych materiałów. Czas inkubacji zazwyczaj ustalano na 24 godzin w standardowych warunkach hodowli komórkowej. Po tym czasie komórki przemywane były sterylnym roztworem PBS (pH=7,4), a następnie żeby zachować żywotność podczas barwienia dodawano do nich świeży roztwór PBS. Zestaw Invitrogen LIVE/DEAD™ Cell Imaging Kit (488/570) (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Waltham) wykorzystano do wizualizacji stosunku żywych i martwych komórek. Morfologię linii komórkowej obserwowano przy użyciu Invitrogen™ FLoid™ Cell Imaging Station (powiększenie x20), stosując długość fali wzbudzenia 482/18 dla zielonych barwników i 586/15 dla czerwonych barwników oraz długość fali emisji 532/59 dla zielonych barwników i 646/68 dla czerwonych barwników.

2.12.3 Test hemolityczny

Jałową i odwłóknioną krew należy mieszać ze sterylnym roztworem PBS (1:1 obj./obj.). Aby uzyskać kontrolę pozytywną (100% hemolizy) do próbki krwi dodaje się 10% SDS (dodecylosiarczan sodu), aby uzyskać stężenie końcowe roztworu SDS 1%. Kontrolę negatywną uzyskuje się dodając do próbki krwi sterylny roztwór PBS (pH 7,4). Do prób badanych dodaje się odpowiednio wybranych związków, aby uzyskać pożądane stężenie końcowe we wcześniej przygotowanych roztworach krwinek czerwonych. Wszystkie próbki są następnie kilkakrotnie pipetowane w celu wymieszania frakcji krwinek czerwonych z roztworem PBS, SDS oraz

roztworów próbek badanych. Po 2 godzinach inkubacji w 37°C wszystkie próbki należy odwirować w celu uzyskania supernatantu (5000 RPM, 5 min) i zmierzyć absorbancję otrzymanego supernatantu za pomocą czytnika płytek przy długości fali 540 nm.

2.12.4 Ocena morfologii krwinek czerwonych za pomocą techniki mikroskopii świetlnej

Aby uzyskać obraz morfologii krwinek czerwonych, próbki krwi przygotowuje się w ten sam sposób jak opisano w podsekcji powyżej. Następnie po 2 godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, następnie należy pobrać małą objętość krwi inkubowanej z testowanymi związkami i dodać do niej roztworu PBS (pH 7,4) w stosunku 1:1. Aby uzyskać odpowiedni rozmaz krwi należy pobrać 5 µl rozcieńczonego roztworu krwinek czerwonych i przenieść je na szkiełko podstawowe i za pomocą szkiełka nakrywkowego wykonać rozmaz. Morfologię erytrocytów obserwuje się za pomocą mikroskopu świetlnego (obiektyw x40 lub x20).

3. Prezentacja wyników badań

W niniejszej części znajduje się prezentacja oraz opis najważniejszych wyników badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej, które zostały zawarte w artykułach opublikowanych w czasopiśmie naukowym. W pierwszym artykule pt. „*A study of vanadate group substitution into nanosized hydroxyapatite doped with Eu^{3+} ion as a potential tissue replacement material*” została przedstawiona charakterystyka związków o strukturze hydroksyapatytu wapnia, w których to grupa fosforanowa została stopniowo zastąpiona grupami wanadowymi. Otrzymane dwie serie związków różniły się zawartością jonów Eu^{3+} podstawionego w strukturze hydroksyapatytowej za jony wapnia. W pracy skupiono się przede wszystkim na określeniu wpływu podstawienia grupy fosforanowej grupą wanadanową na strukturę chemiczną oraz morfologię, jak również na właściwościach luminescencyjnych jonów Eu^{3+} . W drugą pracę z cyklu jest artykuł pt. „*Synthesis and investigation of physicochemical properties and biocompatibility of Tb^{3+} and Sr^{2+} ions co-doped phosphate-vanadate hydroxyapatite*”. Przedstawiono w nim serię materiałów o strukturze hydroksyapatytu wapnia domieszkowanego jonami Tb^{3+} oraz Sr^{2+} oraz matrycą podstawioną grupami wanadanowymi. Nanometryczne związki zostały przeanalizowane pod kątem wpływu domieszek oraz wbudowanych grup wanadanowych na strukturę krystaliczną oraz morfologię. Analizie zostały również poddane właściwości luminescencyjne jonów Tb^{3+} w badanej strukturze. Ostatnią pracą w cyklu rozprawy doktorskiej jest artykuł pt. „*Structural spectroscopic, and biological characterization of novel rubidium(I) and europium(III) co-doped nano-hydroxyapatite materials and their potential use in regenerative medicine*”. Otrzymane tam wyniki prezentują wpływ jonów Rb^+ na strukturę krystaliczną i morfologię związków o strukturze hydroksyapatytu oraz ich wpływ na właściwości luminescencyjne jonów Eu^{3+} . We wszystkich opublikowanych artykułach znajdują się badania biologiczne związane z wpływem syntetycznych związków o strukturze apatytu oraz biologicznie czynnych jonów na proliferację komórek linii NHDF (ludzkie fibroblasty skórne), L929 (fibroblasty mysie) oraz 7F2 (mysie osteoblasty) zdrowych.

3.1 Praca “*A study of vanadate group substitution into nanosized hydroxyapatite doped with Eu³⁺ ion as a potential tissue replacement material*”.

Problemem badawczym podjętym w pracy pt. „*A study of vanadate group substitution into nanosized hydroxyapatite doped with Eu³⁺ ion as a potential tissue replacement material*” było otrzymanie oraz charakterystyka nanometrycznych związków o strukturze hydroksyapatytu wapnia, domieszkowanych jonami Eu³⁺, w których grupa fosforanowa (PO₄³⁻) została stopniowo podstawiana grupą wanadanową (VO₄³⁻). Wanad jako pierwiastek biologicznie czynny, wpływa na dwa istotne szlaki metaboliczne w komórkach, które indukują procesy mineralizacji kości. Ponadto, związki wanadu wpływają neuroprotekcynie oraz indukują regenerację neuronów w organizmie. W związku z tym, wzięto pod uwagę podobieństwo chemiczne i strukturalne grupy wanadanowej do grupy fosforanowej dające możliwość inkorporacji grupy VO₄³⁻ w strukturę apatyty, jako czynnik umożliwiający poprawę biokompatybilność takich materiałów. Głównym założeniem było początkowe podstawienie grupy PO₄³⁻ jedną grupą VO₄³⁻ i stopniowe podstawianie coraz większą ilością grup VO₄³⁻ na rzecz PO₄³⁻, aż do całkowitego zastąpienia grupy fosforanowej grupą wanadanową w strukturze hydroksyapatytu wapnia. W związku z tym charakterystyka materiałów powiązana była z oceną wpływu grup wanadanowych na strukturę krystaliczną hydroksyapatytu. Jednocześnie został poddany analizie wpływ grup wanadanowych na właściwości luminescencyjne jonów Eu³⁺ w strukturze hydroksyapatytowej, które może posłużyć jako sonda w bioobrazowaniu.

Podczas realizacji pracy otrzymano dwie serie związków chemicznych o strukturze hydroksyapatytu wapnia. Pierwsza seria została domieszkowana jonami Eu³⁺ w stężeniu 1 mol%, natomiast druga 2 mol% w przeliczeniu na ilość jonów Ca²⁺ w strukturze hydroksyapatytu wapnia. W obu seriach grupa wanadanowa została podstawiona za grupę fosforanową w ilości od 1 do 6. Charakterystyka właściwości fizykochemicznych otrzymanych materiałów przeprowadzona była przy użyciu metody proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej (XRPD), skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), spektroskopii w podczerwieni wykonanej metodą wielokrotnego osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ATR-FTIR), atomowej spektroskopii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-OES) oraz spektroskopii fotoluminescencyjnej. Do analizy właściwości biologicznych posłużył test cytotoksyczności MTT, test hemolityczny. Natomiast, profil uwalniania jonów do środowiska zewnętrznego przeprowadzono przy użyciu metody z symulowanym płynem ustrojowym (*ang. simulated body fluid – SBF*).

Otrzymano dwie serie nano-rozmiarowych związków o strukturze hydroksyapatytu wapnia domieszkowanych jonami Eu^{3+} , w których grupę fosforanową (PO_4^{3-}) stopniowo podstawiano grupą wanadanową (VO_4^{3-}). Ogólny wzór chemiczny dla pierwszej serii zdefiniowano następująco $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$, a dla drugiej serii $\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$, (gdzie $x = 1, 2, 3, 4, 5, 6$). Krystaliczne materiały otrzymane metodą współstrącenia i poddane obróbce termicznej w temperaturze 600°C krystalizowały w układzie heksagonalnym w grupie przestrzennej $P6_3/m$ zgodną ze wzorcem dla krystalicznego hydroksyapatytu wapnia z bazy danych ICSD o numerze ICSD-262004. W porównaniu do dyfraktogramu wzorcowego stwierdzono obecność charakterystycznych refleksów pochodzących od grup fosforanowych krystalicznego hydroksyapatytu wapnia w badanych próbkach w przedziale od 32 do 34° . Jednak gdy zawartość grup wanadanowych podstawionych za grupy fosforanowe przekroczyła połowę ich wartości, zauważono pojawienie się drugiej fazy, pochodzącej od pirowanadanu wapnia $\text{Ca}_2\text{V}_2\text{O}_7$ (...). Uzyskane oraz przedstawione na dyfraktogramach proszkowych wyniki dla obu serii otrzymanych związków oraz wyniki widm z pomiarów w spektroskopii w podczerwieni FTIR potwierdziły, że stopniowy wzrost ilości grup (VO_4^{3-}) ostatecznie doprowadził do stopniowego spadku intensywności sygnału z grup (PO_4^{3-}) w matrycy hydroksyapatytu i wzrost intensywności sygnału z grup (VO_4^{3-}) pochodzącego od pirowanadanu wapnia. Niemniej obrazy TEM uzyskane dla trzech reprezentatywnych próbek potwierdziły nanometryczne rozmiary ziaren. Natomiast obrazy SAED, tj. obrazy dyfrakcyjne z wybranego obszaru próbki (ang. *selected area electron diffraction*) zarejestrowały charakterystyczną geometrię dyfrakcyjną, która świadczy o strukturze krystalicznej materiałów. Dodatkowo wyniki uzyskane z analizy ICP-OES oraz mapowania otrzymanych związków przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego potwierdziły obecność wszystkich pierwiastków, które w założeniu teoretycznym powinny znajdować się w zaprojektowanych materiałach o strukturze hydroksyapatytu.

Ponadto, badania wykazały w jaki sposób liczba grup wanadanowych w matrycy hydroksyapatytowej domieszkowanej Eu^{3+} wpływa na widma emisji, widma wzbudzenia emisji i kinetykę zaniku luminescencji. Badania emisji otrzymanych materiałów wykazały charakterystyczne widma emisyjne jonów Eu^{3+} we wszystkich materiałach oraz potwierdziły obecność charakterystycznych przejść elektronowych dla jonów Eu^{3+} z poziomu wzbudzonego 5D_0 do $^7F_0, ^7F_1, ^7F_2, ^7F_3, ^7F_4$ po wzbudzeniu długością fali 396 nm . Widma wzbudzenia badanych układów wykazały typowe przejścia elektronowe z poziomu podstawowego 7F_0 do poziomów wzbudzonych jonu Eu^{3+} . Zaobserwowano również pojawienie się charakterystycznych przejść z przeniesieniem ładunku (ang. *Charge Transfer*) $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$ oraz $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{V}^{5+}$. Wyraźne było również, to że wraz ze wzrostem ilości grup wanadanowych stopniowo wzrasta intensywność pasma przeniesienia ładunku $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{V}^{5+}$ w badanych materiałach. Niemniej wyniki uzyskane

podczas pomiarów kinetyki zaniku luminescencji jonów Eu^{3+} potwierdziły wpływ na wygaszanie emisji Eu^{3+} wraz ze wzrastającą liczbą grup (VO_4^{3-}) w otrzymanych materiałach.

Ocena biogodności otrzymanych nanomateriałów z żywymi komórkami potwierdziła hemokompatybilność wobec erytrocytów owiec po 24 godzinnej inkubacji z badanymi materiałami. Co ciekawe, nawet w najwyższym badanym stężeniu wykazywały biokompatybilność z krwinkami czerwonymi. Test hemolityczny został potwierdzony zdjęciami rozmazów krwinek czerwonych zarejestrowanych przy użyciu mikroskopu konfokalnego, które prezentują prawidłową morfologię komórek. Podczas dalszej analizy właściwości biologicznych wykonano test cytotoxyczności MTT. Wyniki testu wykazały biokompatybilność nawet po inkubacji komórek z materiałami zawierającymi największą ilość grup wanadynowych w matrycy o strukturze hydroksyapatytu. Eksperyment z zależnym od czasu uwalnianiem jonów wykazał powolne i stopniowe uwalnianie jonów Ca^{2+} , Eu^{3+} , V^{5+} oraz P^{5+} do roztworu SBF i dodatkowo potwierdził możliwości zastosowania otrzymanych układów jako potencjalnych wypełniaczy tkankowych w medycynie regeneracyjnej.

W materiałach dodatkowych „Supplementary material – *A study of vanadate group substitution into nanosized hydroxyapatite doped with Eu^{3+} ion as a potential tissue replacement material*” zawarto wyniki obliczeń uzyskanych przy zastosowaniu metody Rietvelde, która opiera się na metodzie najmniejszych kwadratów, celem dostosowania profilu teoretycznego badanej próbki do uzyskanego dyfraktogramu proszkowego. Otrzymane wyniki dla badanych materiałów z obu serii związków dobrze się korelują z analizą proszkowej dyfraktometrii rentgenowskiej z wynikami pomiarów spektroskopii w podczerwieni.



Article

A Study of Vanadate Group Substitution into Nanosized Hydroxyapatite Doped with Eu^{3+} Ions as a Potential Tissue Replacement Material

Nicole Nowak * and Rafal Jakub Wiglusz *

Institute of Low Temperature and Structure Research, Polish Academy of Sciences, Okolna 2, 50-422 Wroclaw, Poland

* Correspondence: n.nowak@intibs.pl (N.N.); r.wiglusz@intibs.pl (R.J.W.); Tel.: +48-071-3954-159 (N.N. & R.J.W.)

Abstract: In this study, nanosized vanadate-substituted hydroxyapatites doped with 1 mol% and 2 mol% Eu^{3+} ions were obtained via the precipitation method. To evaluate the structure and morphology of the obtained compounds, the XRPD (X-ray powder diffraction) technique, Rietveld refinement, SEM-EDS (scanning electron microscopy-energy-dispersive spectrometry) and TEM (transmission electron microscopy) techniques as well as FTIR (Fourier transform infrared) spectroscopy were performed. Moreover, the chemical formula was confirmed using the ICP-OES (Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy). The calculated average grain size for powders was in the range of 25 to 90 nm. The luminescence properties of vanadium-substituted hydroxyapatite were evaluated by recording emission spectra and excitation spectra as well as luminescence kinetics. The crucial step of this research was the evaluation of the biocompatibility of the synthesized nanomaterials. Therefore, the obtained compounds were tested toward sheep red blood cells and normal human dermal fibroblast to confirm the nontoxicity and biocompatibility of new nanosized Eu^{3+} ion-doped vanadate-hydroxyapatite. Moreover, the final step of the research allowed us to determine the time dependent ion release to the simulated body fluid environment. The study confirmed cytocompatibility of vanadium hydroxyapatite doped with Eu^{3+} ions.

Keywords: nanosized hydroxyapatite; Eu^{3+} ion-doping; VO_4^{3-} group substitution; photoluminescence; cytotoxicity; in vitro cell-culture study; tissue replacement material



Citation: Nowak, N.; Wiglusz, R.J. A Study of Vanadate Group Substitution into Nanosized Hydroxyapatite Doped with Eu^{3+} Ions as a Potential Tissue Replacement Material. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 77. <https://doi.org/10.3390/nano12010077>

Academic Editor: Ilaria Armentano

Received: 1 October 2021

Accepted: 23 December 2021

Published: 28 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The skeletal system of vertebrates is a very complex structure, not only due to the number and the variety of size or shape of the bones themselves, but also due to the complexity of tissues that are in the constant and inseparable neighborhood of bone [1,2].

The functional unit of bone is formed by concentric circles that surround a Haversian canal; the whole structure is called the osteon or Haversian system. This system creates space for nerves and blood vessels, thus enabling neurotransmission and nutrient delivery as well as the removal of metabolic products [2]. An equally important and inseparable part of bone structure is cartilage tissue, which adheres to bone structure and forms the articular surface. Bones also provide an attachment point for tendons, ligaments, and skeletal muscles and via the cooperation of all of these components, we can move our bodies around in a three-dimensional space [3].

Bone injuries, especially in the case of serious breakage such as open fractures are a problem not only in the regeneration of the bone tissue itself, but also in the tissues adjacent to the damaged bone such as cartilage, muscle, or nervous tissue as well as skin tissue [4–6]. In optimal conditions, repair processes can lead to the complete renewal of bone and soft tissue structure, however, the repair capacity of the nervous tissue is quite limited [7]. It is associated with a long recovery process and often does not bring the desired effects,

especially if the damaged structures such as the skull and spine, protect the most important parts of the human body—the brain and spinal cord [8,9].

Therefore it is so important to choose the right strategy and treatment methods that will simultaneously stimulate the pool of stem cells within the body for faster regeneration of both the bones and the accompanying nerves [1,10,11].

After its success in the field of physical, chemical, and medical sciences, nanotechnology has now started revolutionizing the bio-detection and drug delivery sciences and bio regeneration techniques. The specific advantages include superior pharmacodynamics, pharmacokinetics, reduced toxicity, and targeting capability [12–14]. Biocompatibility and osteoinductive stimulation toward bone cells are well known properties of hydroxyapatite. Highly developed specific surface of synthetic hydroxyapatite generates the possibilities of forming a strong bond with living tissue such as bone and dental tissue [15,16]. Additionally, due to their photostability properties of rare-earth ion luminescence, they can be used as a biocompatible biosensor for cell or tissue imaging [17]. Both natural and synthetic hydroxyapatite is widely used to form three-dimensional scaffolds for bone and tooth filling [18–20]. It has been confirmed by many research studies that in particular, hydroxyapatite-based scaffolds when combined with biodegradable polymer biomaterials such as collagen, polylactide acid, chitosan, or alginate, produced promising effects due to their ability to act with living tissue, high biocompatibility, and induction of cell proliferation and growth of bone tissue [3,11,21–24].

As one of the rarest of the rare-earth elements and the most reactive element so far, europium exhibits relatively non-toxic effects on living cells [25–27]. Moreover, europium(III) ions can improve bone density and metabolism, especially when loaded in calcium-based compounds such as hydroxyapatite [28,29]. By obtaining the high crystal structure of the host material, Eu^{3+} ions loaded in hydroxyapatite show a high intensity of luminescence and can be used as a biocompatible biosensor for imaging cells or tissues. Chen et al. (2011) found another biomedical application for europium(III) ions using them as a drug carrier in ibuprofen-loaded Eu^{3+} ions: amorphous calcium phosphate (ACP) porous nanospheres. This composite showed biocompatibility toward porcine iliac artery endothelial cells (PIECs) and drug release experiments indicated sustained and slow release of the ibuprofen drug in simulated body fluid [30]. These properties of ibuprofen-loaded europium doped with hydroxyapatite were also investigated by Yang et al. (2008), who confirmed suitable drug release but, moreover, because of the presence of Eu^{3+} ions, the composite exhibited strong red luminescence and photoluminescence intensity, which increased with the increasing amount of the released drug. With its bioactive and luminescent properties, such a system presents the opportunity to easily monitor and track drug release, which offers prospective use in the field of drug delivery [31]. Additional confirmation of its use in the biomedical field is the fact that europium doped phosphors can be applied in medical uses as X-ray detectors in imaging systems [32,33].

Vanadium and vanadium compounds are commonly used in industry as a drying agent in paints, as a photographic developer, and is also used in black dyes, inks, or pigments for textiles, ceramics, and printing [34–36]. Due to its electron reduction potential, it is also used in vanadium redox flow batteries in electrochemical storage systems [37]. Surprisingly, vanadium, as a potentially toxic element, plays a quite significant role in living organisms. It is accumulated by tunicates and ascidians with the use of vanadium binding proteins in vacuoles of vanadocytes [38]. In organisms, vanadium is also present in fungal species such as *Amanita* in fungal fruiting bodies [39].

It has been experimentally proven to play a role in the neuroprotective and neuroregenerative pathway by inhibiting PTP—protein tyrosine phosphatase, which is responsible for the impairment of NGF (nerve growth factor) responsible for regeneration and the growth of neurons in the central nervous system of mammals. It has been shown that sodium orthovanadate inhibits PTP activity and therefore contributes to nerve growth in the rat hippocampus [40]. Moreover, in that connection, it was confirmed that sodium orthovanadate abolishes DNA breakage via inhibiting p53 and therefore arrests the pro-

cess of apoptosis [41,42]. Another study confirmed that vanadium plays an essential role in the metabolism of rodents and determines proper physiological development in rats [43,44]. Regarding this study, it was also confirmed that local treatment with vanadate leads to strengthening of healing wounds by increasing cellular organization in the tissue structure [45,46].

The aim of this study was to obtain the europium doped hydroxyapatite materials substituted with vanadate groups (VO_4^{3-}) and evaluate their luminescence and biological properties primarily as a tissue filler in the wound healing process and their eventual use as a bioimaging material. For the first time, hydroxyapatite doped with Eu^{3+} ions and substituted with (VO_4^{3-}) groups were obtained. Structural study, luminescence properties as well as biocompatible features were evaluated, and the results clearly showed that two phased materials such as vanadate hydroxyapatites doped with Eu^{3+} ions are promising biocompounds for medical use as a skin tissue filler material.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis Method

Two series of nanosized hydroxyapatite powders substituted with a vanadate group (VO_4^{3-}) in exchange for a orthophosphate group (PO_4^{3-}) and doped with Eu^{3+} ions with the chemical formula $\text{Ca}_{9.9}\text{Eu}_{0.1}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ (where $x = 1, 2, 3, 4, 5, 6$) were synthesized using the precipitation method. The substrates used in the synthesis were $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (99.0–103.0% Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany), Eu_2O_3 (99.99% Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (>99.0% Acros Organics (Thermo Fisher Scientific) Waltham, MA, USA), and NH_4VO_3 ($\geq 99.0\%$ Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

The example synthesis for 2 g of $\text{Ca}_{9.9}\text{Eu}_{0.1}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$ nanopowder material, 4.5142 g of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ was dissolved in 50 mL of distilled water and then 1.2748 g of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ was dissolved separately in 50 mL of distilled water. To dissolve NH_4VO_3 in distilled water, the substrate (0.2258 g) was mixed together with 75 mL of distilled water and then placed in a Teflon vessel. The dissolving process was carried out in a microwave reactor (ERTEC MV 02-02) for 30 min at a temperature of 150 °C and under autogenous pressure (8–11 bar). The stoichiometric amount of Eu_2O_3 (0.0339 g) was digested in 0.2 mL HNO_3 ($\geq 65.0\%$, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and 3 mL of distilled water to obtain water-soluble europium nitrate ($\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$). The product was recrystallized three times to eliminate HNO_3 residues by adding distilled water three times and evaporating at the temperature of 100 °C. Then, the obtained $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ was dissolved in 25 mL distilled water and mixed with a water solution of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and then both substrates were mixed with a previously amalgamated water solution of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and water solution of NH_4VO_3 . After rapidly amalgamating all substrates together, the pH was adjusted with 1.5 mL of ammonia ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 25% Avantor, Gliwice, Poland) to achieve pH = 9. Synthesis was conducted using magnetic stirring (500 rpm) at a temperature of 150 °C. After the synthesis, the obtained composites were washed out in distilled water to obtain pH = 7 and were further dried for 2 days at 70 °C. Afterward, powders were thermally treated at a temperature of 600 °C for 6 h and the build-up temperature and cooling temperature was set up at 3 °C per minute. The syntheses of the remaining nanomaterials were analogous.

2.2. Physicochemical Characterization

2.2.1. Material Characterization

With the use of the X-ray diffraction (XRD) technique, the vanadium-substituted hydroxyapatite doped with Eu^{3+} ion powders were examined to determine the crystalline structure of the obtained compounds. X-ray diffraction patterns were performed using a PANalytical X'Pert Pro X-ray diffractometer (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK) with Ni-filtered $\text{Cu K}\alpha$ radiation ($U = 40 \text{ kV}$, $I = 30 \text{ mA}$) in the 2θ range of 5–70°. The step time for XRD analysis was estimated with 0.05 and the time per step was estimated as 0.7 second per step. The XRD-recorded patterns were compared with the reference hydroxyapatite pattern

from the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD). The concentrations of Eu, Ca, V, and P in the resulting sample solutions were determined by the inductively coupled plasma-optical emission spectrometer (ICP OES) Agilent 720 (Santa Clara, CA, USA) (with standard setting). The samples were prepared by dissolving 100 mg of nanopowder material in 2 mL of 70% HNO₃ (ASC, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) at the temperature 120 °C and by gradual adding of deionized water to the volume of 50 mL. The concentration of P, Eu, and V ions were measured in the solutions diluted 20 times and the concentration of Ca ions was measured in the solution diluted 500 times. For the measurements, three parallel samples of the solution were prepared and analyzed by the ICP-OES method (Agilent, model 720, Santa Clara, CA, USA), (with standard setting) and compared with standard curves in the concentration range of 0.05 to 5.00 mg/mL for Ca, Eu, and 100 to 200 mg/mL for P ions. To evaluate the presence of phosphate and vanadate groups in the structure of obtained compounds, IR spectra were measured in the range of 4000–400 cm⁻¹ (mid-IR) at 295 K. The measurements of attenuated total reflectance ATR-FTIR were recorded with resolution 4 cm⁻¹ (32 scans) using a Nicolet iS50 infrared spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The analysis of the elemental mapping of the selected sample was determined by using an FEI Nova NanoSEM 230 scanning electron microscope operating at an acceleration voltage in the range 3.0–15.0 kV and spot size of 4.0–4.5. The samples were prepared by evenly spraying a layer of graphite before observation. The morphology and nanostructure of the nanoparticles were investigated via high resolution transmission electron microscopy (HRTEM) using a Philips CM-20 Super Twin microscope operated at 200 kV. The selected material samples were prepared by the dispersion of powders in methanol. Then, a drop of suspension was deposited on a copper microscope grid covered with perforated carbon.

2.2.2. Luminescence Properties

The luminescence kinetics, emissions, and excitation spectra of vanadium-substituted apatite compounds doped with Eu³⁺ ions were determined with an FLS980 fluorescence spectrometer (Edinburgh Instruments, Kirkton Campus, UK). During the measurements of emission and excitation spectra, a 450W Xenon lamp was used as an excitation source and the radiation from the lamp was filtrated with a 300 mm monochromator equipped with a holographic grating (1800 grooves per mm, a blaze of 250 nm). To record the luminescence kinetics, a microsecond flashlamp (uF2) was used as a source of excitation and a Hamamatsu R928P photomultiplier (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan) was used as a detector. Both excitation and emission spectra were adjusted to the intensity of the excitation source according to the specifications of the device. The excitation spectra and luminescence kinetics were recorded at 618 nm according to the most intense electric dipole transition (from level ⁵D₀ → ⁷F₂ level) and excited at 396 nm [47–49].

2.3. Evaluation of Biocompatibility

2.3.1. Preparation of Nanosized Vanadium-Substituted Hydroxyapatite Suspension

The stocks of nanosized vanadium-substituted hydroxyapatites doped with Eu³⁺ ions were prepared by the suspension of the used compounds in distilled water in the concentration of 1 mg/mL. Then, each stock was bath-sonicated for 1h at RT. Freshly prepared colloids were used in biological experiments.

2.3.2. Cell Culture and Cytotoxicity Assay

Normal human dermal fibroblasts (NHDF, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) cell line was maintained in high glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with L-glutamine (Biowest, Nuaille, France) and supplemented with 200 U/mL penicillin and 200 µg/mL streptomycin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, South America origin, Biowest, Nuaille, France). The cell line was incubated in standard conditions in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37 °C. The cell line was passaged three times before the experiments were performed.

To evaluate their potential nontoxicity, the obtained compounds were tested on normal human dermal fibroblasts (NHDF) cell line (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) via the MTT cell viability assay. MTT, also known as the cytotoxicity assay, is a colorimetric assay used for establishing the percent of metabolically living cells. NHDF cells were seeded at a density of 10,000 cells per well in a 48-well plate and, after 24 h, when confluency was obtained, 60% to 70% cells were treated with selected compounds at two different concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL. After 24 h of treatment with vanadium substitutes, hydroxyapatite composites doped with Eu³⁺ ions, the medium containing the tested compounds was removed and cells were washed out twice with sterile PBS (Biowest, Nuaille, France) to remove detached and dead cells and to accurately rinse nanoparticles. After washing, freshly prepared MTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) reagent at a concentration of 0.5 mg per 1 milliliter was dissolved in sterile PBS and added to the cells that were treated with compounds and to the non-treated cells, which were used as a control group and were set up at cell viability of 100%. Cells were incubated for 3 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. After the incubation process, PBS containing MTT was removed, and formazan crystals produced by metabolically active cells were dissolved by adding DMSO (Chempur, Piekary Śląskie, Poland). Absorbance was read at 560 nm and 670 nm (background reference). The experiment was conducted three times. The viability of the used cell lines was estimated using the following formula:

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \times 100\%$$

2.3.3. Hemolysis Assay

Sterile and defibrinated sheep blood (Pro Animal) was washed out three times in sterile PBS and ultimately suspended in sterile PBS (Biowest, pH 7.4) at a ratio of 1:1. Selected vanadium-substituted hydroxyapatite nanoparticles were tested toward sheep red blood cells at concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL. To establish positive control, sheep erythrocytes were combined with 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) and treated as 100% of hemolysis, negative control was obtained by mixing sheep erythrocytes with sterile PBS. After 2 h of incubation at 37 °C, positive and negative control and red blood cell samples treated with selected hydroxyapatite-based composites were centrifuged (5000 RPM, 5 min) to obtain supernatant and the optical density was measured at 540 nm (Varioscan Lux). The hemolysis percentage was calculated using the formula below:

$$\text{Hemolysis} = \frac{\text{sample absorbance} \text{ negative control absorbance}}{\text{positive control absorbance} \text{ negative control absorbance}} \times 100$$

Red blood cell morphology as well as the integrity of cell membrane were observed via confocal microscopy (Olympus IX83 Fluoview FV 1200, 10× magnification with additional 4× digital magnification). Sheep erythrocytes were prepared as described above and treated with selected compounds; positive and negative controls were also prepared. After 2 h of incubation at 37 °C, red blood cells were centrifuged (5000 RPM, 5 min), the supernatant was gently removed, and cell precipitate was suspended with sterile PBS at a ratio of 1:1. A blood smear was prepared by transferring 5 µL of the sample onto a microscope slide and using a coverslip to obtain the smear.

2.3.4. Time Dependent Ion Release to SBF

Simulated body fluid (SBF) solution with an optimal value of pH and physiological temperature closely mimics blood plasma in the human body. By using SBF, the rate of ion release from the tested biomaterials to the fluid environment can be easily evaluated, especially when further in vitro and in vivo tests are planned [50,51]. To evaluate ion release, the two representatives from the two obtained nanopowder series materials were selected. Ca_{9,9}Eu_{0,1}(PO₄)₅(VO₄)₁(OH)₂ and Ca_{9,8}Eu_{0,2}(PO₄)₅(VO₄)₁(OH)₂ nanopowder materials were used in this experiment because the XRD diffractograms showed a clear hexagonal

structure of hydroxyapatite. These were placed in the Falcon tubes separately and the previously prepared simulated body fluid (pH = 7.40) was gently added to obtain a final concentration of 1 mg/mL. The simulated body fluid was prepared by accurately following the procedure created by Kokubo et al. [50]. The samples were placed in the shaker incubator and the temperature was set to 37 °C with a rotation of 100 rpm. The period when samples were collected was set to 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 360 min, and 1440 min of incubation with simultaneous rotation. Each time, 3 mL of the fluid sample was collected in a new, separated Falcon tube, and 3 mL of fresh SBF was added to the remaining solution to refill the missing volume. Subsequently, when all fluid samples were collected, 0.2 mL of 70% HNO₃ (ASC, Sigma-Aldrich) was added to all representatives and deionized water was added to obtain a final volume of 25 mL. When all samples were prepared, the presence of investigated ions such as Ca, P, Eu and V was identified by the inductively coupled plasma-optical emission spectrometer (ICP OES) Agilent 720 instrument.

3. Results and Discussion

3.1. Analysis of Structure and Morphology

Two series of hydroxyapatite-based nanopowders doped with 1 mol% Eu³⁺ ions and 2 mol% Eu³⁺ ions and substituted with different amounts of vanadate groups were synthesized using the precipitation method. XRD diffractograms clearly showed the hexagonal structure of hydroxyapatite for powder materials that contained 1 mol% Eu³⁺ ions and 2 mol% Eu³⁺ ions and substituted with up to two vanadate groups substituted in the place of phosphate groups (Figure 1a,b). The delicate signals of hydroxyapatite hexagonal structure can be noticed among samples that contain 1 mol% Eu³⁺ and 2 mol% Eu³⁺ and are substituted with three (VO₄³⁻), however, the more vanadium appeared in the sample, the more the calcium pyrovanadate phase was visible. The results for two series of nanosized materials containing up to two vanadate groups, corresponded to the standard ICSD database diffractogram pattern for hydroxyapatite crystals (ICSD-262004). For the above-mentioned powders, signals in the range of 32° to 34° in the experimental patterns corresponded to distinctive phosphate groups of the hydroxyapatite crystal structure (ICSD-262004). Broader bases of the peaks, especially in the range of 32° to 34°, may indicate the nanosized structure of the nanosized materials substituted with (VO₄³⁻) 1–3 and doped with 1 mol% and 2 mol% of Eu³⁺ ions (Figure 1a,b) [52,53]. The gradual increase in the number of vanadate groups in samples of the obtained nanopowder materials eventually led to the gradual decrease in the intensity of the signal from the phosphate groups and the increase in the intensity of the signal from the vanadate groups, which is certainly observed in the XRD diffractograms (Figure 1a,b). Interestingly, the occurrence of another phase was noticeable in the range of 27°–32° for the XRD experimental patterns of both series of nanopowder materials that were substituted with three and more vanadate groups. It appears that a progressive increase in the intensity of the signal from the range 27°–32° came from Ca₂V₂O₇ (calcium pyrovanadate) (Figure 1a,b). Experimental data of the obtained materials substituted with (VO₄³⁻) 3–6 groups were compared with the ICSD XRD pattern of Ca₂V₂O₇ (ICSD-421266). Our results indicate that the precipitation method used in the experiment was sufficient to obtain materials substituted with up to two (VO₄³⁻) groups in place of (PO₄³⁻) groups in the crystal hydroxyapatite structure. The hydrothermal synthesis method seems to be more adequate to incorporate more than three vanadate groups into the hydroxyapatite crystalline framework [54]. Nonetheless, there were also some data that indicate that the ammonia environment is not suitable to obtain vanadate-substituted hydroxyapatite. To obtain an alkaline environment of a chemical reaction during the synthesis of vanadate-substituted hydroxyapatite, NaOH should be substituted for NH₃·H₂O [54,55]. Moreover, other substrates can be used during the synthesis of vanadate-substituted hydroxyapatite. Some data suggest that V₂O₅ could be used as a substitute of NH₄VO₃ and P₂O₅ as a substitute of (NH₄)₂HPO₄ [54–57].

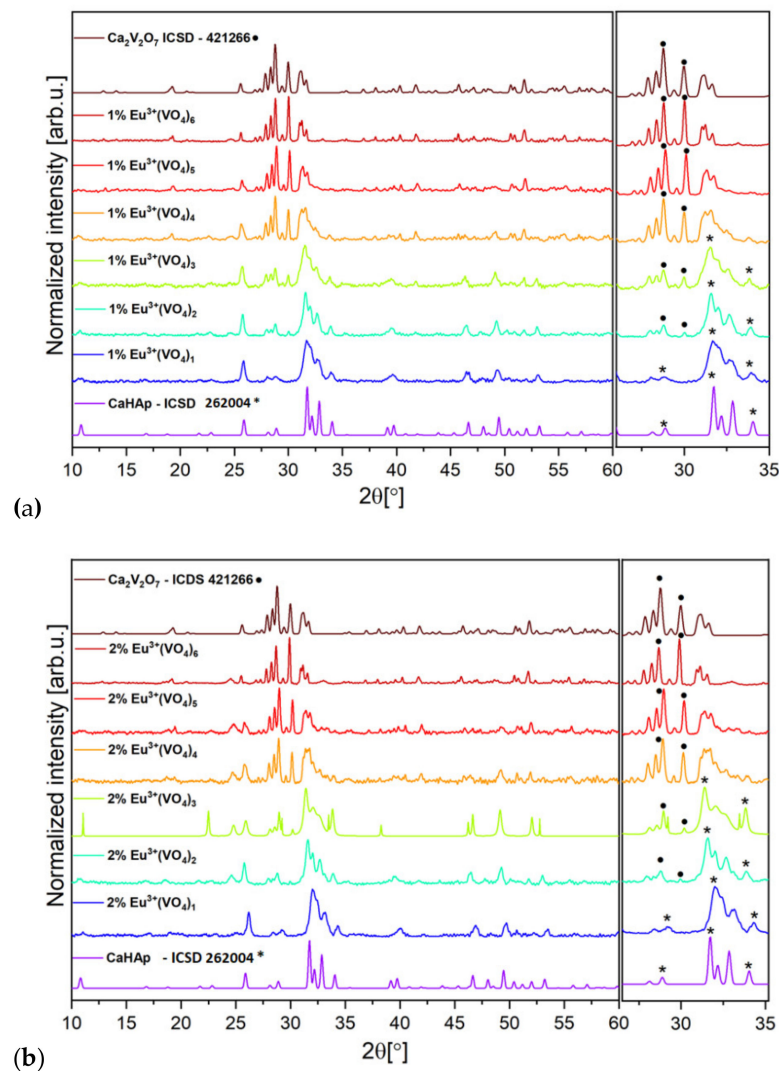


Figure 1. XRD results of (a) $\text{Ca}_{9.9}\text{Eu}_{0.1}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$, and (b) $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$, where x is equal 1, 2, 3, 4, 5, and 6. The obtained materials were thermally treated at a temperature of 600 °C for 6 h. The XRD results were compared with the ICSD database hydroxyapatite and calcium pyrovanadate patterns. The signals from hydroxyapatite are labeled with (*) and signals from calcium pyrovanadate are labeled with (•).

The structural refinement was calculated by the Maud program (version 2.99) and was based on the hexagonal structure of hydroxyapatite and triclinic calcium pyrovanadate crystals indexing of the CIF (Crystallographic Information File) [58,59]. The quality of the structural refinement was evaluated via R-values (see Table S1 and Figure S1). Presence of apatite structure as well as secondary phase formation of calcium pyrovanadate among the nanopowder materials $\text{Ca}_{9.9}\text{Eu}_{0.1}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$, and $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ (where x is equal 1, 2, 3, 4, 5 and 6) was confirmed. Moreover, the calculated average grain size for powders was in the range of 25 to 90 nm. More details regarding Rietveld refinement are presented in the Supplementary Materials.

The FTIR spectra of the second series of nanopowder materials containing $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ ($x = 1, 2, 3, 4, 5$ and 6) confirmed the crystalline hydroxyapatite structure due to the presence of characteristic active vibrational bands that refer to hydroxyl groups (OH^-) and most importantly to phosphate groups (PO_4^{3-}) (Figure 2). The absorption bands of the phosphate group at 560.70 cm^{-1} and 600.24 cm^{-1} corresponded to the double degenerate bending mode (ν_2) of the P–O–P bonds and triply degenerate bending mode (ν_4) of the P–O bonds, respectively [18,60]. The absorption bands of the

phosphate group at 962.34 cm^{-1} and 1086.20 cm^{-1} correlated with the non-degenerative symmetric stretching mode (ν_1) of P–O and the triply degenerative asymmetric stretching mode (ν_3) of the P–O bond, respectively [60–62]. All positions of the bands corresponded exactly to the hydroxyapatite structure, but only in compounds that contain up to three (VO_4^{3-}) groups. It is also noticeable (Figure 2) that the additional incorporation of (VO_4^{3-}) groups into the hydroxyapatite framework unalterably entails the shift in the absorption bands toward lower wavenumbers [63]. Gradual increment of the number of vanadium groups substituted for phosphate groups leads to the appearance of characteristic vibrational bands that invoke the appearance of $\text{Ca}_2\text{V}_2\text{O}_7$ crystal structure [63]. It is particularly observed for the sample with the highest number ($x = 6$) of vanadate groups substituted for phosphate groups. Typical vibrational bands at 417.03 cm^{-1} (ν_4) and 561.66 cm^{-1} (ν_3) refer to the asymmetric vibration models of O–Ca–O and O–V–O bending, respectively. The vibrational bands that are noticeable at 825.38 cm^{-1} (ν_1) and 760.78 cm^{-1} (ν_2) corresponded to the stretching frequencies of the V–O group [64,65]. Additionally, a narrow vibrational band at 3567.18 cm^{-1} was seen due to stretching frequencies of the surface-absorbed water [64–66]. The described characteristic bonding of O–Ca–O, O–V–O, and V–O groups was the most visible for the sample material with the greatest number of vanadium groups (VO_4^{3-}). Fewer vanadium groups incorporated into the hydroxyapatite structure led to the smaller band vibrations occurring; additionally, the characteristic shift into the direction of hydroxyapatite was visible and typical phosphate groups (PO_4^{3-}) could be noticed [61,62].

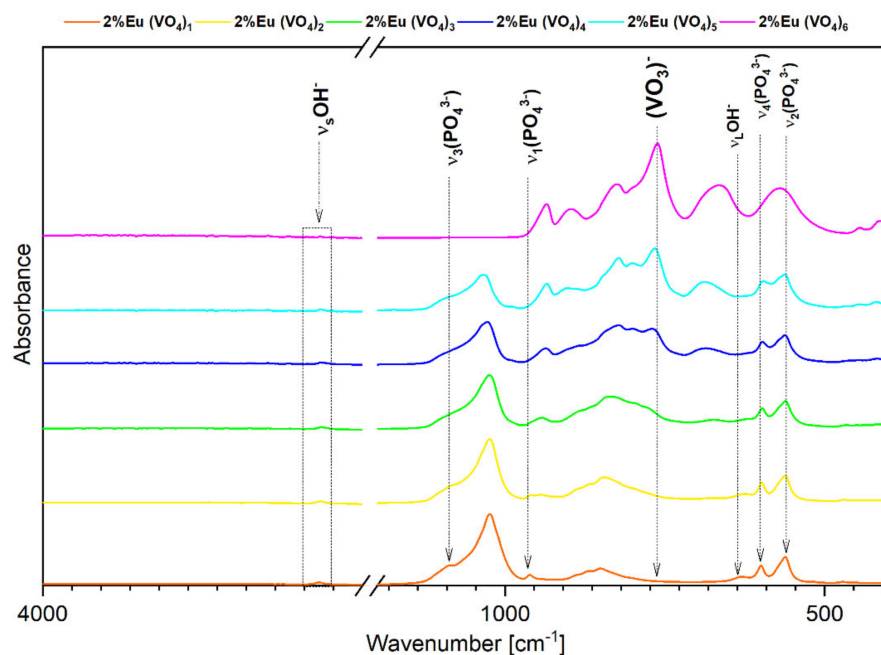


Figure 2. FTIR spectra of $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$, where $x = 1, 2, 3, 4, 5,$ and 6 .

The TEM images clearly show the nanostructure of $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$, $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_4(\text{VO}_4)_2(\text{OH})_2$, and $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_3(\text{VO}_4)_3(\text{OH})$ powders (Figure 3). Additionally, according to the SAED (selected area electron diffraction) technique, all selected materials presented well developed spotty rings, which signify the crystalline structure of the obtained powders (Figure 3) [67,68]. As also observed on the images (Figure 3), nano-sized particles had the tendency to form into larger agglomerates. The results of ICP-OES measurements showed the presence and concentration of Eu^{3+} ions in the compounds containing 2 mol% of the doped lanthanide in the samples of $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ where “ x ” is equal 1, 2, and 3. The presence of the vanadium element was also confirmed as well as calcium and phosphorous (Table 1) and the content of the elements approximately matched the theoretical number of particular elements in the obtained nanosized materials.

Indeed, all desired ions were present in the nanomaterials, and the ICP-OES measurements showed an almost identical content of elements when compared with theoretical calculations. However, the content of vanadium ions seemed to be less when compared to the formula that was previously established. These data resulted from the formula for the hydroxyapatite crystalline calculation, hence it can be observed that phosphorus is indeed substituted for vanadium, but in a lower amount than assumed. Simultaneously, the second phase of calcium pyrovanadate appeared (Figures 1 and 2) and was probably the result of more vanadium ions being incorporated into this structure and not into the hydroxyapatite lattice. Moreover, the SEM-EDS mapping of $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_4(\text{VO}_4)_2(\text{OH})_2$ confirmed the presence of all theoretical components such as oxygen, phosphorous, vanadium, and europium in the hydroxyapatite crystalline structure. The performed analysis also showed that all the components were equally distributed over the entire surface of the tested material (Figure 4).

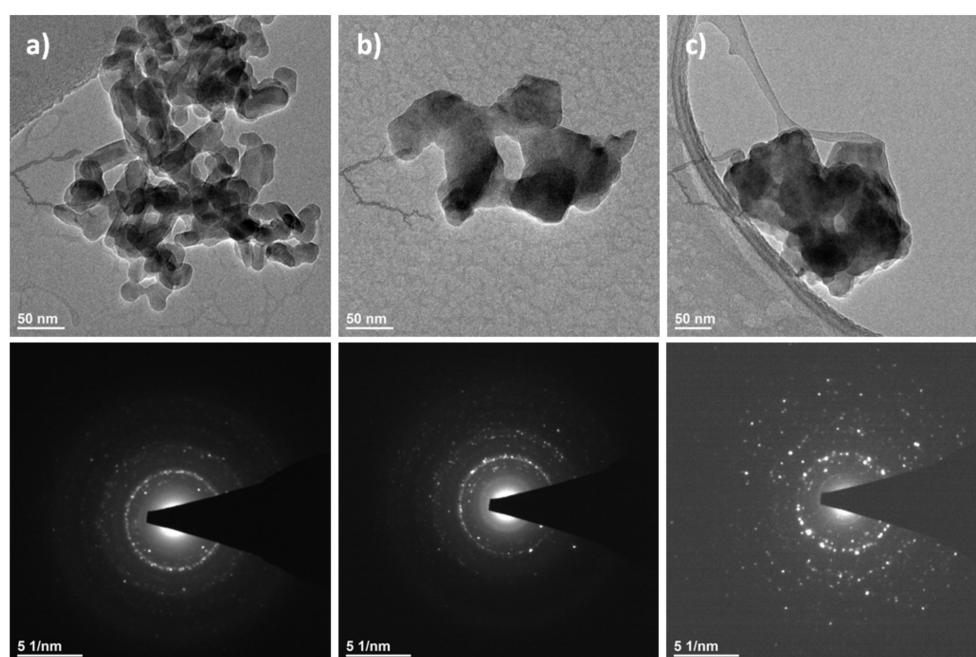


Figure 3. TEM and SAED images of (a) $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$, (b) $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_4(\text{VO}_4)_2(\text{OH})_2$, and (c) $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_3(\text{VO}_4)_3(\text{OH})_2$.

Table 1. The element contents in the $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ (where $x = 1-3$) based on the ICP-OES technique.

Sample	ICP OES Technique Results			
	n P [mol]	n Ca [mol]	n V [mol]	n Eu [mol]
$\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$	6.35	9.75	1.30	0.25
$\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_4(\text{VO}_4)_2(\text{OH})_2$	4.32	9.72	0.68	0.28
$\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_3(\text{VO}_4)_3(\text{OH})_2$	5.37	9.74	0.45	0.26

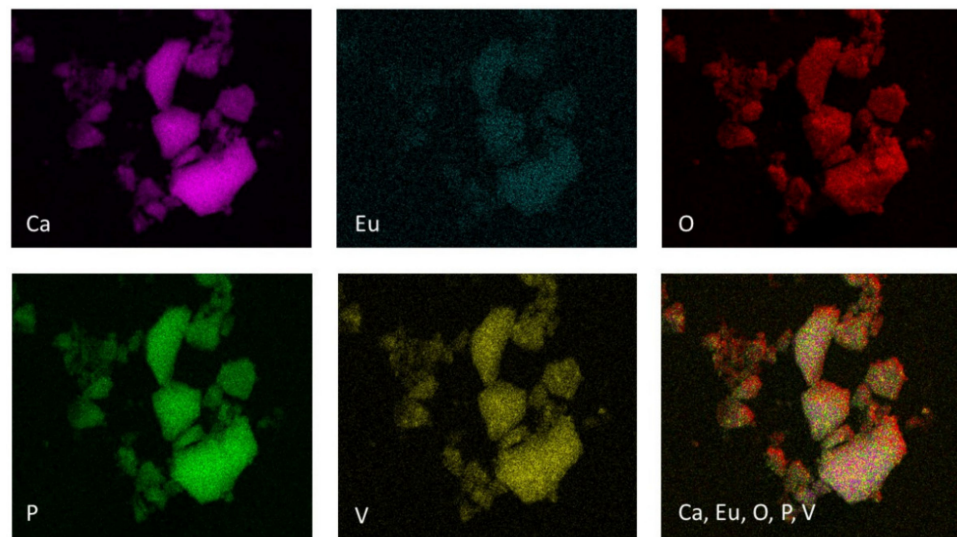


Figure 4. SEM-EDS mapping of $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_4(\text{VO}_4)_2(\text{OH})_2$ compound showing the elemental composition: calcium, phosphorous, europium, vanadium, and oxygen.

3.2. Luminescence Properties

Based on the XRD results (Figure 1) and partially on the FTIR spectra results (Figure 2), it is clear that in both series of obtained compounds, only those that contained 1 mol% and 2 mol% of europium (III) ions and were substituted with one and two (VO_4^{3-}) groups characterized by crystalline hydroxyapatite structure. The more phosphate groups is substituted by vanadate groups the less of pure hydroxyapatite structure is visible and more of calcium pyrovanadate appears. Taking into consideration the duality of the obtained compounds, we wanted to evaluate whether the different crystalline phases influenced the luminescence properties of Eu^{3+} ions and whether they decreased or increased these features. Therefore, the presence of Eu^{3+} ions incorporated into the structure of materials based on hydroxyapatite was confirmed by performing luminescence studies. The good quality emission spectra of both series of vanadium hydroxyapatite compounds $\text{Ca}_{9.9}\text{Eu}_{0.1}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ ($x = 1, 2, 3, 4, 5$ and 6) were measured in the spectral range of 500 to 750 nm (Figure 5a,b). During the measurements of both series of materials, an excitation wavelength of 396 nm was set as a function of the concentration of optically active ions. The recorded spectra were normalized to the characteristic europium transition $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$. Five typical transitions of Eu^{3+} ions were present in the spectra at wavelengths of 575 nm, 585 nm, 618 nm, 660 nm, and 710 nm, which corresponded to the transition from the excited level of $^5\text{D}_0$ to the levels of $^7\text{F}_{0-4}$. The transitions were assigned as $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_3$, and $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$, respectively, with increasing wavelength value. The most intense peak corresponded to the $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ transition, for which emission was observed at wavelengths in the range of 600–625 nm, while the maximum intensity was observed at 618 nm (see Figure 5a,b) [47,60,69]. A clear red emission from Eu^{3+} ions incorporated into vanadate hydroxyapatite materials was observed. According to the Judd–Ofelt theory, the $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ transition is strictly forbidden and its occurrence indicates a violation of the selection rules of the above-mentioned theory [47]. By analyzing the canonical transition $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$, the number of crystallographic sites substituted by europium ions into the structure of the host material can be assumed. The appearance of this transition indicates the location of Eu^{3+} ions at the low-symmetry environment and its observation is enabled when Eu^{3+} ions occupy sites with local symmetry of C_n , C_{nv} , C_s [70]. It can be seen that in the case of transition from the level $^5\text{D}_0$ to $^7\text{F}_0$ for the materials that contained only one (VO_4^{3-}) group substituted for the (PO_4^{3-}) group, the band clearly stood out from the spectra of other compounds. The transition $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ of materials $\text{Ca}_{9.9}\text{Eu}_{0.1}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$; $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ ($x = 1$) was noticeably divided into three splits, which indicates the occupancy of three different crys-

tallographic sites with the local symmetry of C_n , C_{nv} , C_s in the hydroxyapatite structure by Eu^{3+} ions [71]. As the 7F_0 level is degenerate, it does exhibit crystal field splitting and our results showed at least three different emitting species [48]. In the case of further transition from the level 5D_0 to 7F_1 , the same tendency was observed that for the above-mentioned materials with only one substituted (VO_4^{3-}) group, the band was broad and not visibly split as it was in the other materials that contained two and more (VO_4^{3-}) groups. For compounds $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$; $\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ where $x < 2, 3, 4, 5, 6$, the transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ is divided into three splits and these results correspond to other studies, where such characteristic splits occurred [72,73]. The most intensive transition for both series of the tested nanomaterials appeared to be the so-called hypertensive transition from level 5D_0 to 7F_2 . For this transition, the same trend was maintained as for compounds $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$, where one broad band was visible. The hypertensive transition for the rest of the compounds was divided into two distinct bands, which correspond to the results obtained by other studies [63,72].

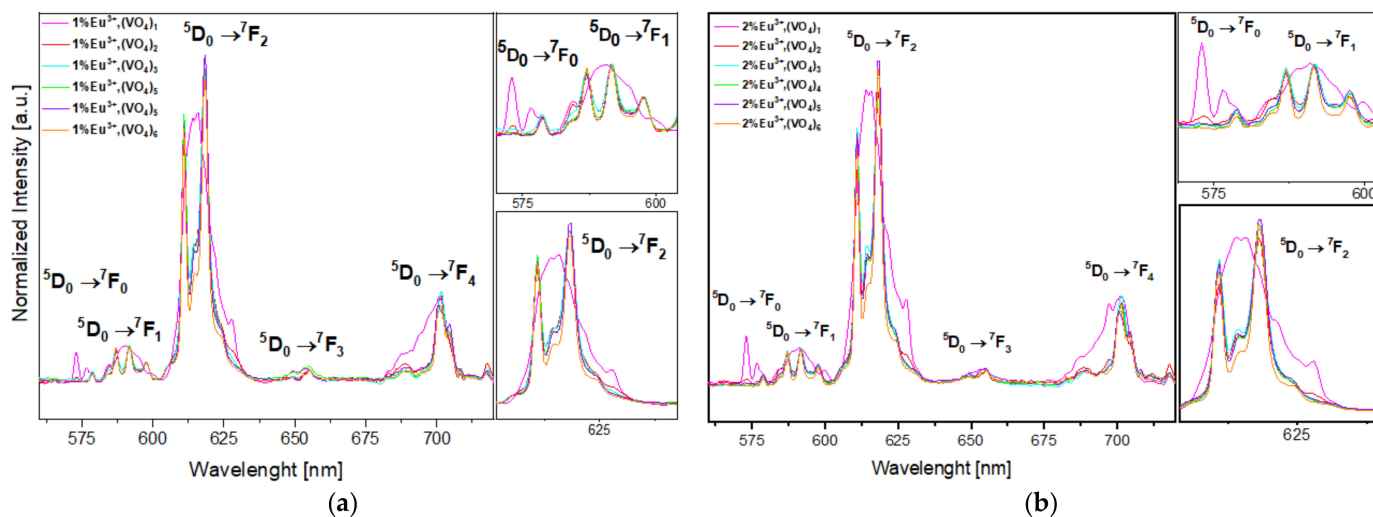


Figure 5. Emission spectra of (a) $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$, and (b) $\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$, where x is equal 1, 2, 3, 4, 5, and 6. The excitation wavelength is equal to 396 nm, a 525 nm filter was used in this experiment.

The excitation spectra were measured in the wavelength range of 240–600 nm for which the emission was monitored at 618 nm (see Figure 6). The recorded spectra were normalized to the characteristic europium transition ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_2$. The spectra for both series of compounds $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ ($x = 1, 2, 3, 4, 5, 6$) showed peaks from the transitions ${}^7F_0 \rightarrow {}^5H_{(3-7)}$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$, and ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_2$. In the spectra recorded for $\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$, where x ranged from 1 to 6, peaks corresponding to the transitions ${}^7F_0 \rightarrow {}^5F_{(1-4)}$ and ${}^7F_0 \rightarrow {}^3P_0$ could also be seen. In the $(\text{VO}_4^{3-})_x$ spectra, where x ranged from 1 to 5, apart from the transition's characteristic for Eu^{3+} ions, an intense peak was visible at a wavelength of approximately 270 nm, corresponding to the charge transfer of an electron between the ionized oxygen atom and the europium ion ($\text{O}^{2-} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$). Our results are compatible with other results that provided data of charge transfer between O^{2-} and Eu^{3+} ions in the hydroxyapatite structure [60,70,74]. For $(\text{VO}_4^{3-})_6$ spectra, this peak was masked with a more intense peak, for which the maximum of intensity was visible at a wavelength lower than 240 nm. With the increasing number of vanadate groups in the hydroxyapatite structure, the intensity of the broad signal originating from the electron transfer from the oxygen ion O^{2-} to the vanadium ion, V^{5+} , ($\text{O}^{2-} \rightarrow \text{V}^{5+}$) increases. This is a natural tendency, and it is natural for the charge transfer to be increased with an increased number of vanadium groups substituted for phosphate groups. Similar results have been presented in different

studies, and it seems to strongly correspond to our results [63,72,73,75,76]. The maximum intensity of this peak was noticeable on the spectra corresponding to the samples of $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{VO}_4)_6(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{VO}_4)_6(\text{OH})_2$ and appeared at wavelengths in the range 380–400 nm. It is clearly visible for both series of obtained samples as for the compounds: $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ ($x = 1$); the charge transfer $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$ was the most visible and clear characteristic of excitation spectra for europium ions. The more vanadate groups appeared, the more intense the charge transfer $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{V}^{5+}$ appeared and the results referred to both series of materials [72,73,75]. Moreover, the charge transfer from oxygen to vanadium seems to be slightly shifted toward the highest wavelength number, however, it can be caused by the incorporation of the vanadium groups into the hydroxyapatite framework. Nevertheless, the peak positions for the excitation and emission spectra were in agreement with those expected for Eu^{3+} ions incorporated in exchange for calcium(II) ions into the hydroxyapatite structure [30,31,47,74].

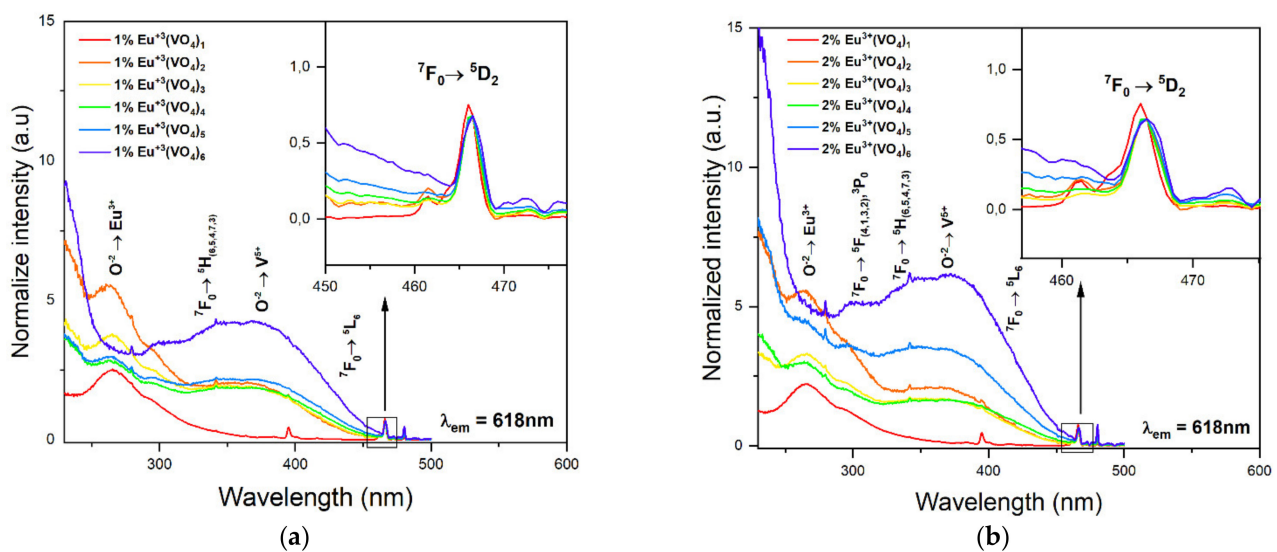


Figure 6. Emission spectra of (a) $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ and (b) $\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$, where x is equal 1, 2, 3, 4, 5, and 6. The excitation wavelength was equal to 396 nm and a 525 nm filter was used in this experiment.

For both 1 mol% and 2 mol% Eu^{3+} ion-doped hydroxyapatites, there was a significant difference in the decay time when more than one vanadate group was substituted instead of the phosphate group. For samples recorded for 1 mol% Eu^{3+} :CaHAp with $(\text{VO}_4^{3-})_x$ groups and 2 mol% Eu^{3+} :CaHAp with $(\text{VO}_4^{3-})_x$ groups where x ranges from 2 to 6, the decay time was similar, much shorter than for hydroxyapatites containing only one vanadate group (see Figure 7). Such a tendency corresponds to the emission and excitation spectra recorded for both series of compounds (Figures 5 and 6) where the difference can be observed between compounds containing only one vanadium group in the hydroxyapatite structure and the rest of the compounds with a higher number of (VO_4^{3-}) groups.

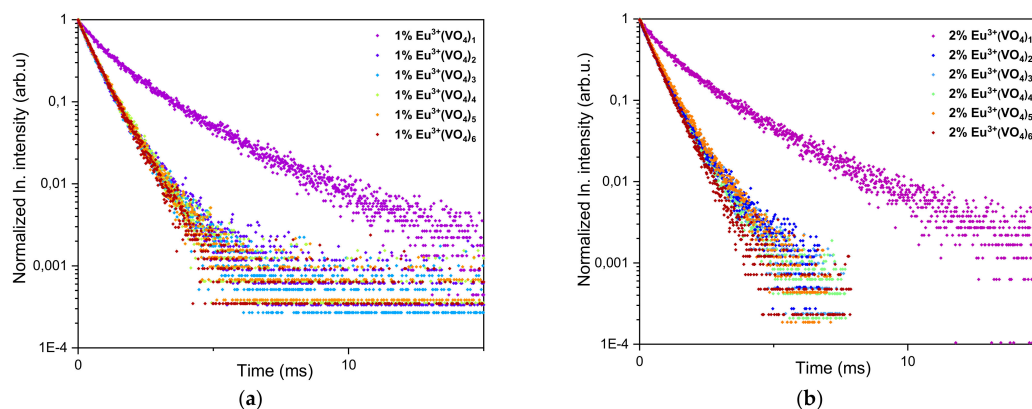


Figure 7. Emission spectra of (a) $\text{Ca}_{9.9}\text{Eu}_{0.1}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ and (b) $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$, where x is equal 1, 2, 3, 4, 5, and 6. The excitation wavelength was equal to 396 nm and a 525 nm filter was used in this experiment.

3.3. Biological Properties

It has been decided that the biocompatibility of selected compounds from both series would be evaluated. Therefore, from the first series, which contained a constant concentration of Eu^{3+} ions (1 mol%), compounds with 1, 2, 3, and 6 vanadate groups were selected. From the second series with a 2% concentration of europium(III) ions, the compounds were selected analogously to the first series. The compounds with 1–3 vanadate groups substituted with phosphate groups were selected for the evaluation of potential toxicity because it was noted that our compounds maintained the hexagonal structure of hydroxyapatite only up to three substituted groups. Moreover, compounds that contained the greatest number of vanadate groups were chosen for this experiment to establish whether the increased concentration of vanadium elements showed a potential toxic effect. It was found that the hemolysis assay (Figure 8) showed nontoxicity of the tested compounds and hemoglobin release was estimated below 5% of acceptable hemolysis, which naturally occurs in the blood system [77]. The results were compared to red blood cells treated with 1% SDS (dodecyl sulfoxide), which was established as the positive control and caused 100% of hemoglobin release and cell membrane disruption (data not shown). The negative control, which was maintained at ~1% of hemoglobin release, was obtained by treating purified erythrocytes with PBS buffer (pH = 7.4). Data revealed that all of the compounds showed biocompatibility. Moreover, the shape of red blood cells remained round, and no pathological alterations of the cell membrane were observed (Figure 9).

The results clearly showed that the selected compounds showed biocompatible properties toward the NHDF cell line (normal human dermal fibroblasts). It was decided that marginal compounds of the two series would be tested because of the obtained hemolysis assay results. The viability of cells was maintained at around 100 percent even when cells were treated with the highest concentration of prepared double distilled water-based colloids (Figure 10). The safest concentration of the tested compounds was 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ where the viability of the NHDF cell line was slightly more increased when compared to cells treated with a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. While many studies indicate the toxicity of the vanadium compounds such as ammonium metavanadate, calcium orthovanadate, and calcium pyrovanadate toward mammalian gastrointestinal, respiratory, urinary, and reproductive systems, our compounds showed non-toxic properties toward red blood cells and normal human dermal fibroblasts [78–80]. The toxicity of the vanadium element is mainly caused by the overdosage of this component, as has been evaluated in some research [78]. However, on the other hand, there is much evidence that indicates the positive influence on living organisms, for example, neuroprotective and neuroregenerative properties [41,42,44]. Nevertheless, neither the high concentration used in the case of our materials (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nor the increased number of vanadium groups incorporated into the hydroxyapatite structure caused a harmful effect on erythrocytes and the NHDF cell line.

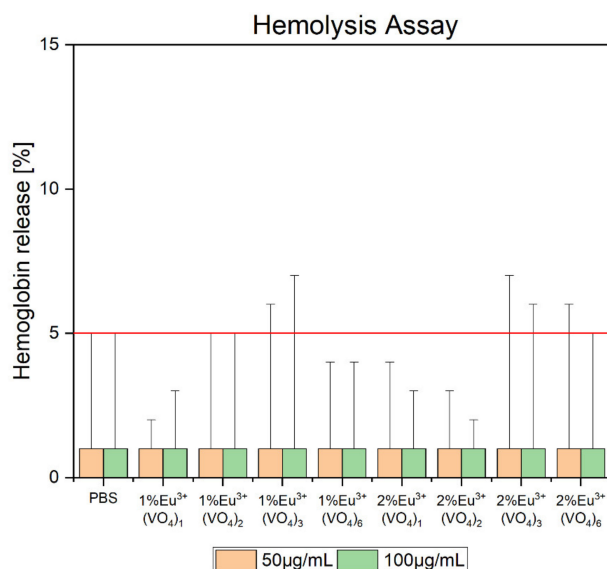


Figure 8. Hemolysis of selected compounds from the first series: $\text{Ca}_{9.9}\text{Eu}_{0.1}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$, and second series: $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$, where $x = 1, 2, 3, 6$. The concentration of the tested compounds was estimated at $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ and $100 \mu\text{g}/\text{mL}$. The red line was equal to 5% of acceptable hemoglobin release. The results were compared with red blood cells treated with PBS buffer (1% of hemolysis—negative control) and 1% SDS (100% of hemolysis—positive control).

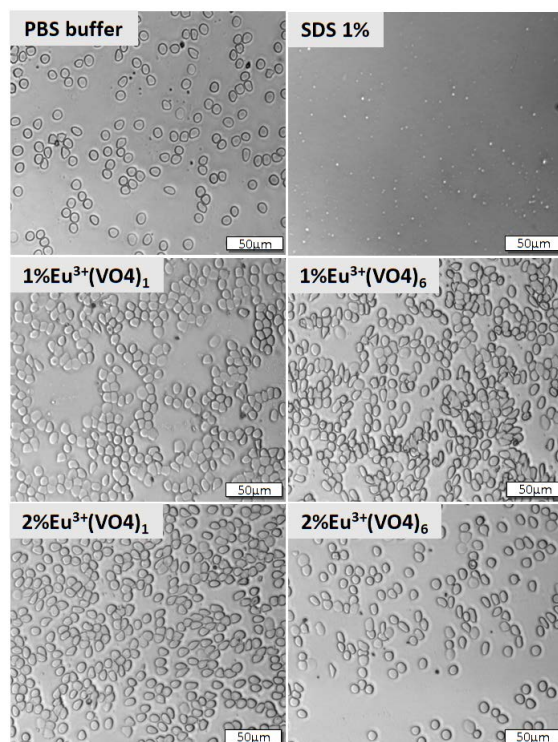


Figure 9. Red blood cell smear was performed with the use of purified sheep erythrocytes. For this experiment, selected compounds were used from the first series: $\text{Ca}_{9.9}\text{Eu}_{0.1}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$, $\text{Ca}_{9.9}\text{Eu}_{0.1}(\text{VO}_4)_6(\text{OH})_2$ and from the second series: $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.2}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$, $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.1}(\text{VO}_4)_6(\text{OH})_2$. The final concentration of the tested compounds was estimated at $100 \mu\text{g}/\text{mL}$. The morphology of red blood cells treated with the tested compounds was compared with that of red blood cells treated with PBS buffer (negative control) and 1% SDS (positive control).

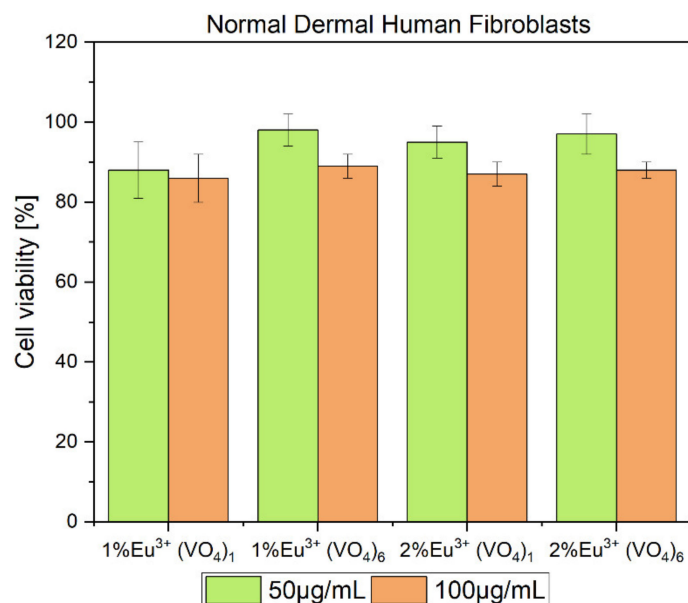


Figure 10. MTT cytotoxicity assay of compounds selected from the first series: $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$, $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{VO}_4)_6(\text{OH})_2$ and second series: $\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$, $\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,1}(\text{VO}_4)_6(\text{OH})_2$. MTT assay was performed by using the NHDF cell line, the final concentration of the tested compounds in culture medium was estimated at 50 µg/mL and 100 µg/mL.

3.4. Ion Release to SBF

The ion dependent release to the simulated body fluid environment was evaluated from two selected nanopowder materials $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$ (Tables 2 and 3). $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$ nanopowder materials were used in this experiment because the XRD diffractograms showed a clear hexagonal structure of hydroxyapatite (Figure 1). Therefore, during the experiment, the ion release from the solid hydroxyapatite crystalline materials was determined. The results showed that Ca and P ions were already present in the fluid in both samples in the concentration 11 ± 0.5 ppm for calcium and 2.45 ± 0.15 ppm to 2.84 ± 0.15 ppm for phosphorus ions (Tables 2 and 3). Their appearance comes from the components of simulated body fluid itself [50,51]. Nevertheless, a gradual increase was noticed during longer incubation and after 1440 h, calcium concentration was maintained at 13.84 ± 0.7 ppm for $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$ to 14.9 ± 0.7 ppm $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$, and for phosphorus ions, it was maintained around 2.8 ± 0.15 ppm for $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$ and 2.9 ± 0.15 ppm for $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$ nanopowder materials (Tables 2 and 3). Slightly different observations were seen for vanadium ion release because for $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$, vanadium ion release was already observed after 45 min of incubation and for $\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$ after 30 min and also had a tendency for gradual release (Tables 2 and 3). There was no release observed for Eu ions, however, slight detection was observed for the sample doped with higher lanthanide concentration (Tables 2 and 3). For the two tested representatives, all investigated ions appeared to have a relatively slow release to the simulated body fluid, which is a promising result, and they can be used in our future in vitro and in vivo tests.

Table 2. The Ca, P, Eu, and V ion release from $\text{Ca}_{9,9}\text{Eu}_{0,1}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$ to the simulated body fluid after 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 360 min, and 1440 min of incubation with simultaneous rotation.

Time of Incubation (min)	Ca	P	Eu	V
0	11 ± 0.5 ppm	2.45 ± 0.1 ppm		
5	11.4 ± 0.5 ppm	2.6 ± 0.1 ppm		
15	12.32 ± 0.5 ppm	2.73 ± 0.1 ppm		
30	12.64 ± 0.6 ppm	2.758 ± 0.1 ppm		
45	12.87 ± 0.6 ppm	2.77 ± 0.1 ppm		0.266 ± 0.01 ppm
60	13.34 ± 0.7 ppm	2.806 ± 0.15 ppm		0.315 ± 0.015 ppm
360	13.58 ± 0.7 ppm	2.8 ± 0.15 ppm		0.543 ± 0.015 ppm
1440	13.84 ± 0.7 ppm	2.8 ± 0.15 ppm		1.227 ± 0.06 ppm

Table 3. The Ca, P, Eu, and V ion release from $\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$ to the simulated body fluid after 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 360 min, and 1440 min of incubation with simultaneous rotation.

Time of Incubation (min)	Ca	P	Eu	V
0	11 ± 0.5 ppm	2.84 ± 0.15 ppm		
5	11.3 ± 0.5 ppm	2.846 ± 0.15 ppm		
15	12.12 ± 0.6 ppm	2.897 ± 0.15 ppm		
30	12.24 ± 0.6 ppm	2.894 ± 0.15 ppm	<0.1 ± 0 ppm	0.2 ± 0.01 ppm
45	12.71 ± 0.6 ppm	2.9 ± 0.15 ppm	<0.1 ± 0 ppm	0.286 ± 0.015 ppm
60	12.77 ± 0.6 ppm	2.9 ± 0.15 ppm	<0.1 ± 0 ppm	0.351 ± 0.02 ppm
360	13.94 ± 0.7 ppm	2.903 ± 0.15 ppm	<0.1 ± 0 ppm	0.657 ± 0.03 ppm
1440	14.9 ± 0.7 ppm	2.9 ± 0.15 ppm	<0.1 ± 0 ppm	1.291 ± 0.06 ppm

4. Conclusions

This paper presents the structural characterization, luminescence, and biological properties of vanadium hydroxyapatite doped with 1 mol% and 2 mol% of Eu^{3+} ions. The samples obtained via the precipitation method and thermally treated at 600 °C showed a hydroxyapatite hexagonal structure up to three vanadate groups substituted for phosphate groups. It was confirmed by X-ray diffractometry and FTIR spectra that the gradual increase in (VO_4^{3+}) groups in the obtained nanopowder materials eventually led to the gradual decrease in the intensity of the signal from (PO_4^{3+}) groups of the hydroxyapatite framework and an increase in the intensity of the signal from (VO_4^{3-}) groups of calcium vanadate. The luminescence study showed the characteristic red emission spectra of Eu^{3+} ions doped among all samples. Our study also presented how the number of vanadate groups in europium-doped hydroxyapatite influences the emission spectra, excitation spectra, and luminescence kinetics. Finally, the evaluation of the potential toxicity of the obtained nanomaterials confirmed hemocompatibility toward sheep red blood cells even in the highest tested concentration. Furthermore, our study confirmed cytocompatibility of vanadium hydroxyapatite doped with Eu^{3+} ions and our materials exhibited biocompatibility even when the highest number of vanadium groups was incorporated into hydroxyapatite. The time dependent ion release experiment showed slow and gradual element release to the

SBF solution and additionally confirmed the potential biological application of the obtained nanopowder materials.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nano12010077/s1>, Figure S1: Representative results of the of the 1 mol% Eu³⁺ ion doped Ca₁₀(PO₄)₅(VO₄)₁(OH)₂, obtained at 600°C, Rietveld analysis (red – fitted diffraction; blue – differential pattern, column – reference phase peak position), Table S1: Unit cell parameters (a–c), crystal cell volume (V), as well as refined factor (Rw) for the Ca₁₀(PO₄)₅(VO₄)₁(OH)₂ (HAVp) and Ca₁₀(PO₄)_{6-x}(VO₄)_x(OH)/Ca₂V₂O₇ (HAVp/CaVO) nanocomposites doped with x mol% Eu³⁺ (where x = 0–2).

Author Contributions: Conceptualization, R.J.W.; Methodology, N.N. and R.J.W.; Investigation, N.N. and R.J.W.; Writing—original draft preparation, N.N. and R.J.W.; Writing—review and editing, R.J.W.; Visualization, N.N. and R.J.W.; Supervision, R.J.W.; Funding acquisition, R.J.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors would like to acknowledge the National Science Center, Poland (NCN) for financial support within the Projects “Preparation and modulation of spectroscopic properties of YXZO₄, where X and Z - P⁵⁺, V⁵⁺, As⁵⁺, doped with “s²-like” ions and co-doped with rare earth ions” (No. UMO-2019/33/B/ST5/02247) and “Preparation and characterization of biocomposites based on nanoapatites for theranostic” (No. UMO-2015/19/B/ST5/01330).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available from the authors upon request.

Acknowledgments: We are grateful to E. Bukowska for the XRPD measurements and to D. Szymanski for the SEM-EDS spectra.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Florencio-Silva, R.; Sasso, G.R.D.S.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M.J.; Cerri, P.S. Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 421746. [[CrossRef](#)]
2. Lopes, D.; Martins-Cruz, C.; Oliveira, M.B.; Mano, J.F. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials* **2018**, *185*, 240–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Liu, Y.; Zhou, G.; Cao, Y. Recent progress in cartilage tissue engineering—Our experience and future directions. *Engineering* **2017**, *3*, 28–35. [[CrossRef](#)]
4. Nicolaides, M.; Pafitanis, G.; Vris, A. Open tibial fractures: An overview. *J. Clin. Orthop. Trauma* **2021**, *20*, 101483. [[CrossRef](#)]
5. Trabulsky, P.P.; Kerley, S.M.; Hoffman, W.Y. A prospective study of early soft tissue coverage of grade IIIB tibial fractures. *J. Trauma* **1994**, *36*, 661–668. [[CrossRef](#)]
6. Calmar, E.A.; Vinci, R.J. The anatomy and physiology of bone fracture and healing. *Clin. Ped. Emerg. Med.* **2002**, *3*, 85–93. [[CrossRef](#)]
7. Silver, J.; Schwab, M.E.; Popovich, P.G. Central nervous system regenerative failure: Role of oligodendrocytes, astrocytes, and microglia. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *7*, a020602. [[CrossRef](#)]
8. Watson, E.C.; Adams, R.H. Biology of bone: The vasculature of the skeletal system. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2018**, *8*, a031559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Huysseune, A. Skeletal system. In *The Laboratory Fish*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2000.
10. Marsell, R.; Einhorn, T. The biology of fracture healing. *Injury* **2011**, *42*, 551–555. [[CrossRef](#)]
11. Perez, J.R.; Kouroupis, D.; Li, D.J.; Best, T.M.; Kaplan, L.; Correa, D. Tissue engineering and cell-based therapies for fractures and bone defects. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2018**, *6*, 1–23. [[CrossRef](#)]
12. Li, Y.; Zheng, X.; Chu, Q. Bio-based nanomaterials for cancer therapy. *Nano Today* **2021**, *38*, 101134. [[CrossRef](#)]
13. Zhang, R.X.; Li, J.; Zhang, T.; Amini, M.A.; He, C.; Lu, B.; Ahmed, T.; Lip, H.; Rauth, A.M.; Wu, X.Y. Importance of integrating nanotechnology with pharmacology and physiology for innovative drug delivery and therapy—An illustration with firsthand examples. *Acta Pharmacologica Sinica* **2018**, *39*, 825–844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kumar Dash, D.; Kant Panik, R.; Kumar Sahu, A.; Tripathi, V. Role of nanobiotechnology in drug discovery, development and molecular diagnostic. In *Applications of Nanobiotechnology*; IntechOpen: London, UK, 2020.
15. Antoniac, I.V. Cationic and anionic substitutions in hydroxyapatite. In *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016.

16. Cacciotti, I. Multisubstituted hydroxyapatite powders and coatings: The influence of the codoping on the hydroxyapatite performances. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2019**, *16*, 1864–1884. [[CrossRef](#)]
17. Swetha, M.; Sahithi, K.; Moorthi, A.; Srinivasan, N.; Ramasamy, K.; Selvamurugan, N. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *47*, 1–4. [[CrossRef](#)]
18. Odusote, J.K.; Danyuo, Y.; Baruwa, A.D.; Azeez, A.A. Synthesis and characterization of hydroxyapatite from bovine bone for production of dental implants. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2019**, *17*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ventura, R. Bone regeneration of decellularized in-vivo deposited extracellular matrix (ECM) on hydroxyapatite sponge scaffold. *MOJ Cell Sci. Rep.* **2016**, *3*, 3–6. [[CrossRef](#)]
20. Szczeń, A.; Hołysz, L.; Chibowski, E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *249*, 321–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Zou, Q.; Li, Y.; Zhang, L.; Zuo, Y.; Li, J.; Li, X. Characterization and cytocompatibility of nano-hydroxyapatite/chitosan bone cement with the addition of calcium salts. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2009**, *90*, 156–164. [[CrossRef](#)]
22. Calasans-Maia, M.D.; de Melo, B.R.; Alves, A.T.N.N.; Resende, R.F.D.B.; Louro, R.S.; Sartoretto, S.C.; Granjeiro, J.M.; Alves, G.G. Cytocompatibility and biocompatibility of nanostructured carbonated hydroxyapatite spheres for bone repair. *J. Appl. Oral Sci.* **2015**, *23*, 599–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Huang, B.; Caetano, G.; Vyas, C.; Blaker, J.J.; Diver, C.; Bártolo, P. Polymer-ceramic composite scaffolds: The effect of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate. *Materials* **2018**, *11*, 129. [[CrossRef](#)]
24. Bianco, A.; Bozzo, B.M.; del Gaudio, C.; Cacciotti, I.; Armentano, I.; Dottori, M.; D'Angelo, F.; Martino, S.; Orlacchio, A.; Kenny, J.M. Poly (L-lactic acid)/calcium-deficient nanohydroxyapatite electrospun mats for bone marrow stem cell cultures. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2011**, *26*, 225–241. [[CrossRef](#)]
25. Han, Y.; Wang, X.; Li, S. Biocompatible europium doped hydroxyapatite nanoparticles as a biological fluorescent probe. *Curr. Nanosci.* **2010**, *6*, 178–183. [[CrossRef](#)]
26. Xie, Y.; He, W.; Li, F.; Perera, T.S.H.; Gan, L.; Han, Y.; Wang, X.; Li, S.; Dai, H. Luminescence enhanced $\text{Eu}^{3+}/\text{Gd}^{3+}$ co-doped hydroxyapatite nanocrystals as imaging agents in vitro and in vivo. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 10212–10219. [[CrossRef](#)]
27. Andronescu, E.; Predoi, D.; Neacsu, I.A.; Paduraru, A.V.; Musuc, A.M.; Trusca, R.; Oprea, O.; Tanasa, E.; Vasile, O.R.; Nicoara, A.I.; et al. Photoluminescent hydroxylapatite: Eu^{3+} doping effect on biological behaviour. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1187. [[CrossRef](#)]
28. García Domínguez, G.; Garrido Hernández, A.; Cerón Montes, G.; Morales Ramírez, A.J.; de la Torre, S.D. Structural and luminescent properties of europium-doped and undoped hydroxyapatite powders sintered by spark plasma. *Ceramics-Silikaty* **2019**, *63*, 100–109. [[CrossRef](#)]
29. Escudero, A.; Calvo, M.E.; Rivera-ferna, S. Microwave-assisted synthesis of biocompatible europium-doped calcium hydroxyapatite and fluoroapatite luminescent nanospindles functionalized with poly(acrylic acid). *Langmuir* **2013**, *29*, 1985–1994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Chen, F.; Zhu, Y.J.; Zhang, K.H.; Wu, J.; Wang, K.W.; Tang, Q.L.; Mo, X.M. Europium-doped amorphous calcium phosphate porous nanospheres: Preparation and application as luminescent drug carriers. *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, *6*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Yang, P.; Quan, Z.; Li, C.; Kang, X.; Lian, H.; Lin, J. Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4341–4347. [[CrossRef](#)]
32. Carpenter, C.M.; Sun, C.; Prax, G.; Rao, R.; Xing, L. Hybrid X-ray/optical luminescence imaging: Characterization of experimental conditions. *Med Phys.* **2010**, *37*, 4011–4018. [[CrossRef](#)]
33. Kandarakis, I.; Cavouras, D.; Panayiotakis, G.S.; Triantis, D.; Nomicos, C.D. Europium-activated phosphors for use in X-ray detectors of medical imaging systems. *Eur. Radiol.* **1998**, *8*, 313–318. [[CrossRef](#)]
34. Zhang, W.; Lan, Y.; Ma, M.; Chai, S.; Zuo, Q.; Kim, K.H.; Gao, Y. A novel chitosan–vanadium–titanium–magnetite composite as a superior adsorbent for organic dyes in wastewater. *Environ. Int.* **2020**, *142*, 105798. [[CrossRef](#)]
35. Babar, B.M.; Mohite, A.A.; Patil, V.L.; Pawar, U.T.; Kadam, L.D.; Kadam, P.M.; Patil, P.S. Sol-gel prepared vanadium oxide for photocatalytic degradation of methylene blue dye. *Mater. Today Proc.* **2021**, *43*, 2673–2677. [[CrossRef](#)]
36. Oliveira, H.S.; Oliveira, L.C.A.; Pereira, M.C.; Ardisson, J.D.; Souza, P.P.; Patrício, P.O.; Moura, F.C.C. Nanostructured vanadium-doped iron oxide: Catalytic oxidation of methylene blue dye. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 3051–3058. [[CrossRef](#)]
37. Treviño, S.; Díaz, A.; Sánchez-Lara, E.; Sanchez-Gaytan, B.L.; Perez-Aguilar, J.M.; González-Vergara, E. Vanadium in biological action: Chemical, pharmacological aspects, and metabolic implications in diabetes mellitus. *Biol. Trace Elem. Res.* **2019**, *188*, 68–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Odate, S.; Pawlik, J.R. The role of vanadium in the chemical defense of the solitary tunicate, *Phallusia nigra*. *J. Chem. Ecol.* **2007**, *33*, 643–654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Malinovsky, D.; Kashulin, N.A. Vanadium isotope ratio measurements in fruit-bodies of: *Amanita muscaria*. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 5921–5929. [[CrossRef](#)]
40. Gerling, N.; Culmsee, C.; Klumpp, S.; Krieglstein, J. The tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate mimics NGF-induced neuroprotective signaling in rat hippocampal neurons. *Neurochem. Int.* **2004**, *44*, 505–520. [[CrossRef](#)]
41. Morita, A.; Zhu, J.; Suzuki, N.; Enomoto, A.; Matsumoto, Y.; Tomita, M.; Suzuki, T.; Ohtomo, K.; Hosoi, Y. Sodium orthovanadate suppresses DNA damage-induced caspase activation and apoptosis by inactivating P53. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 499–511. [[CrossRef](#)]

42. Morita, A.; Yamamoto, S.; Wang, B.; Tanaka, K.; Suzuki, N.; Aoki, S.; Ito, A.; Nanao, T.; Ohya, S.; Yoshino, M.; et al. Sodium orthovanadate inhibits P53-mediated apoptosis. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 257–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Uthus, E.O.; Nielsen, F.H. Effect of vanadium, iodine and their interaction on growth, blood variables, liver trace elements and thyroid status indices in rats. *Magnes. Trace Elem.* **1990**, *9*, 219–226.
44. Matsumoto, J.; Morioka, M.; Hasegawa, Y.; Kawano, T.; Yoshinaga, Y.; Maeda, T.; Yano, S.; Kai, Y.; Fukunaga, K.; Kuratsu, J. Sodium orthovanadate enhances proliferation of progenitor cells in the adult rat subventricular zone after focal cerebral ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *318*, 982–991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hazard, S.W.; Zwemer, C.F.; Mackay, D.R.; Koduru, S.V.; Ravnicek, D.J.; Ehrlich, H.P. Topical vanadate enhances the repair of median laparotomy incisions. *J. Surg. Res.* **2017**, *207*, 102–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wang, B.; Tanaka, K.; Morita, A.; Ninomiya, Y.; Maruyama, K.; Fujita, K.; Hosoi, Y.; Neno, M. Sodium orthovanadate (vanadate), a potent mitigator of radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice. *J. Radiat. Res.* **2013**, *54*, 620–629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Binnemans, K. Interpretation of europium(III) spectra. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *295*, 1–45. [[CrossRef](#)]
48. Werts, M.H.V.; Jukes, R.T.F.; Verhoeven, J.W. The emission spectrum and the radiative lifetime of Eu^{3+} in luminescent lanthanide complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*, 1542–1548. [[CrossRef](#)]
49. Cacciotti, I.; Bianco, A.; Pezzotti, G.; Gusmano, G. Synthesis, thermal behaviour and luminescence properties of rare earth-doped titania nanofibers. *Chem. Eng. J.* **2011**, *166*, 751–764. [[CrossRef](#)]
50. Kokubo, T. Bioactive glass ceramics: Properties and applications. *Biomaterials* **1991**, *12*, 155–163. [[CrossRef](#)]
51. Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W³. *J. Biomed. Mater. Res.* **1990**, *24*, 721–734. [[CrossRef](#)]
52. Holder, C.F.; Schaak, R.E. Tutorial on powder X-ray diffraction for characterizing nanoscale materials. *ACS Nano* **2019**, *13*, 7359–7365. [[CrossRef](#)]
53. Mittemeijer, E.J.; Welzel, U. The “state of the art” of the diffraction analysis of crystallite size and lattice strain. *Zeitschrift für Kristallographie* **2008**, *223*, 552–560. [[CrossRef](#)]
54. Ogo, S.; Onda, A.; Yanagisawa, K. Hydrothermal synthesis of vanadate-substituted hydroxyapatites, and catalytic properties for conversion of 2-propanol. *Appl. Catal. A Gen.* **2008**, *348*, 129–134. [[CrossRef](#)]
55. Onda, A.; Ogo, S.; Kajiyoshi, K.; Yanagisawa, K. Hydrothermal synthesis of vanadate/phosphate hydroxyapatite solid solutions. *Mater. Lett.* **2008**, *62*, 1406–1409. [[CrossRef](#)]
56. Kalniņa, D.; Levina, A.; Pei, A.; Gross, K.A.; Lay, P.A. Synthesis, characterization and in vitro anti-cancer activity of vanadium-doped nanocrystalline hydroxyapatite. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 17891–17901. [[CrossRef](#)]
57. Ogo, S.; Onda, A.; Kajiyoshi, K.; Yanagisawa, K. Hydrothermal synthesis and particle size control of hydroxyapatite solid solutions with vanadate. *Phosphorus Res. Bull.* **2007**, *21*, 84–87. [[CrossRef](#)]
58. Saville, A.I.; Creuziger, A.; Mitchell, E.B.; Vogel, S.C.; Benzing, J.T.; Klemm-Toole, J.; Clarke, K.D.; Clarke, A.J. MAUD rietveld refinement software for neutron diffraction texture studies of single- and dual-phase materials. *Integr. Mater. Manuf. Innov.* **2021**, *10*, 461–487. [[CrossRef](#)]
59. Rietveld, H.M. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. *J. Appl. Crystallogr.* **1969**, *2*, 65–71. [[CrossRef](#)]
60. Sobierajska, P.; Wiglus, R.J. Influence of Li^+ ions on the physicochemical properties of nanocrystalline calcium-strontium hydroxyapatite doped with Eu^{3+} ions. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 14908–14916. [[CrossRef](#)]
61. Hanifi, A.; Fathi, M.H. Bioresorbability evaluation of hydroxyapatite nanopowders in a stimulated body fluid medium. *Iran. J. Pharm. Sci.* **2008**, *4*, 141–148.
62. Gheisari, H.; Karamian, E.; Abdollahi, M. A novel hydroxyapatite-hardystonite nanocomposite ceramic. *Ceram. Int.* **2015**, *41*, 5967–5975. [[CrossRef](#)]
63. Taxak, V.B.; Sheetal; Dayawati; Khatkar, S.P. Synthesis, structural and optical properties of Eu^{3+} -doped $\text{Ca}_2\text{V}_2\text{O}_7$ nanophosphors. *Curr. Appl. Phys.* **2013**, *13*, 594–598. [[CrossRef](#)]
64. Thiagarajan, K.; Theerthagiri, J.; Senthil, R.A.; Madhavan, J. Simple and low cost electrode material based on $\text{Ca}_2\text{V}_2\text{O}_7$ /PANI nanoplatelets for supercapacitor applications. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2017**, *28*, 17354–17362. [[CrossRef](#)]
65. Yu, H.; Song, H.; Pan, G.; Qin, R.; Fan, L.; Zhang, H.; Bai, X.; Li, S.; Zhao, H.; Lu, S. Preparation and luminescent properties of $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ nanofibers by electrospinning. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008**, *8*, 1432–1436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Sharma, A.; Varshney, M.; Chae, K.H.; Won, S.O. Electronic structure and luminescence assets in white-light emitting $\text{Ca}_2\text{V}_2\text{O}_7$, $\text{Sr}_2\text{V}_2\text{O}_7$ and $\text{Ba}_2\text{V}_2\text{O}_7$ pyro-vanadates: X-ray absorption spectroscopy investigations. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 26423–26431. [[CrossRef](#)]
67. Suvorova, E.I.; Buffat, P.A. Electron diffraction from micro- and nanoparticles of hydroxyapatite. *J. Microsc.* **1999**, *196*, 46–58. [[CrossRef](#)]
68. Zhuang, Z.; Miki, T.; Yumoto, M.; Konishi, T.; Aizawa, M. Ultrastructural observation of hydroxyapatite ceramics with preferred orientation to a-plane using high-resolution transmission electron microscopy. *Procedia Eng.* **2012**, *36*, 121–127. [[CrossRef](#)]
69. Targonska, S.; Wiglus, R.J. Investigation of physicochemical properties of the structurally modified nanosized silicate-substituted hydroxyapatite co-doped with Eu^{3+} and Sr^{2+} ions. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Szyszka, K.; Targonska, S.; Gazinska, M.; Szustakiewicz, K.; Wiglus, R.J. The comprehensive approach to preparation and investigation of the Eu^{3+} doped hydroxyapatite/poly(L-lactide) nanocomposites: Promising materials for theranostics application. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1146. [[CrossRef](#)]

71. Bunzli, J.C.G.; Plancherel, D.; Pradervand, G.O. Eu(III) ion as luminescent probe: Structural investigation of complexes between europium nitrate and two polyethers. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 980–984. [[CrossRef](#)]
72. Kumar, V.; Bedyal, A.K.; Sharma, J.; Kumar, V.; Ntwaeaborwa, O.M.; Swart, H.C. Spectral and surface investigations of $\text{Ca}_2\text{V}_2\text{O}_7:\text{Eu}^{3+}$ nanophosphors prepared by citrate-gel combustion method: A potential red-emitting phosphor for near-UV light-emitting diodes. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **2014**, *116*, 1785–1792. [[CrossRef](#)]
73. Pogosova, M.A.; Azarmi, F.; Eliseev, A.A.; Kazin, P.E. Eu and Cu co-substituted calcium vanadate—The crystal structure, luminescence and color. *Dyes Pigment.* **2018**, *148*, 219–223. [[CrossRef](#)]
74. Ciobanu, C.S.; Iconaru, S.L.; Massuyeau, F.; Constantin, L.V.; Costescu, A.; Predoi, D. Synthesis, structure, and luminescent properties of europium-doped hydroxyapatite nanocrystalline powders. *J. Nanomater.* **2012**. [[CrossRef](#)]
75. Wujczyk, M.; Watras, A.; Wiglusz, R.J. The study of the influence of PH on the structural and spectroscopic properties of nanocrystalline Eu^{3+} ion-doped yttrium orthovanadate. *Dalton Trans.* **2021**, *50*, 3724–3733. [[CrossRef](#)]
76. Wujczyk, M.; Watras, A.; Boutinaud, P.; Bettinelli, M.; Targonska, S.; Hölsä, J.; Wiglusz, R.J. Emission quenching and first evidence of Tb^{3+} -to- As^{5+} charge transfer in terbium(III) ion-doped $\text{YV}_x\text{As}_{1-x}\text{O}_4$ solid-state solution. *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124*, 17364–17371. [[CrossRef](#)]
77. Guan, R.G.; Johnson, I.; Cui, T.; Zhao, T.; Zhao, Z.Y.; Li, X.; Liu, H. Electrodeposition of hydroxyapatite coating on Mg-4.0 Zn-1.0 Ca-0.6 Zr alloy and in vitro evaluation of degradation, hemolysis, and cytotoxicity. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2012**, *100 A*, 999–1015. [[CrossRef](#)]
78. Ii, H. Vanadium metabolism in sheep. I. comparative and acute toxicity of vanadium compounds in sheep. *J. Anim. Sci.* **1982**, *55*, 344–349.
79. Wilk, A.; Szypulska-Koziarska, D.; Wiszniewska, B. The toxicity of vanadium on gastrointestinal, urinary and reproductive system, and its influence on fertility and fetuses malformations. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej* **2017**, *71*, 850–859. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Ghosh, S.K.; Saha, R.; Saha, B. Toxicity of inorganic vanadium compounds. *Res. Chem. Intermed.* **2015**, *41*, 4873–4897. [[CrossRef](#)]



Supplementary Materials

A Study of Vanadate Group Substitution into Nanosized Hydroxyapatite Doped with Eu^{3+} Ions as a Potential Tissue Replacement Material

Nicole Nowak* and Rafal Jakub Wiglusz*

Institute of Low Temperature and Structure Research, Polish Academy of Sciences, Okolna 2, 50-422 Wrocław, Poland

* Correspondence: n.nowak@intibs.pl (N.N.); r.wiglusz@intibs.pl (R.J.W.); Tel.: +48-071-3954-159 (N.N. & R.J.W.)

Abstract: In this study, nanosized vanadate-substituted hydroxyapatites doped with 1 mol% and 2 mol% Eu^{3+} ions were obtained via the precipitation method. To evaluate the structure and morphology of the obtained compounds, the XRPD (X-ray powder diffraction) technique, Rietveld refinement, SEM-EDS (scanning electron microscopy-energy-dispersive spectrometry) and TEM (transmission electron microscopy) techniques as well as FTIR (Fourier transform infrared) spectroscopy were performed. Moreover, the chemical formula was confirmed using the ICP-OES (Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy). The calculated average grain size for powders was in the range of 25 to 90 nm. The luminescence properties of vanadium-substituted hydroxyapatite were evaluated by recording emission spectra and excitation spectra as well as luminescence kinetics. The crucial step of this research was the evaluation of the biocompatibility of the synthesized nanomaterials. Therefore, the obtained compounds were tested toward sheep red blood cells and normal human dermal fibroblast to confirm the nontoxicity and biocompatibility of new nanosized Eu^{3+} ion-doped vanadate-hydroxyapatite. Moreover, the final step of the research allowed us to determine the time dependent ion release to the simulated body fluid environment. The study confirmed cytocompatibility of vanadium hydroxyapatite doped with Eu^{3+} ions.

Table S1. Unit cell parameters (a-c), crystal cell volume (V), as well as refined factor (R_w) for the $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{VO}_4)_x(\text{OH})_2$ (HAVp) and $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{VO}_4)_x(\text{OH})/\text{Ca}_2\text{V}_2\text{O}_7$ (HAVp/CaVO) nanocomposites doped with x mol% Eu^{3+} (where x = 0-2).

Sample	Cell parameters											Phase		
	Hydroxyapatite $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$			calcium pyrovanadate $\text{Ca}_2\text{V}_2\text{O}_7$								HAVp	CaVO	R_w
	a (Å)	c (Å)	V (Å ³)	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	V (Å ³)	(%)	(%)	-	
s. c.	9.424(4)	6.879(4)	529.09(54)	6.6699(6)	6.9197(6)	7.0157(6)	86.39(0)	63.84(0)	83.67(0)	288.83(15)	-	-	-	
1 mol% $\text{Eu}^{3+}:\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{VO}_4)_x(\text{OH})/\text{Ca}_2\text{V}_2\text{O}_7$														
HAVp	9.466(2)	6.898(2)	535.32(53)								100.00		2.10	
x-2	9.484(9)	6.906(2)	538.06(57)	6.6305(8)	6.9364(9)	6.9848(8)	86.33(4)	64.21(8)	84.08(3)	287.66(94)	92.39	7.61	2.15	
x-3	9.509(8)	6.931(9)	542.90(73)	6.6920(4)	6.8877(8)	7.0312(9)	86.54(7)	63.75(3)	83.61(3)	288.85(35)	47.60	52.40	2.30	
x-4	9.523(4)	6.922(7)	543.73(86)	6.6666(4)	6.9201(1)	7.0158(4)	86.55(7)	63.85(7)	83.77(0)	288.81(27)	57.41	42.59	2.28	
x-5	9.519(9)	6.929(0)	543.83(35)	6.6684(6)	6.9220(4)	7.0182(1)	86.51(1)	63.86(5)	83.72(3)	289.06(15)	37.62	62.38	2.00	
CaVO				6.6700(1)	6.9248(5)	7.0211(7)	86.45(5)	63.86(2)	83.68(7)	290.25(11)		100	2.01	
2 mol% $\text{Eu}^{3+}:\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{VO}_4)_x(\text{OH})/\text{Ca}_2\text{V}_2\text{O}_7$														
HAVp	9.465(9)	6.903(0)	536.35(45)								100		2.11	
x-2	9.488(8)	6.911(9)	538.95(27)	6.6702(0)	6.9194(4)	7.0155(4)	86.38(7)	63.84(2)	83.66(9)	288.82(29)	95.10	4.90	2.20	
x-3	9.512(1)	6.924(7)	542.60(58)	6.6631(4)	6.9050(2)	7.0054(2)	86.56(9)	63.89(2)	83.80(3)	287.70(76)	78.20	21.80	2.30	
x-4	9.531(7)	6.931(4)	545.37(14)	6.6763(1)	6.9248(2)	7.0262(7)	86.47(6)	63.83(7)	83.69(3)	289.76(26)	36.56	63.44	2.40	

x – 5	9.489(4)	6.938(2)	541.07(19)	6.6721(5)	6.9238(1)	7.0192(7)	86.47(9)	63.84(4)	83.67(7)	289.26(06)	13.72	86.28	2.35
CaVO				6.6694(7)	6.9242(8)	7.0207(5)	86.45(7)	63.85(6)	83.67(7)	289.25(28)		100	2.03

s. c. – single crystal reference data, Ca₈(PO₄)₃OH – 26204-ICSD, Ca₂V₂O₇ – 421266-ICSD

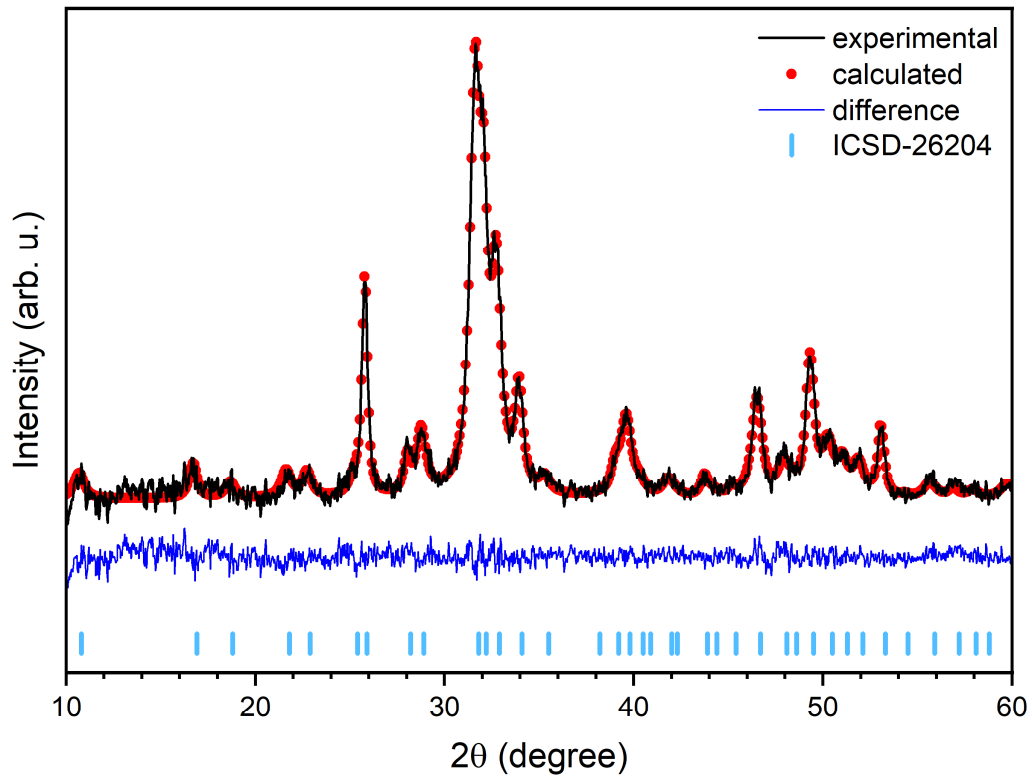


Figure S1. Representative results of the of the 1 mol% Eu^{3+} ion doped $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$, obtained at 600°C , Rietveld analysis (red – fitted diffraction; blue – differential pattern, column – reference phase peak position).

3.2 Praca *“Synthesis and investigation of physicochemical properties and biocompatibility of Tb³⁺ and Sr²⁺ ions co-doped phosphate-vanadate hydroxyapatite”*

Problemem badawczym podjętym w pracy pt. *„Synthesis and investigation of physicochemical properties and biocompatibility of Tb³⁺ and Sr²⁺ ions co-doped phosphate-vanadate hydroxyapatite”* było otrzymanie oraz charakterystyka materiałów o strukturze hydroksyapatytu, współdomieszkowanych jonami Tb³⁺ i Sr²⁺ w których grupa fosforanowa (PO₄³⁻) została podstawiona dwoma grupami wanadanowymi (VO₄³⁻). Jak już wspomniano wanad jest pierwiastkiem biologicznie czynnym, który może być potencjalnie wykorzystywany w terapiach mających na celu szybszą regenerację tkanki kostnej. Jako potencjalny dodatek w ceramicznych wypełnieniach tkankowych może również wpływać na regenerację tkanek towarzyszących takich jak włókna nerwowe towarzyszące tkance kostnej. Podobieństwo grupy wanadanowej VO₄³⁻ do grupy fosforanowej stanowi dobrą okazję do inkorporacji grupy w strukturę związków o strukturze hydroksyapatytu. Wiele badań naukowych potwierdza pozytywne działanie strontu na procesy regeneracji tkanki kostnej oraz indukcję ścieżek metabolicznych wspomagających leczenie urazów kostnych, nawet w przypadku takich schorzeń jak osteoporoza. Taka domieszka wzbogaci syntetyczną ceramikę oraz poprawi jej biogodność tkankową. Syntetyczne apatyty wzbogacone jonami ziem rzadkich wykazują dobre właściwości luminescencyjne i mogą być potencjalnie wykorzystywane do bioobrazowania komórek i tkanek. Natomiast domieszka optycznie czynnego jonu Tb³⁺ stanowi dobrą alternatywę dla innych optycznie czynnych jonów ze względu na swoją charakterystyczną zielono-niebieską emisję, wydłużony czas życia oraz zdolność wzbudzenia zarówno w zakresie UV jak i w zakresie światła widzialnego.

Głównym założeniem pracy było otrzymanie nano-rozmiarowych materiałów fosforanowo-wanadanowych o strukturze hydroksyapatytu (HVp) współdomieszkowanych jonami Tb³⁺ i Sr²⁺. Hydrotermalna metoda syntezy posłużyła do uzyskania krystalicznych materiałów, które następnie zostały poddane obróbce termicznej w trzech różnych przedziałach temperaturowych 500, 600 oraz 700°C przez 3 godziny. Charakterystyka syntetycznych materiałów polegała na analizie wpływu obróbki termicznej na właściwości strukturalne matrycy oraz luminescencyjne jonów Tb³⁺. W ramach realizacji pracy przeprowadzono szereg testów i badań umożliwiających określenie struktury, morfologii matrycy i właściwości luminescencyjnych jonów Tb³⁺. Ze względu na obecność jonów biologicznie czynnych przeprowadzane zostały testy biologiczne umożliwiające analizę cytokompatybilności materiałów z żywymi komórkami.

Podczas realizacji pracy, metodą hydrotermalną otrzymano serię nowych, syntetycznych materiałów o strukturze hydroksyapatytu, gdzie grupa fosforanowa została zastąpiona dwoma grupami wanadanowymi. Materiały domieszkowano jonami Tb³⁺ w ilości 0,5, 1 and 2 mol% oraz jonami Sr²⁺ w

ilości 1 mol% and 2 mol% stężenie domieszki w obu przypadkach w przeliczeniu na zawartości molową jonów Ca^{2+} . Po syntezie materiały zostały oczyszczone, poddane procesowi suszenia przez 48 godzin. Otrzymano fosforanowo-wanadanowe związki o strukturze hydroksyapatytu współdomieszkowane kolejno: 0.5 mol% Tb^{3+} i 1 mol% Sr^{2+} , 0.5 mol% Tb^{3+} i 2 mol% Sr^{2+} , 1 mol% Tb^{3+} i 1 mol% Sr^{2+} , 1 mol% Tb^{3+} i 2 mol% Sr^{2+} , 2 mol% Tb^{3+} i 1 mol% Sr^{2+} , 2 mol% Tb^{3+} i 2 mol% Sr^{2+} . Po obróbce termicznej w trzech różnych temperaturach, materiały zostały podzielone na 4 grupy: nie poddane obróbce termicznej tzw. „*as prepared*”, poddane obróbce termicznej w 500, 600 oraz 700°C a następnie dokładnie przeanalizowane.

Charakterystyka właściwości strukturalnych materiałów o strukturze hydroksyapatytu przeprowadzona była przy użyciu metody proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej (XRPD), skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) wraz z mapowaniem pierwiastków (SEM-mapping), spektroskopii w podczerwieni wykonanej techniką odbiciową (osłabionego całkowitego odbicia ATR-FTIR) oraz technice atomowej spektroskopii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-OES). W celu analizy właściwości optycznych jonów Tb^{3+} w otrzymanych spektroskopii fotoluminescencyjnej. Test cytotoksyczności MTT posłużył do analizy właściwości biologicznych otrzymanych materiałów, a do tego celu użyto dwóch linii komórkowych, NHDF ludzkich fibroblastów skórnych oraz L929 mysich fibroblastów pochodzenia adipocytarnego.

Rentgenowskie dyfraktogramy proszkowe porównane ze wzorcem hydroksyapatytu z bazy danych ICSD (ICSD-253617) potwierdziły otrzymanie heksagonalnej struktury przypisywanej strukturze przestrzennej $P6_3/m$ hydroksyapatytu we wszystkich materiałach. Substytucja izomorficzna zachodzi równolegle w podsieci anionowej oraz kationowej, jednak mimo stosunkowo małych różnic w promieniach atomowych współdomieszkowanych jonów, widoczne były deformacje sieci krystalicznej. Obróbka termiczna wywołała indukcję wzrostu krystaliczności w porównaniu do materiałów „*as prepared*” oraz nie wywołała zmian strukturalnych w próbkach wyżarzanych do 600°C. Wśród materiałów wyżarzanych w 700°C zauważono pojawienie się drugiej fazy pochodzącej od pirowanadanu wapnia. Obraz SEM potwierdza ziarnistość oraz tendencję do tworzenia aglomeratów, natomiast wyniki mapowania-SEM oraz dane uzyskane z pomiarów ICP-OES potwierdzają obecność wszystkich pierwiastków, które w założeniu teoretycznym powinny znajdować się w zaprojektowanych związkach. Wyniki pomiarów emisji, wzbudzenia oraz czasu zaniku luminescencji jonów Tb^{3+} potwierdzają obecność jonów terbu w matrycy. Widma emisji przedstawiają obecności charakterystycznych przejść z poziomu wzbudzonego 5D_4 do poziomów podstawowych 7F_6 , 7F_5 , 7F_4 , 7F_3 po wzbudzeniu długością fali 266 nm we wszystkich badanych materiałach. Wyniki wskazują, że materiały poddane obróbce termicznej w 700°C posiadają mniejszą, w porównaniu do pozostałych badanych próbek, ilość składowych Starkowskich dla przejść 5D_4 do 7F_6 oraz 5D_4 do 7F_3 . Przyczyną może być druga faza pochodząca od pirowanadanu wapnia powstająca podczas obróbki termicznej jak

również defekty pojawiające się w polu krystalicznym, które mogą wpływać na luminescencję jonów Tb^{3+} . Widma wzbudzenia przedstawiają przejścia z poziomu podstawowego 7F_6 do wyżej położonych poziomów wzbudzonych. Obecność grup wanadanowych wpływa na pojawienie się pasma przejścia z przeniesieniem ładunku O^{2-} do V^{5+} . Wyniki uzyskane z pomiarów czasu życia luminescencji przedstawiają nie mono-eksponentialny czas życia dla jonów Tb^{3+} co wskazuje na to, że jony te mogą zajmować różne pozycje krystalograficzne w sieci krystalicznej. W dalszej części pracy grupa związków poddana obróbce termicznej w temperaturze $600^{\circ}C$ została przeanalizowana pod względem właściwości biologicznych. Wyniki testu MTT przeprowadzone na dwóch liniach komórkowych NHDF oraz L929 wyraźnie wskazują na wysoką biokompatybilność materiałów. Największa aktywność metaboliczna obserwowana była szczególnie po 24 godzinnej inkubacji w najwyższym stężeniu $100 \mu g/mL$.

Podsumowując, przedstawione w pracy materiały wykazują dobre właściwości strukturalne oraz luminescencyjne. Materiały w wysokich stężeniach wykazują dobrą biogodność z żywymi komórkami, Dlatego też stanowią obiecującą perspektywę do potencjalnych zastosowań w bioobrazowaniu oraz w medycynie regeneracyjnej.

Article

Synthesis and Investigation of Physicochemical Properties and Biocompatibility of Phosphate–Vanadate Hydroxyapatite Co-Doped with Tb³⁺ and Sr²⁺ Ions

Natalia Charczuk ^{1,*}, Nicole Nowak ^{1,2} and Rafal J. Wiglusz ^{1,*} 

¹ Institute of Low Temperature and Structure Research, Polish Academy of Sciences, Okolna 2, PL-50-422 Wrocław, Poland

² Department of Animal Biostructure and Physiology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida 25, PL-50-375 Wrocław, Poland

* Correspondence: n.charczuk@intibs.pl (N.C.); r.wiglusz@intibs.pl (R.J.W.); Tel.: +48-71-395-41-59 (R.J.W.)

Abstract: Searching for biocompatible materials with proper luminescent properties is of fundamental importance, as they can be applied in fluorescent labeling and regenerative medicine. In this study, we obtained new phosphate–vanadate hydroxyapatites (abbr. HVps) co-doped with Sr²⁺ and Tb³⁺ ions via the hydrothermal method. We focused on examining the effect of various annealing temperatures (500, 600 and 700 °C) on the spectroscopic properties and morphology of the obtained HVps. To characterize their morphology, XRPD (X-ray powder diffraction), SEM-EDS (scanning electron microscopy–energy-dispersive spectrometry), FT-IR (Fourier transform infrared) spectroscopy and ICP-OES (inductively coupled plasma–optical emission spectrometry) techniques were used. A further study of luminescent properties and cytocompatibility showed that the obtained HVps co-doped with Sr²⁺ and Tb³⁺ ions are highly biocompatible and able to enhance the proliferation process and can therefore be potentially used as fluorescent probes or in regenerative medicine.

Keywords: spectroscopy; phosphate–vanadate hydroxyapatite; Tb³⁺ and Sr²⁺ co-doping; hydrothermal method; fluorescent probe; bioimaging



Citation: Charczuk, N.; Nowak, N.; Wiglusz, R.J. Synthesis and Investigation of Physicochemical Properties and Biocompatibility of Phosphate–Vanadate Hydroxyapatite Co-Doped with Tb³⁺ and Sr²⁺ Ions. *Nanomaterials* **2023**, *13*, 457. <https://doi.org/10.3390/nano13030457>

Academic Editors: Csaba Balázsi and Ilaria Armentano

Received: 18 December 2022

Revised: 17 January 2023

Accepted: 19 January 2023

Published: 23 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Synthetic hydroxyapatites (HAp)s show comparable properties to hydroxyapatites, which naturally occur in mammalian bones and teeth [1]. HAp)s are widely used in medicine as a bone fracture filler, dental material and tissue replacement material in compact bone [2,3]. In recent years, there has been extensive research into the use of hydroxyapatites as a matrix for drug delivery systems [4–7].

The feature that makes hydroxyapatites an extremely attractive biomaterials is the ease with which ions can be replaced in their crystal lattice [8,9]. Isomorphous substitution enables the modification of osteoconductive and osteoinductive properties, adjusts the porosity of the material and provides high mechanical strength. The substituents show high value in mineral homeostasis and the metabolic processes of the cells and tissue surrounding hydroxyapatite-based implants [10]. For instance, valuable biological properties can be gained by doping hydroxyapatite with strontium, as it plays a key role in bone mineralization [11,12]. Moreover, strontium ions stimulate bone formation by promoting the proliferation of osteoblasts and reducing bone resorption [13]. Therefore, Sr²⁺ ions stimulate the process of bone regeneration and increase bone mechanical strength [13–15]. Moreover, strontium is used in the form of strontium ranelate (Protelos®) as a drug against osteoporosis [16]. Another profitable substitution concerns the replacement of phosphate by vanadate in the anionic subnetwork of hydroxyapatite. It can result in obtaining unique acid–base catalysts and highly active oxidation catalysts due to the Lewis acidic properties and appropriate redox potential of vanadium [17]. Due to the structural similarity of

vanadate to phosphate, it can take over a regulatory function in cellular processes in which phosphate plays a key role [18,19]. This phenomenon is based on vanadate's interaction with phosphate-dependent enzymes, i.e., phosphatases and kinases [20]. In addition, the substitution of a phosphate group by a vanadate group in hydroxyapatite crystal lattice could inestimably affect its spectroscopic properties [21,22].

Furthermore, HAps doped with rare-element ions showing excellent luminescent properties can be applied in diagnostics as inorganic fluorescent probes [23,24]. Nowadays, Tb^{3+} ions are particularly widely used as dopants because of their spectroscopic properties, including intense (blue or green) luminescence, long decay times and their ability to be excited by both UV and visible radiation [25–27]. Biocompatibility indicates their essential role in biological applications [28,29]. Crucially, HAps doped with terbium ions can be absorbed by living cells [30,31]. As a result, fluorescent labeling involving Tb^{3+} ions enables non-invasive monitoring of the inserted implant or the drug release process.

In recent years, studies have presented incorporation of divalent and trivalent cations into the HA structure [32,33]. Likewise, fluorapatites doped with rare-element ions were recently studied by our research group [34–36]. In addition, there are some studies available in the literature on apatites co-doped with various ions, including hydroxyapatites, chlorapatites, and oxyapatites, with Ln^{3+} ions and additionally built-in silicon or vanadate groups [21,37–39].

In this paper, new phosphate–vanadate hydroxyapatites (abbr. HVp) co-doped with Sr^{2+} and Tb^{3+} ions are presented. Their properties as a potential bioimaging fluorescent probe are further investigated. The structure, morphology and luminescent properties of the obtained materials are examined. Furthermore, biocompatibility tests are carried out.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis Method

New hydroxyapatites co-doped with Tb^{3+} and Sr^{2+} ions with up to two vanadate groups (VO_4) substituted for phosphate groups were synthesized using the hydrothermal method. The concentration of strontium ions was fixed at 1 mol% and 2 mol%; the concentration of Tb^{3+} ions was fixed at 0.5, 1 and 2 mol%—in both cases, in a ratio of calcium ion molar content. Solutions of $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (99.0–103.0% Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA), $Sr(NO_3)_2$ (>99.0% Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA) and $(NH_4)_2HPO_4$ (>99.0% Acros Organics, Schwerte, Germany) were obtained by dissolving a stoichiometric amount of substrate separately in deionized water. NH_4VO_3 ($\geq 99.0\%$ ASC, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) solution was prepared in a microwave reactor (ERTEC MV 02-02) by mixing a stoichiometric amount of powder with deionized water in a Teflon vessel and treatment at 150 °C under a pressure of 8–11 bar for 30 min. A solution of $Tb(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ was prepared by digesting a stoichiometric amount of Tb_4O_7 (99.99% Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA) in HNO_3 ($\geq 65.0\%$, ASC, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The obtained solution was recrystallized four times to remove the excess of HNO_3 . The $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $Sr(NO_3)_2$ and $Tb(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ solutions were mixed, added to the previously amalgamated mixture of $(NH_4)_2HPO_4$ and NH_4VO_3 and placed together into a Teflon vessel. The pH of the solution was adjusted to 9.00 by adding ammonia ($NH_3 \cdot H_2O$ 25% Avantor, Poland). The reaction was carried out in a microwave reactor (ERTEC MV 02-02) at a temperature of 240–250 °C under autogenous pressure (45–50 bar). The reaction time was set to 90 min. The final products were washed out several times with deionized water until the pH was equal to 7.00. The obtained wet powders were dried for 48 h at a temperature of 70 °C, then thermally treated at a temperatures 500, 600 and 700 °C for 3 h.

2.2. Structural Characterization

XRD patterns were recorded using a PANalyticalX'Pert pro x-ray diffractometer (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK) equipped with Ni-filtered Cu $K\alpha$ radiation ($K\alpha_1 = 1.5406$, $U = 40$ kV, $I = 30$ mA) in a 2θ range of 5–70°. The surface morphology and elemental mapping were examined by an FEI Nova NanoSEM 230 scanning electron

microscope equipped with an EDS spectrometer (EDAX PegasusXM4) operating at an acceleration voltage of 3.0 kV and spots at 2.5. An even layer of graphite was sprayed on the samples before observation. The elemental contents were specified using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES; Agilent 720, Santa Clara, CA, USA). The solutions were prepared by dissolving 50 mg of powder in 1 mL of 70% HNO₃ (ASC, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) at a temperature of 120 °C and by adding deionized water to a final volume of 25 mL. The concentrations of Ca, Tb, Sr, P and V were measured using a standard setting and compared with standard curves. The concentrations of Sr, Tb, V and P atoms were measured in solutions diluted 20 times, whereas for Ca, a solution diluted 500 times was used. For the measurements, three parallel samples of the solutions were prepared; they were analyzed by comparison with standard curves in the concentration ranges of 0.05–5.00 mg/mL (for Ca, Sr, Tb and V atoms) and 10–200 mg/mL (for P atoms). The measurements of attenuated total reflectance (ATR-FT-IR) were obtained using a Nicolet iS50 infrared spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The spectra were recorded in the range of 4000–400 cm⁻¹ (mid-IR) with a spectral resolution of 4 cm⁻¹ (32 scans).

2.3. Luminescence Properties

The luminescence kinetics, emission and excitation emission spectra were obtained using an FLS980 fluorescence spectrometer (Edinburgh Instruments, Kirkton Campus, UK). All spectra were recorded at room temperature. For emission and excitation emission measurements, an 450 W Xenon Lamp was used as an excitation source in combination with a visible PMT-980 detector at a spectral resolution of 0.2 nm. The emission spectra were recorded at an excitation wavelength of 266 nm, and excitation emission spectra were recorded by monitoring the signal at 545 nm, which relates to the maximum of emission (⁵D₄→⁷F₅ transition) of Tb³⁺ ions [25–27]. Spectral correction to the detector sensitivity and excitation source intensity was applied for the emission and excitation emission measurements, respectively. A microsecond flash lamp (uF2 250 nm) and a REDPMT 500 nm mirror detector were used to record the luminescence lifetime.

2.4. Biological Properties

2.4.1. Preparation of Sample Suspensions

The obtained powder materials were sterilized under UV light for 30 min. Then, the stocks of nanosized phosphate–vanadate hydroxyapatite co-doped with Tb³⁺ and Sr²⁺ ions were prepared by the suspension of compounds in sterile, distilled water at a concentration of 1 mg/mL. Subsequently, an ultrasonic bath was used to agitate particles in each sample of the colloidal solution (for 1 h at RT). Freshly prepared colloids were additionally sterilized under UV light for 30 min for use in biological experiments.

2.4.2. Cell Culture and Viability Assay

Normal dermal human fibroblast (NHDF-C-12300, Lonza, Basel, Switzerland) and mouse fibroblast (L929, CCL-1, ATCC, Manassas, VA, USA) cell lines were maintained in high-glucose DMEM (4.5 g/mL) without phenol red (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel), which was supplemented with 10% FBS (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel), 2 mM L-glutamine and 25 µg/mL gentamicin (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel). Cell lines were maintained under the standard conditions of 5% CO₂ in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37 °C. NHDF and L929 cells were subcultured once a week with TrypLE solution (Thermo scientific, Waltham, MA, USA, TrypLE™ Express Enzyme (1X), no phenol red, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The cell lines were passaged three times before the experiments were conducted. Moreover, all plastic materials such as serological pipettes, pipette tips, centrifuge falcon tubes, plastic culture flasks and 96-well culture plates were purchased from SPL Life Sciences (Pochon, Republic of Korea).

To evaluate the biocompatibility of the obtained compounds, an MTT viability assay was performed on NHDF and L929. Both types of cells were seeded at a density of 1×10^4 cells per well in a 96-well plate; then, the cells were treated with two series of compounds at three different concentrations: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The incubation time was established as 24 h. After that time, the cells were washed out once with sterile PBS. Then, MTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) solution (0.5 mg/mL) dissolved in sterile PBS was added to the cells. The untreated cells were established as a negative control and for this group, and cell viability was established at 100%. The experiment was carried out under standard conditions of 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ and 95% humidity. After 3 h of incubation, the MTT solution was removed, and formazan crystals were dissolved with isopropanol. Absorbance was read at 570 nm. The experiment was conducted three times. Cell viability was estimated using the following formula:

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \cdot 100$$

3. Results and Discussion

3.1. Characterization of Structure and Morphology

To investigate the crystalline structure of the obtained materials, all the recorded XRD patterns were compared with the reference hydroxyapatite pattern from the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD 253617). The hexagonal structure, which is ascribed to the $\text{P6}_3/\text{m}$ space group of the hydroxyapatites (Figure 1), was confirmed for all compounds [40,41]. However, the peak originating from β -strontium hydrogen phosphate (SrHPO_4 , β -SHP) is visible (Figure 2a–d) but does not affect the HVp properties. [42,43]. In the case of the obtained materials, isomorphic substitution takes place in both the cationic and anionic subnetwork. In the cationic subnetwork, Ca^{2+} ions, the ionic radius of which equals 0.99 Å , are partially replaced by Sr^{2+} ions (1.13 Å) and Tb^{3+} ions (0.923 Å) [44,45]. These Ca^{2+} ions represent two crystallographically independent calcium atoms: Ca(I) and Ca(II). Ca(I) is located at 6h [$xy1 = 4$], with the local symmetry m, while Ca(II) is located at the position 4f [$1/3 2/3 z$], with the local symmetry 4f [46]. Despite minor differences in the values of ionic radii and low dopant concentrations (1 and 2 mol% for Sr^{2+} ions and 0.5, 1 and 2 mol% for Tb^{3+} ions), disturbances in the crystal lattice occurred and manifested as a slight shift in 2θ values and changes in half-width of the peaks [43].

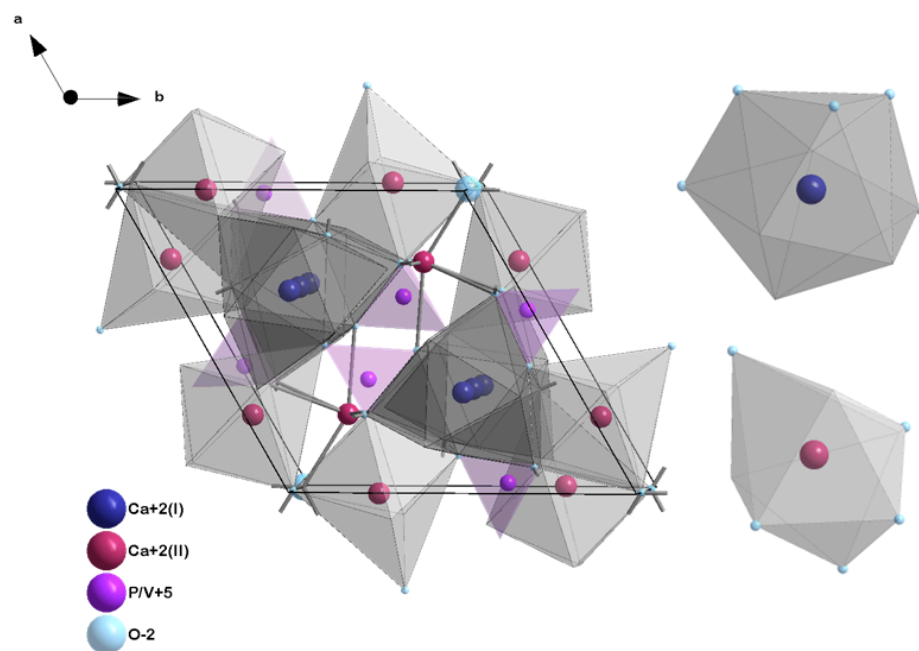


Figure 1. Unit cell of HVp structure. Ca(I) and Ca(II) sites are distinguished, and both Sr^{2+} and Tb^{3+} ions can be located during substitution.

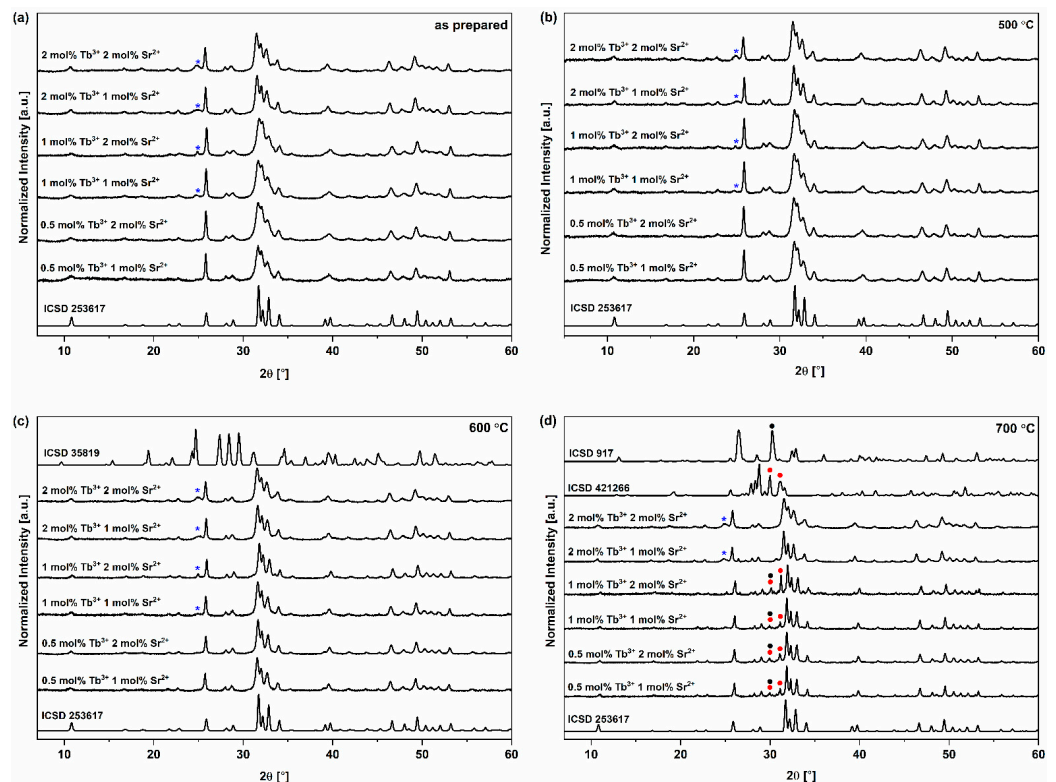


Figure 2. XRD results for the obtained materials: (a) not submitted to thermal treatment (as prepared). (b) annealed at 500 °C. (c) annealed at 600 °C. (d) annealed at 700 °C. The hexagonal structure, which is ascribed to the $P6_3/m$ space group of the HVps, was confirmed for all compounds (a–d). ICSD 253617 is database hydroxyapatite pattern. (*) indicates peaks originating from SrHPO_4 (ICSD 35819). For the materials annealed at 700 °C (d) peaks originating from CaHPO_4 (●, ICSD 917) and $\text{Ca}_2\text{V}_2\text{O}_7$ (●, ICSD 421266) occur in the range of 26–32°.

Furthermore, substitution of Ca^{2+} ions by Tb^{3+} ions is associated with a lack of charge compensation. The failure to equalize the charge within substitution can cause spontaneous compensation (for example, by forming an O^{2-} ion as the second oxygen form next to the OH^- ion), the consequences of which are changes in unit cell parameters [25]. In the case of the anionic subnetwork, there is an isomorphic exchange between the PO_4^{3-} (1.10 Å) and VO_4^{3-} (1.22 Å) ions [47]. The incorporation of larger VO_4^{3-} ions into the HVp crystal lattice results in an increase in the value of lattice parameters and the lattice volume [48]. For the standard hydroxyapatite diffraction pattern (ICSD 253617), peaks in the range of 31–35° mostly originate from the phosphate group [49,50]. For the obtained diffractograms, in comparison to the standard ICSD pattern (Figure 2a–d), the half-width of the mentioned peaks increased. The widening of peaks demonstrates the results of doping the hydroxyapatite with up to two vanadate groups [51].

In the current study, we investigated the impact of various annealing temperatures on the materials. An increase in the temperature in the range of 500–700 °C is correlated with an increase in crystallinity [52,53]. As the annealing temperature increases, the half-width of the peaks decreases (Figure 2a–d). For the thermally untreated samples (as prepared) and the samples annealed at 500 and 600 °C, a single crystallographic phase assigned to the structure of hydroxyapatite is present (with an insignificant portion of the phase derived from β -SHP). However, for the materials annealed at 700 °C, peaks originating from $\text{Ca}_2\text{V}_2\text{O}_7$ (calcium pyrovanadate) and monetite, i.e., anhydrous dicalcium phosphate, are present in the range of 27–32° (Figure 2d) [54,55]. This observation indicates that a temperature up to 600 °C is suitable for annealing phosphate–vanadate hydroxyapatite co-doped with Sr^{2+} and Tb^{3+} ions.

The results of scanning electron microscopy show that the particles tend to agglomerate (Figure 3a). Agglomeration is a natural tendency within HVps synthesized via the hydrothermal method in aqueous solvent [56]. SEM mapping confirms the presence of selected elements, i.e., oxygen, calcium, terbium, strontium, phosphorus and vanadium (Figure 3b). The ICP-OES results are in agreement with the theoretically calculated values (Table 1). For materials doped with 0.5 and 1 mol% Tb^{3+} ions, one phosphate group was substituted by vanadate; however, for materials doped with 2 mol% Tb^{3+} ions, two vanadate groups were incorporated in the hydroxyapatite framework.

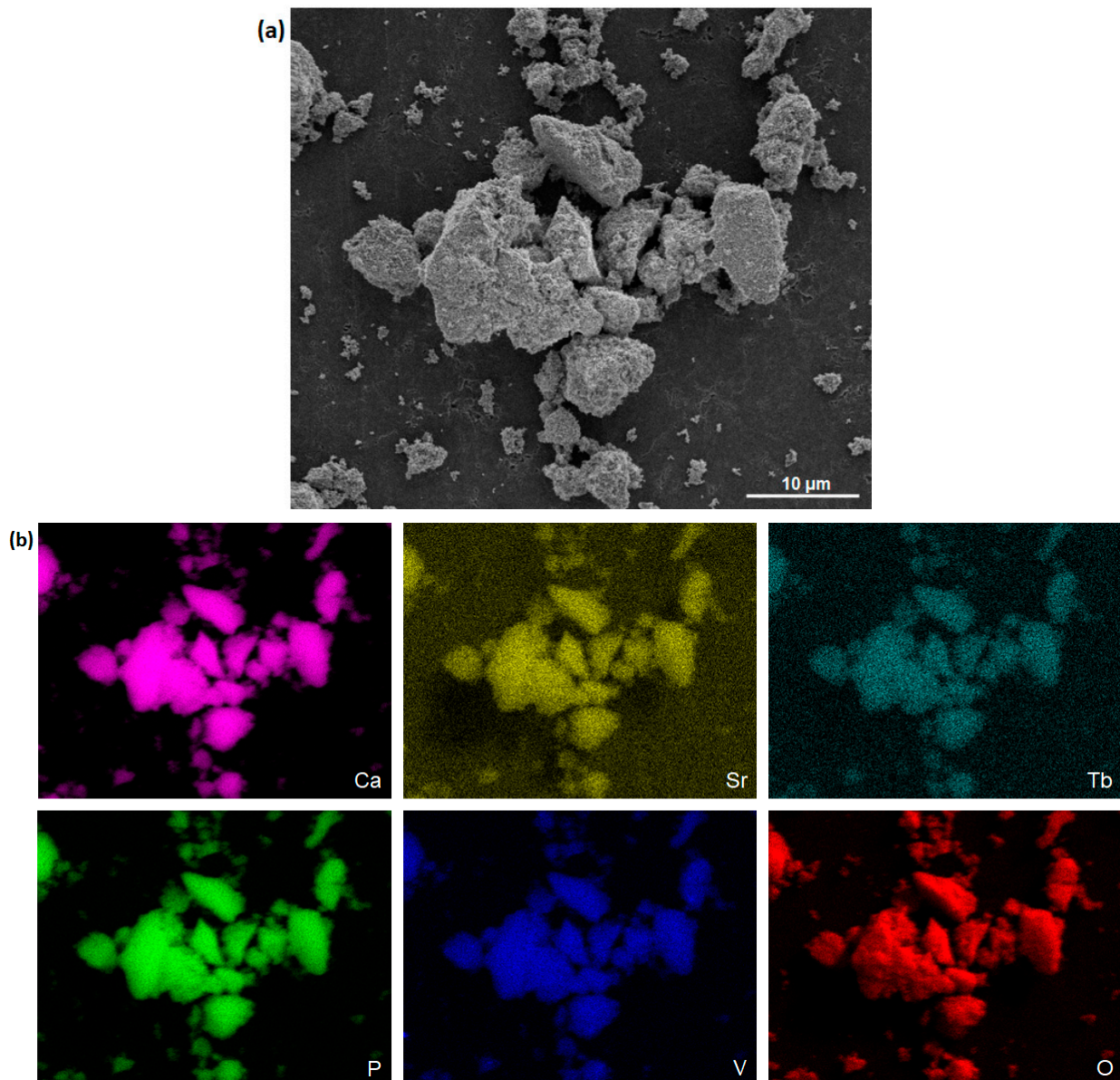
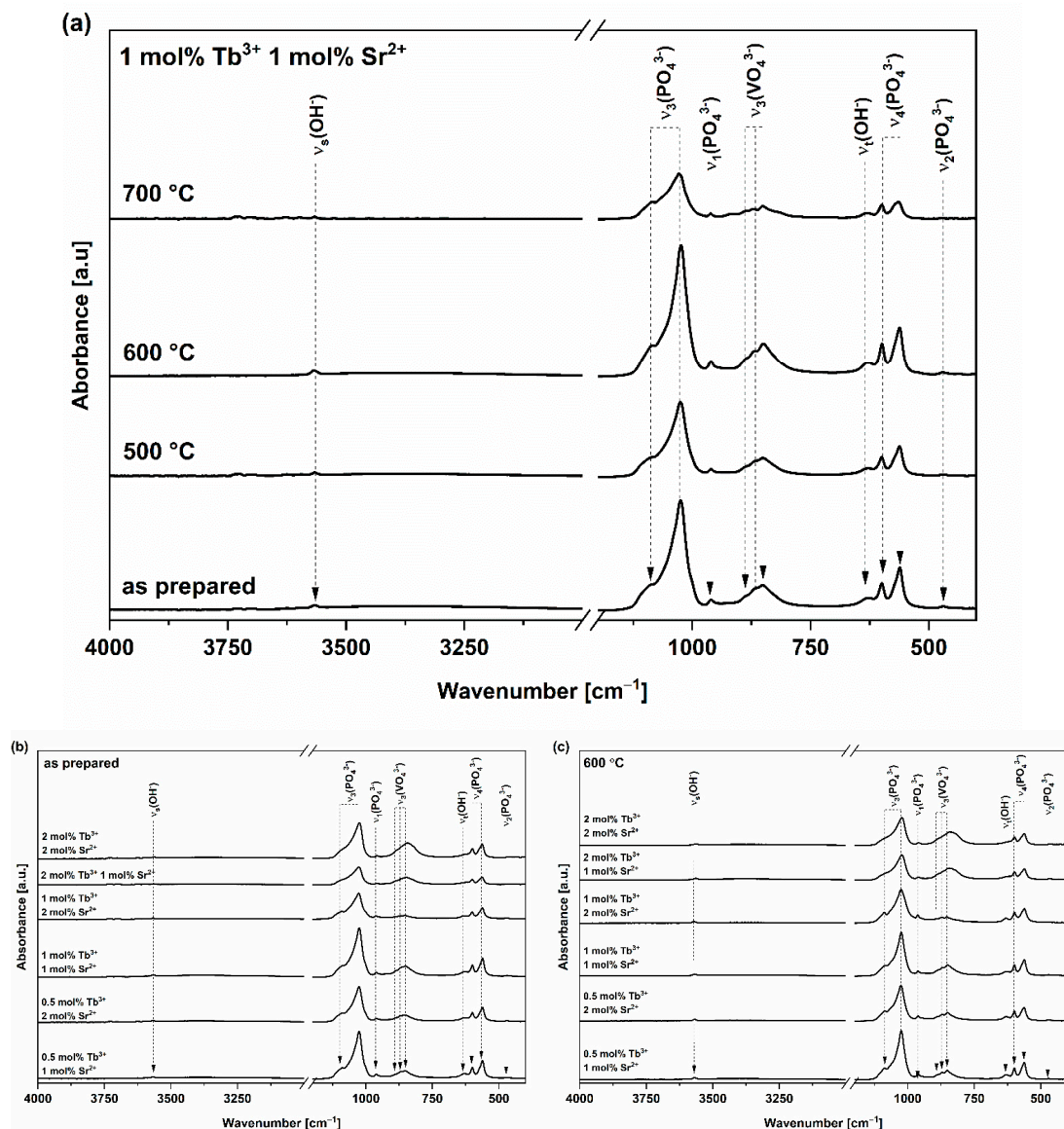


Figure 3. (a) SEM image of HVp co-doped with 1 mol% Sr^{2+} and 1 mol% Tb^{3+} annealed at 700 °C. (b) SEM-EDS elemental mapping of HVp co-doped with 1 mol% Sr^{2+} and 1 mol% Tb^{3+} ions annealed at 700 °C. Images show elemental composition of the sample, which contains calcium, strontium, terbium, phosphate, vanadium and oxygen elements.

In all recorded ATR-FT-IR spectra (Figure 4a–c), bands originating from the phosphate (PO_4^{3-}), vanadate (VO_4^{3-}) and hydroxyl (OH^-) groups are present. Their locations are consistent with the data available in the literature and confirm that the materials have the hexagonal structure of phosphate–vanadate hydroxyapatite [17,19,48,57,58].

Table 1. The elemental contents in the obtained materials (annealed at 600 °C) measured with the ICP-OES technique.

Material	n Ca (mol)	n Tb (mol)	n Sr (mol)	n P (mol)	n V (mol)
$\text{Ca}_{9.85}\text{Sr}_{0.1}\text{Tb}_{0.05}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$	9.85	0.07	0.08	5.34	1.17
$\text{Ca}_{9.75}\text{Sr}_{0.2}\text{Tb}_{0.05}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$	9.78	0.07	0.15	5.26	1.34
$\text{Ca}_{9.8}\text{Sr}_{0.1}\text{Tb}_{0.1}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$	9.82	0.14	0.05	5.11	1.41
$\text{Ca}_{9.7}\text{Sr}_{0.2}\text{Tb}_{0.1}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$	9.69	0.15	0.16	5.72	1.13
$\text{Ca}_{9.7}\text{Sr}_{0.1}\text{Tb}_{0.2}(\text{PO}_4)_4(\text{VO}_4)_2(\text{OH})_2$	9.68	0.24	0.08	4.54	2.00
$\text{Ca}_{9.6}\text{Sr}_{0.2}\text{Tb}_{0.2}(\text{PO}_4)_4(\text{VO}_4)_2(\text{OH})_2$	9.60	0.23	0.17	4.35	2.10

**Figure 4.** (a) ATR-FT-IR spectra of HVp co-doped with 1 mol% Sr^{2+} and 1 mol% Tb^{3+} ions: sample thermally untreated (as prepared) and annealed at 500, 600 and 700 °C. (b,c) ATR-FT-IR spectra recorded for (b) thermally untreated materials (as prepared) and (c) materials annealed at 600 °C.

In the case of the spectra (Figure 4a) measured for the material co-doped with 1 mol% Tb^{3+} and 1 mol% Sr^{2+} annealed at 600 °C, the bands characteristic of the phosphate group are located at 560, 600, 960, 1024 and 1086 cm^{-1} [17]. The bands at 560 cm^{-1} and 600 cm^{-1}

can be assigned to the triple-degenerated stretching mode, $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$. The band at 960 cm^{-1} originates from the non-degenerated symmetric stretching mode, $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ [59]. The 1024 cm^{-1} and 1086 cm^{-1} bands correspond to the triple-degenerated antisymmetric stretching mode, $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ [59]. The vanadate group is represented by the bands at 849, 870 and 887 cm^{-1} , which originate from the symmetrical stretching mode, $\nu_3(\text{VO}_4^{3-})$ [60,61]. Additionally, a band with an assignment that is not straightforward appears at 469 cm^{-1} . In the $400\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ range, bands can be attributed to modes originating from both phosphate and vanadate groups. The reason for this is an overlap of bands originating from $\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$, $\nu_2(\text{VO}_4^{3-})$ and $\nu_4(\text{VO}_4^{3-})$ modes [19]. The presence of the hydroxyl group is confirmed by the presence of the bands at 630 and 3567 cm^{-1} [62,63]. A band originating from the symmetrical stretching mode of the hydroxyl group is present at 3567 cm^{-1} , whereas the band originating from the torsion mode of the hydroxyl group is present at 630 cm^{-1} . The torsion mode corresponds to the rotation of a hydrogen atom around the C axis in the apatite crystal lattice (libration band) [64]. Both bands are characterized by relatively low intensity. For the material not thermally treated (as prepared) and materials annealed at 500, 600 and $700\text{ }^\circ\text{C}$, the positions of the bands do not differ significantly (Table 2). This feature implies that the temperature does not have a major effect on wavenumber shifts.

Table 2. Band frequencies and assignment for the ATR-FT-IR spectra of HVp co-doped with 1 mol% Sr^{2+} and 1 mol% Tb^{3+} ions: samples thermally untreated (as prepared) and annealed at 500, 600 and $700\text{ }^\circ\text{C}$.

As Prepared	Frequencies (cm^{-1})			Mode
	500 $^\circ\text{C}$	600 $^\circ\text{C}$	700 $^\circ\text{C}$	
470	468	469	-	$\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$ $\nu_2(\text{VO}_4^{3-})$ $\nu_4(\text{VO}_4^{3-})$
560	563	560	562	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$
601	601	600	600	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$
631	632	630	633	$\nu_t(\text{OH}^-)$
850	850	849	850	$\nu_3(\text{VO}_4^{3-})$
869	869	870	871	$\nu_3(\text{VO}_4^{3-})$
887	888	887	888	$\nu_3(\text{VO}_4^{3-})$
962	962	960	962	$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$
1023	1024	1024	1026	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$
1086	1088	1086	1087	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$
3566	3566	3567	3566	$\nu_s(\text{OH}^-)$

Band shifts and intensity changes can be observed in the ATR-FT-IR spectra recorded for both thermally untreated samples and samples annealed at $600\text{ }^\circ\text{C}$ (Figure 4b,c). According to the results of the ICP-OES analysis (Table 1), only in the case of the materials doped with 2 mol% Tb^{3+} , two vanadate groups were incorporated into the hydroxyapatite crystal lattice. In the ATR-FT-IR spectra recorded for those samples, the intensity of the bands with origins assigned to the vanadate group is higher than for the other materials, in which only one vanadate group is present. The intensity increment for the bands originating from vanadate stretching modes (ν_3) correlates with a decrease in the intensity of the phosphate stretching modes (ν_3) (Figure 4b,c). Furthermore, the spectra show the shift ($\sim 5\text{ cm}^{-1}$) of the bands originating from the vanadate stretching modes ($\nu_3(\text{VO}_4^{3-})$) towards the lower wavenumber values. The change in the position and intensity of the bands is related to their widening, which implies a lower level of crystallinity of compounds with two built-in vanadate groups [60,61]. Moreover, there are reports in the literature on shifts in the selected bands caused by changes in the content of vanadate groups [17,48]. An

example of this phenomenon is the shift of $\nu_s(\text{OH}^-)$ towards lower wavenumber values with a simultaneous increase in the content of vanadates [17,48]. Nevertheless, in the case of the analyzed compounds, there is an insignificant difference in the position of this band (the band is located at 3566 cm^{-1} for materials with one vanadate group and at 3565 cm^{-1} for materials with two vanadate groups).

3.2. Investigation of Luminescence Properties

The examination of luminescent properties of the obtained materials confirms the presence of Tb^{3+} ions. Good-quality spectra were recorded for phosphate–vanadate hydroxyapatite co-doped with Sr^{2+} and Tb^{3+} ions, for which terbium concentrations were fixed at 0.5, 1 and 2 mol% in a ratio of calcium ion molar content. Emission spectra were recorded upon excitation at 266 nm, and excitation emission spectra were recorded by monitoring the signal at 545 nm, which relates to the maximum of emission ($^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_5$ transition) of Tb^{3+} ions [25–27].

In the excitation emission spectra of the obtained materials, the peaks characteristic of Tb^{3+} ions are present (Figure 5). The origin of the peaks in the near-UV energy range is related to the possibility of the occurrence of interconfigurational and charge–transfer transitions, as well as defects present in the hydroxyapatite crystal lattice, resulting in the absorption of radiation by the matrix, which, in this case, plays the role of a sensitizer (or, more likely, the appearance of a self-activated HAp fluorescence) [65,66]. The occurrence of self-activating HAp fluorescence is caused by (i) crystal defects, such as Ca^{2+} , O^{2-} and OH^- vacancies; (ii) isomorphic substitution, as well as the presence of impurities; (iii) asymmetry of the structure caused by the changes in the length and the angle of Ca–O and P–O bonds [67–69]. These factors are induced by the thermal treatment of the material and the manipulation of the pH during synthesis. Moreover, the exposure of the material to high-energy radiation increases the probability of excitation of the HAp matrix. The absorbed radiation can then be transferred to the activator ion (in this case, the Tb^{3+} ion), which allows emission to be observed. Nonetheless, in the case of the analyzed materials, CT within the vanadate group ($\text{O}^{2-} \rightarrow \text{V}^{5+}$) and/or the interconfigurational transitions ($4f^8 \rightarrow 4f^7 5d^1$) of Tb^{3+} ions are more likely to be responsible for the presence of the discussed peaks. These transitions are allowed by the selection rules, which explains the wide half-width of the peaks and their high intensity. However, the bands present in the indicated range are overlapping, which impedes a straightforward distinction of their origin. As previously established, the host matrix has a strong influence on the position of the peaks originating from the $4f^8 \rightarrow 4f^7 5d^1$ transitions of Tb^{3+} ions [70]. In the case of the obtained materials, the band at $\lambda = 250\text{ nm}$ may originate from the transition of the electron to the low-spin $5d^1$ state. In addition, a band of low intensity can be observed in the spectra located at $\lambda = 317\text{ nm}$. Its origin is related to the forbidden transition from the $4f^8$ orbital to the high-spin $5d^1$ state. Changes in the strength and symmetry of the local crystal field surrounding the activator ions, which are implied by its chemical environment, significantly affect the selection rules for the electronic transitions of Tb^{3+} ions, which enables their relaxation and, as a consequence, the occurrence of such a band in the spectra. Charge–transfer transition can also take place within the hydroxyapatite matrix in the vanadate group ($\text{O}^{2-} \rightarrow \text{V}^{5+}$; the electron is transferred from the 2p orbital of oxygen to the 3d orbital of vanadium). The peaks originating from $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{V}^{5+}$ CT should occur in higher wavenumbers than $4f^8 \rightarrow 4f^7 5d^1$ transitions of Tb^{3+} ions because less energy is required to observe the CT VO_4 transitions ($^1\text{A}_1 \rightarrow ^1\text{T}_1, ^2\text{T}_2$) (the energy gap between the terms is smaller than in the case of f–d transitions) [71]. Nevertheless, the positions of the peaks are strongly dependent on the type and nature of the ligands surrounding the V^{5+} ion and on the interaction of ions in the crystal lattice [22]. When analyzing the position of the CT transition bands, as in the case of interconfigurational transitions, it should be taken into account that this parameter is influenced by many factors, including the local environment of ions and the nature of their mutual interactions in a crystal lattice. Moreover, Tb^{3+} ions

may occupy more than one crystallographic position in the HVp crystal lattice and may also show several types of interactions with other ions.

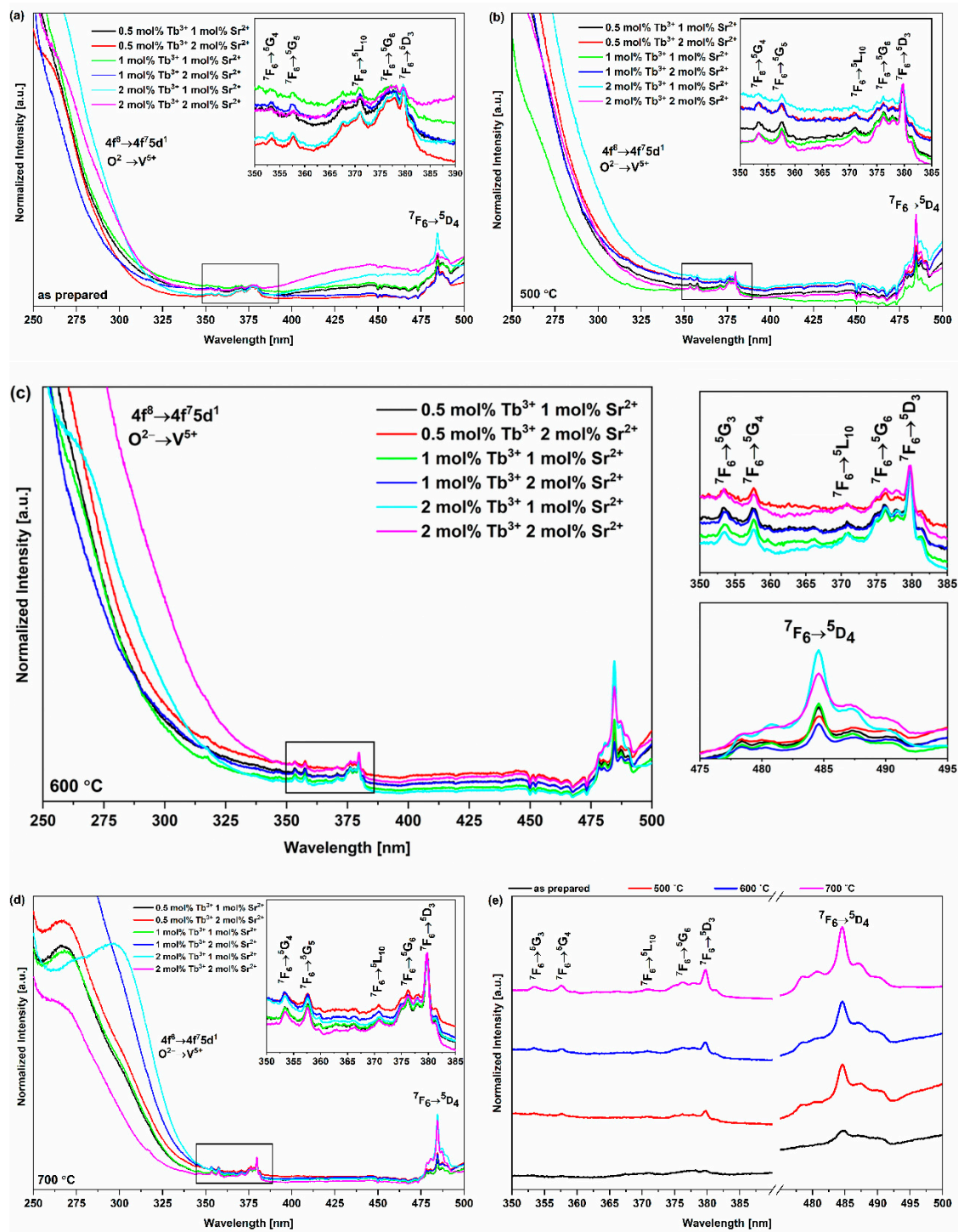


Figure 5. Excitation emission spectra of (a) thermally untreated materials (as prepared), (b) materials annealed at 500 °C, (c) materials annealed at 600 °C (d) materials annealed at 700 °C and (e) material co-doped with 2 mol% Sr²⁺ and 2 mol% Tb³⁺, at an observation wavelength of 545 nm (⁵D₄→⁷F₅ transition). The peak visible in the near-UV region originates from CT within the vanadate group (O²⁻→V⁵⁺) and/or interconfigurational transitions (4f⁸→4f⁷5d¹) of Tb³⁺ ions. The peaks originating from 4f-4f intraconfigurational transitions of Tb³⁺ ions represent ⁷F₆→⁵G₄ (353 nm), ⁷F₆→⁵G₅ (358 nm), ⁷F₆→⁵L₁₀ (370 nm), ⁷F₆→⁵G₆ (376 nm), ⁷F₆→⁵D₃ (380 nm) and ⁷F₆→⁵D₄ (485 nm) transitions.

In the visible radiation range of the spectra, there are peaks related to forbidden 4f-4f intraconfigurational transitions of Tb^{3+} ions: ${}^7F_6 \rightarrow {}^5G_4$ (353 nm), ${}^7F_6 \rightarrow {}^5G_5$ (358 nm), ${}^7F_6 \rightarrow {}^5L_{10}$ (370 nm), ${}^7F_6 \rightarrow {}^5G_6$ (376 nm), ${}^7F_6 \rightarrow {}^5D_3$ (380 nm) and ${}^7F_6 \rightarrow {}^5D_4$ (485 nm). Moreover, the peak originating from the ${}^7F_6 \rightarrow {}^5D_4$ transition is split up into five Stark components. Furthermore, in the examined emission excitation spectra, there is a region of reabsorption ($\lambda = 450$ nm and 472 nm) connected to the presence of vanadate groups in the hydroxyapatite. Molecular orbitals 3d of V^{5+} ions have T_d symmetry and are described as the crystal field levels: the ground state 1A_1 and the excited states 1T_1 , 1T_2 , 3T_1 and 3T_2 [72]. For T_d symmetry, according to the spin selection rule, the transfer of the electron from the ground state level to the excited states 1T_1 and 1T_2 is allowed, whereas the transitions ${}^1A_1 \rightarrow {}^3T_1$, 3T_2 and emission (3T_1 , ${}^3T_2 \rightarrow {}^1A_1$) are forbidden. However, when the ideal symmetry is disturbed, it is possible for forbidden processes to take place [22]. During excitation, the charge is transferred from the nondegenerate 1A_1 state to the triple-degenerate excited states (xT_y , where $x = 1$ or 3 and $y = 1$ or 2). Then, during emission, the energy is transferred radially to the ground-state level, which may result in the appearance of peaks in the indicated range in the spectra.

Tb^{3+} ions show strong blue (in the range of 370–480 nm; ${}^5D_3 \rightarrow {}^7F_J$ transitions) or green (in the range of 470–720 nm; ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_J$ transitions) luminescence [26]. The obtained emission spectra (Figure 6) show four peaks characteristic of Tb^{3+} ions originating from the ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_J$ transitions ($J = 3, 4, 5, 6$) [73–75]. Because the values of J for Tb^{3+} ions satisfy the $2J + 1$ rule, the levels undergo Stark splitting and are therefore split into sublevels under the influence of the crystal field, causing peaks to be divided into components. This suggests that the terbium ions occupy different crystallographic positions, in addition to highlighting the importance of the influence of the host matrix on its spectroscopic properties [76]. As shown in Figure 6, the number of Stark components varies in the spectra depending on the annealing temperature. For thermally untreated materials (as prepared), as well as the series annealed at 500 and 600 °C, the spectra are similar. The first peak is split into three components at 485, 490 and 495 nm and corresponds to the ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_6$ transition. The peak of the highest intensity (${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ transition) responsible for the green luminescence of Tb^{3+} ions appears in the spectra at 545 nm [77]. This peak consists of two incompletely separated components. The peak originating from the ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_4$ transition has two Stark components at 583 and 590 nm. The ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_3$ transition is responsible for the appearance of a peak split into three components ($\lambda = 615, 619$ and 623 nm) in the case of a series of materials not subjected to heat treatment (as prepared) and annealed at 500 °C and for the appearance of one component in the case of the series annealed at 600 °C ($\lambda = 622$ nm). However, the material co-doped with 1 mol% Tb^{3+} and 2 mol% Sr^{2+} differs from the described dependency, as its peaks originating from ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_6$ and ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ transitions split into two and one component, respectively. In the case of the series annealed at 700 °C, the spectra differ from the spectra recorded for the other series; moreover, they differ within the series. Within the series, as the concentration of Tb^{3+} ions increases, the number of Stark components increases simultaneously. Differences occur between materials doped with 0.5 or 1 mol% and materials doped with 2 mol% of Tb^{3+} ions. For the materials doped with 0.5 or 1 mol%, the peak originating from ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_6$ splits into one ($\lambda = 490$ nm) or two components ($\lambda = 485$ nm i 490 nm), whereas the peaks originating from ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_3$ do not split ($\lambda = 622$ nm). For materials doped with 2 mol% Tb^{3+} ions, these peaks split into two components ($\lambda = 485$ i 490 nm) for $Ca_{9.7}Sr_{0.1}Tb_{0.2}(PO_4)_4(VO_4)_2(OH)_2$ or four components ($\lambda = 485, 488, 491, 496$ nm) for $Ca_{9.6}Sr_{0.2}Tb_{0.2}(PO_4)_4(VO_4)_2(OH)_2$ (${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_6$ transition) and three components ($\lambda = 615, 619, 623$ nm) for peaks originating from the ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_3$ transition. Additionally, for the material co-doped with 2 mol% Tb^{3+} and 2 mol% Sr^{2+} , the peak originating from the ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ transition splits into three components ($\lambda = 543, 546, 549$ nm), whereas for the other compounds, there are only two components ($\lambda = 543$ i 546 nm). Nonetheless, the characteristic of the peak originating from the ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_4$ transition is consistent within all the series. In general, for the series annealed at 700 °C, the number of Stark components for ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_6$ and ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_3$ transitions is smaller than

for the other series (except for the mentioned HVp co-doped with 2 mol% Tb^{3+} and 2 mol% Sr^{2+}). In all probability, the annealing temperature could be responsible for this phenomenon. Because the materials annealed at 700 °C do not contain a single phase, their crystallographic properties and the impact of their crystal field on terbium ions may fluctuate, which directly influences the formation of Stark components.

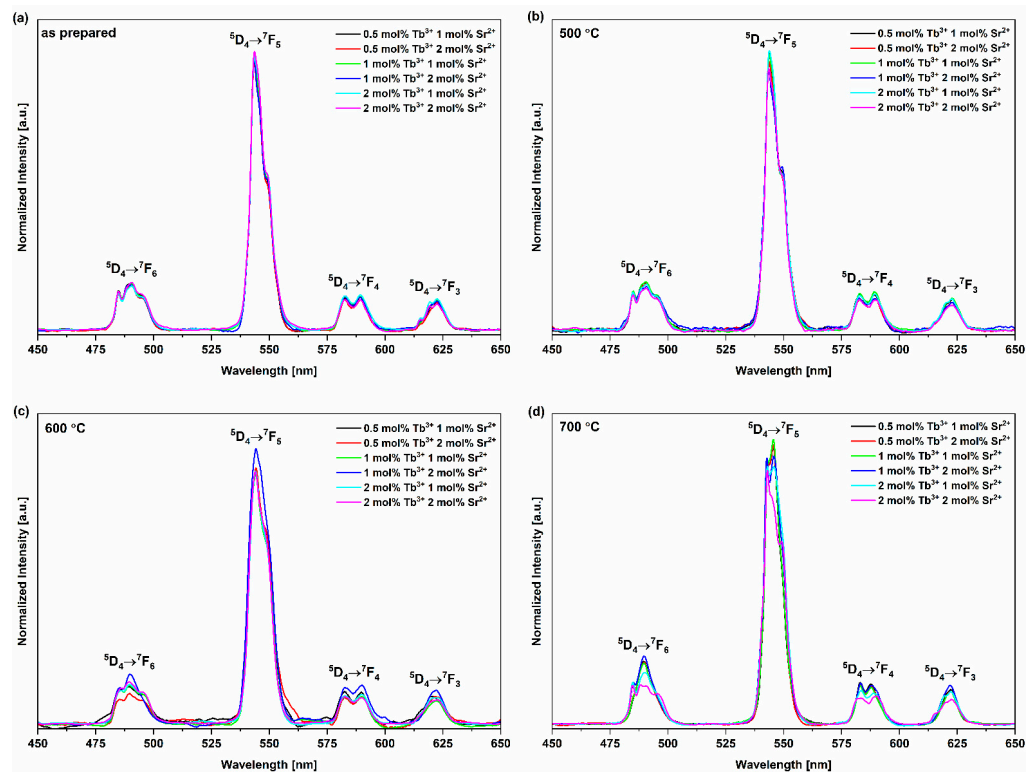


Figure 6. Emission spectra of series (a) thermally untreated (as prepared), (b) annealed at 500 °C, (c) annealed at 600 °C and (d) annealed at 700 °C at an excitation wavelength of 266 nm. There are four peaks characteristic of Tb^{3+} ions originating from 4f-4f intraconfigurational $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_j$ ($j=3,4,5,6$) transitions. The number of Stark components varies in the spectra depending on the annealing temperature.

Figure 7 shows the decrease in fluorescence intensity (proportional to the quantity of excited molecules) as a function of time measured in milliseconds. In the case of the obtained materials, fluorescence decay is not monoexponential. This may suggest that Tb^{3+} ions occupy more than one position in the crystal lattice of HVps [78]. Furthermore, for all materials, the average decay time was determined to range from 1.41 to 2.77 ms (Table 3). No dependence of the annealing temperature on the fluorescence decay time was observed. Moreover, the increase in the value of vanadate groups incorporated into the HVps did not cause the quenching of the fluorescence intensity of Tb^{3+} ions.

Table 3. The average fluorescence decay time for obtained materials measured in milliseconds.

Material	Decay Time (ms)			
	As Prepared	500 °C	600 °C	700 °C
$\text{Ca}_{9.85}\text{Sr}_{0.1}\text{Tb}_{0.05}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$	2.42	2.47	1.61	1.69
$\text{Ca}_{9.75}\text{Sr}_{0.2}\text{Tb}_{0.05}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$	2.40	2.50	1.73	1.64
$\text{Ca}_{9.8}\text{Sr}_{0.1}\text{Tb}_{0.1}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$	2.71	2.59	1.82	1.49
$\text{Ca}_{9.7}\text{Sr}_{0.2}\text{Tb}_{0.1}(\text{PO}_4)_5(\text{VO}_4)_1(\text{OH})_2$	2.17	1.79	1.70	1.66
$\text{Ca}_{9.7}\text{Sr}_{0.1}\text{Tb}_{0.2}(\text{PO}_4)_4(\text{VO}_4)_2(\text{OH})_2$	2.69	2.66	1.97	1.41
$\text{Ca}_{9.6}\text{Sr}_{0.2}\text{Tb}_{0.2}(\text{PO}_4)_4(\text{VO}_4)_2(\text{OH})_2$	2.77	2.63	2.10	1.93

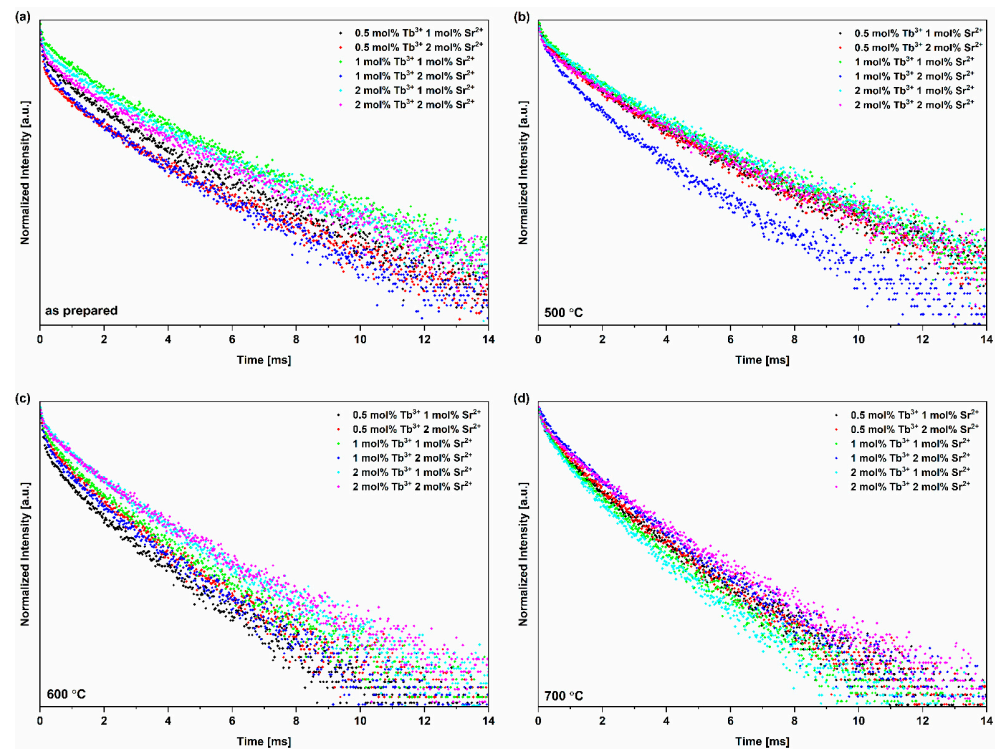


Figure 7. Fluorescence decay time of series (a) thermally untreated (as prepared), (b) annealed at 500 °C, (c) annealed at 600 °C and (d) annealed at 700 °C at an excitation wavelength of 266 nm and an observation wavelength of 545 nm ($^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ transition). For all obtained materials, the fluorescence decay is not monoexponential.

3.3. Evaluation of Biological Properties

Biocompatibility of Obtained Compounds

The results clearly indicate that the obtained compounds exhibit biocompatible properties toward the NHDF and L929 cell lines (Figure 8). The cell viability of the L929 cell line after 24 h of incubation with various concentrations of the tested materials is maintained above 100% compared with the control group. The L929 cell line preferred less concentrated colloidal solutions (10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) than more concentrated solutions. Nevertheless, when cells were treated with the most highly concentrated solution, cell viability was still maintained around 120%, especially for compounds containing dopant concentration of 0.5 mol% Tb^{3+} and 1 mol% Sr^{2+} , 1 mol% Tb^{3+} and 1 mol% Sr^{2+} , 2 mol% Tb^{3+} and 1 mol% Sr^{2+} , and 2 mol% Tb^{3+} and 2 mol% Sr^{2+} . However, one exception was observed when L929 cells were treated with HVP co-doped with 0.5 mol% Tb^{3+} and 2 mol% Sr^{2+} . The more concentrated the colloidal solution, the fewer viable cells were observed; however, compared with the control group, cell viability was maintained at 100% or more. A slightly different situation was observed for the NDHF cell line. The repetitive tendency of a low cell proliferation rate was observed when cells were treated with the lowest concentration (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), especially for the sample co-doped with 0.5 mol% Tb^{3+} and 1 mol% Sr^{2+} and the sample co-doped with 2 mol% Tb^{3+} and 2 mol% Sr^{2+} . However, the more concentrated the colloidal solution, the more viable cells were observed. This trend was observed among all tested colloidal solutions of phosphate–vanadate hydroxyapatite co-doped with Tb^{3+} and Sr^{2+} ions. Furthermore, excellent results were achieved when the NHDF cell line was treated with the highest tested concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results for this cell line indicate that the obtained compounds are highly compatible and able to enhance the proliferation process. In conclusion, all tested compounds showed biocompatible properties toward normal cell lines NDHF and L929. The results indicate that the obtained compounds can be further investigated as bioimaging probes, even for in vivo tests.

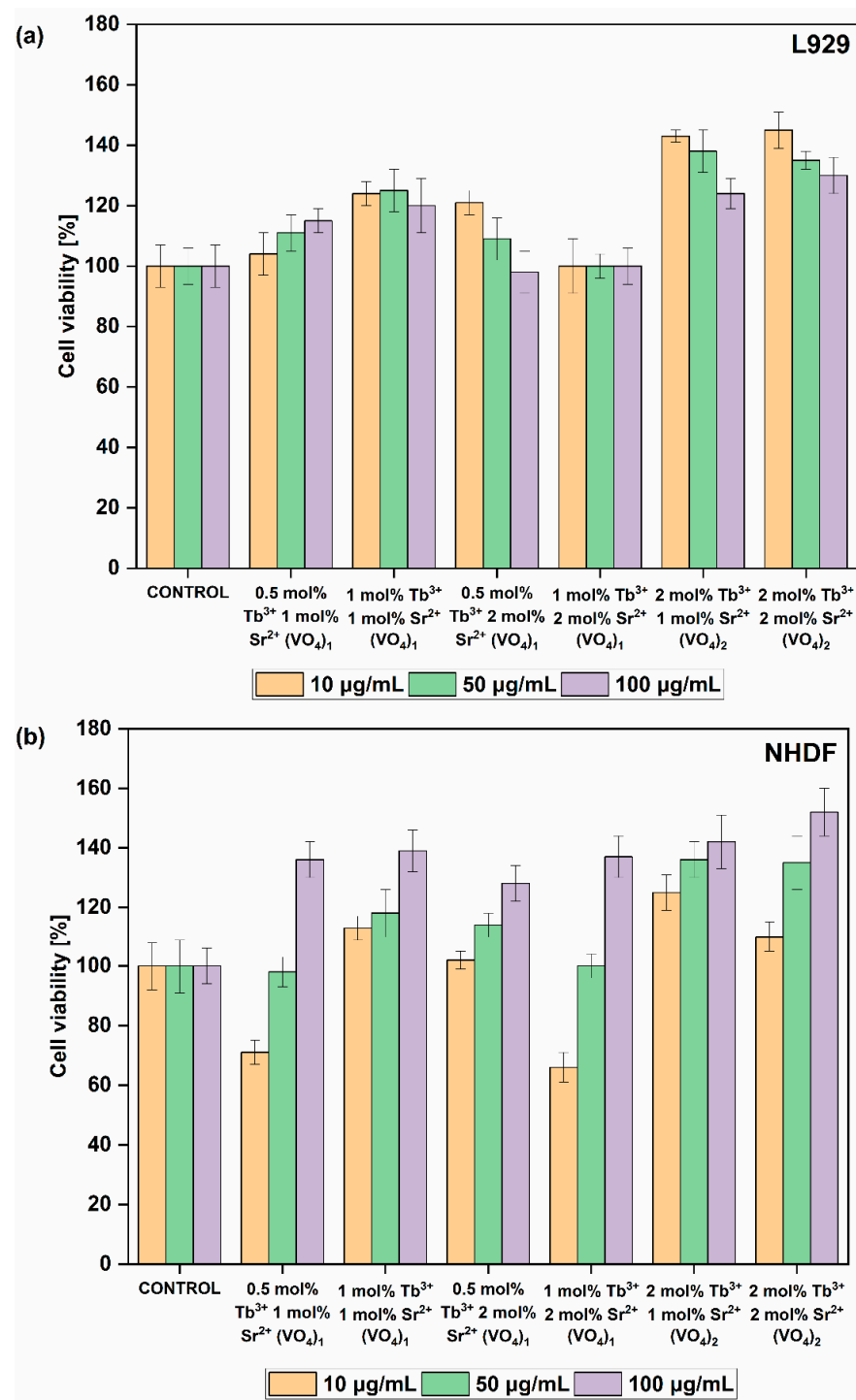


Figure 8. MTT cytotoxicity assay of phosphate–vanadate hydroxyapatite co-doped with Tb³⁺ and Sr²⁺ ions. The final concentrations of the tested compounds were established at 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL. Cell lines used in the experiment were (a) L929 and (b) NHDF cells.

4. Conclusions

New compounds with the structure of phosphate–vanadate hydroxyapatite co-doped with Sr²⁺ and Tb³⁺ ions were obtained by a hydrothermal method. The dopant concentration was set at 1 or 2 mol% for Sr²⁺ ions and 0.5, 1 or 2 mol% for Tb³⁺ ions and confirmed by the ICP-OES technique. Furthermore, XRD analysis confirmed the hexagonal structure of hydroxyapatite (*P6₃/m* group). As a result of increasing annealing temperature, an increase in the degree of crystallinity of the studied materials was observed (comparing the series

not subjected to heat treatment with those annealed at 500, 600 and 700 °C). Moreover, annealing at 700 °C caused the formation of additional chemical compounds. In this case, a temperature of 600 °C is optimal for heat treatment. The presence of PO_4^{3-} , VO_4^{3-} and OH^- groups was determined by ATR-FT-IR analysis. The characteristics of the bands originating from the $\nu(\text{VO}_4^{3-})$ modes were influenced by an increase in the number of built-in vanadate groups. The obtained materials showed spectroscopic properties characteristic of Tb^{3+} ions. In the case of emission excitation spectra, a peak related to the charge–transfer transition of the vanadate group ($\text{O}^{2-} \rightarrow \text{V}^{5+}$) and/or the $4f^8 \rightarrow 4f^7 5d^1$ inter-configurational transition of Tb^{3+} ions was present. In addition, low-intensity peaks from $f-f$ Tb^{3+} intraconfigurational transitions were observed. The emission spectra showed four peaks originating from $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_j$ transitions, where $j = 3, 4, 5, 6$. The decay of fluorescence in the case of the studied materials was not monoexponential, and the lifetimes were in the range of 1.41–2.77 ms. All obtained materials (series annealed at 600 °C) showed a positive effect on L929 and NDHF cells and enhanced the process of proliferation. Moreover, the tested materials were biocompatible with the selected L929 and NDHF cell lines. The best biological properties for both cell lines were obtained for the materials doped with 2 mol% Tb^{3+} ions with two built-in vanadate groups.

In conclusion, the obtained phosphate–vanadate hydroxyapatite material co-doped with Sr^{2+} and Tb^{3+} ions are expected to be evaluated in future investigations as bioimaging probes, even for in vivo tests. Overall, the presented materials show promising physico-chemical properties for potential bioimaging applications.

Author Contributions: Conceptualization, R.J.W.; methodology, N.C., N.N. and R.J.W.; software, N.C. and N.N.; validation, N.C., N.N. and R.J.W.; formal analysis, N.C. and N.N.; investigation, N.C., N.N. and R.J.W.; resources, N.C. and R.J.W.; data curation, N.C., N.N. and R.J.W.; writing—original draft preparation, N.C., N.N. and R.J.W.; writing—review and editing, N.C., N.N. and R.J.W.; visualization, N.C. and N.N.; supervision, R.J.W.; project administration, R.J.W.; funding acquisition, R.J.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors would like to acknowledge the National Science Centre Poland (NCN) for financial support within the Project ‘Biocompatible materials with theranostics’ properties for precision medical application’ (No. UMO-2021/43/B/ST5/02960).

Data Availability Statement: Data are available from the authors upon request.

Acknowledgments: We are grateful to E. Bukowska for XRPD measurements and to D. Szymanski for SEM-EDS spectra.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Szcześ, A.; Hołysz, L.; Chibowski, E. Synthesis of Hydroxyapatite for Biomedical Applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *249*, 321–330. [[CrossRef](#)]
2. Zakaria, S.M.; Sharif Zein, S.H.; Othman, M.R.; Yang, F.; Jansen, J.A. Nanophase Hydroxyapatite as a Biomaterial in Advanced Hard Tissue Engineering: A Review. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2013**, *19*, 431–441. [[CrossRef](#)]
3. Venkatesan, J.; Kim, S.K. Nano-Hydroxyapatite Composite Biomaterials for Bone Tissue Engineering—A Review. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 3124–3140. [[CrossRef](#)]
4. Srivastav, A.; Chandanshive, B.; Dandekar, P.; Khushalani, D.; Jain, R. Biomimetic Hydroxyapatite a Potential Universal Nanocarrier for Cellular Internalization & Drug Delivery. *Pharm. Res.* **2019**, *36*, 60. [[PubMed](#)]
5. Mondal, S.; Dorozhkin, S.V.; Pal, U. Recent Progress on Fabrication and Drug Delivery Applications of Nanostructured Hydroxyapatite. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2018**, *10*, e1504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Rauschmann, M.A.; Wichelhaus, T.A.; Stirnal, V.; Dingeldein, E.; Zichner, L.; Schnettler, R.; Alt, V. Nanocrystalline Hydroxyapatite and Calcium Sulphate as Biodegradable Composite Carrier Material for Local Delivery of Antibiotics in Bone Infections. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2677–2684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Yang, P.; Quan, Z.; Li, C.; Kang, X.; Lian, H.; Lin, J. Bioactive, Luminescent and Mesoporous Europium-Doped Hydroxyapatite as a Drug Carrier. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4341–4347. [[CrossRef](#)]
8. Ptáček, P. Substituents and Dopants in the Structure of Apatite. In *Apatites and their Synthetic Analogues—Synthesis, Structure, Properties and Applications*; InTech: London, UK, 2016.
9. Posner, A.S. Crystal Chemistry of Bone Mineral. *Physiol. Rev.* **1969**, *49*, 760–792. [[CrossRef](#)]

10. Hing, K.A.; Best, S.M.; Bonfield, W. Characterization of Porous Hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1999**, *10*, 135–145. [[CrossRef](#)]
11. Dahl, S.G.; Allain, P.; Marie, P.J.; Mauras, Y.; Boivin, G.; Ammann, P.; Tsouderos, Y.; Delmas, P.D.; Christiansen, C. Incorporation and Distribution of Strontium in Bone. *Bone* **2001**, *28*, 446–453. [[CrossRef](#)]
12. Guo, D.; Xu, K.; Zhao, X.; Han, Y. Development of a Strontium-Containing Hydroxyapatite Bone Cement. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4073–4083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bigi, A.; Boanini, E.; Capuccini, C.; Gazzano, M. Strontium-Substituted Hydroxyapatite Nanocrystals. *Inorg. Chim. Acta* **2007**, *360*, 1009–1016. [[CrossRef](#)]
14. Canalis, E.; Hott, M.; Deloffre, P.; Tsouderos, Y.; Marie, P.J. The Divalent Strontium Salt S12911 Enhances Bone Cell Replication and Bone Formation In Vitro. *Bone* **1996**, *18*, 517–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pors Nielsen, S. The Biological Role of Strontium. *Bone* **2004**, *35*, 583–588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Marie, P.J. Strontium Ranelate: A Physiological Approach for Optimizing Bone Formation and Resorption. *Bone* **2006**, *38*, 10–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Onda, A.; Ogo, S.; Kajiyoshi, K.; Yanagisawa, K. Hydrothermal Synthesis of Vanadate/Phosphate Hydroxyapatite Solid Solutions. *Mater. Lett.* **2008**, *62*, 1406–1409. [[CrossRef](#)]
18. Rehder, D. Vanadium. Its Role for Humans. *Met. Ions. Life Sci.* **2013**, *13*, 139–169.
19. Gupta, S.K.; Rao, P.V.R.; Narasaraaju, T.S.B. Physico-Chemical Aspects of Calcium Vanadate Apatite. *J. Mater. Sci.* **1986**, *21*, 161–164. [[CrossRef](#)]
20. Treviño, S.; Díaz, A.; Sánchez-Lara, E.; Sanchez-Gaytan, B.L.; Perez-Aguilar, J.M.; González-Vergara, E. Vanadium in Biological Action: Chemical, Pharmacological Aspects, and Metabolic Implications in Diabetes Mellitus. *Biol. Trace Elem. Res.* **2019**, *188*, 68–98. [[CrossRef](#)]
21. Yu, R.; Jeong, J.H.; Wang, Y.F. A Novel Eu³⁺- and Self-Activated Vanadate Phosphor of Ca₄La(VO₄)₃O with Oxyvanadate Apatite Structure. *J. Am. Ceram. Soc.* **2017**, *100*, 5649–5658. [[CrossRef](#)]
22. Nakajima, T.; Isobe, M.; Tsuchiya, T.; Ueda, Y.; Manabe, T. Correlation between Luminescence Quantum Efficiency and Structural Properties of Vanadate Phosphors with Chained, Dimerized, and Isolated VO₄ Tetrahedra. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 5160–5167. [[CrossRef](#)]
23. Liu, H.; Chen, F.; Xi, P.; Chen, B.; Huang, L.; Cheng, J.; Shao, C.; Wang, J.; Bai, D.; Zeng, Z. Biocompatible Fluorescent Hydroxyapatite: Synthesis and Live Cell Imaging Applications. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 18538–18544. [[CrossRef](#)]
24. Chung, R.J. Study of Hydroxyapatite Nano Composites with Photoluminescence Properties. *Biomed. Eng.* **2011**, *23*, 107–112. [[CrossRef](#)]
25. Kaur, K.; Singh, K.J.; Anand, V.; Islam, N.; Bhatia, G.; Kalia, N.; Singh, J. Lanthanide (=Ce, Pr, Nd and Tb) Ions Substitution at Calcium Sites of Hydroxyl Apatite Nanoparticles as Fluorescent Bio Probes: Experimental and Density Functional Theory Study. *Ceram. Int.* **2017**, *43*, 10097–10108. [[CrossRef](#)]
26. Sohn, Y. Structural and Spectroscopic Characteristics of Terbium Hydroxide/Oxide Nanorods and Plates. *Ceram. Int.* **2014**, *40*, 13803–13811. [[CrossRef](#)]
27. Wakefield, G.; Keron, H.A.; Dobson, P.J.; Hutchison, J.L. Structural and Optical Properties of Terbium Oxide Nanoparticles. *J. Phys. Chem. Solids* **1999**, *60*, 503–508. [[CrossRef](#)]
28. Ono, T.-A. Effects of Lanthanide Substitution at Ca-Site on the Properties of the Oxygen Evolving Center of Photosystem II. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *82*, 85–91. [[CrossRef](#)]
29. Jiménez-Flores, Y.; Suárez-Quezada, M.; Rojas-Trigos, J.B.; Lartundo-Rojas, L.; Suárez, V.; Mantilla, A. Characterization of Tb-Doped Hydroxyapatite for Biomedical Applications: Optical Properties and Energy Band Gap Determination. *J. Mater. Sci.* **2017**, *52*, 9990–10000. [[CrossRef](#)]
30. Li, L.; Liu, Y.; Tao, J.; Zhang, M.; Pan, H.; Xu, X.; Tang, R. Surface Modification of Hydroxyapatite Nanocrystallite by a Small Amount of Terbium Provides a Biocompatible Fluorescent Probe. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 12219–12224. [[CrossRef](#)]
31. Neacsu, I.A.; Stoica, A.E.; Vasile, B.S.; Andronescu, E. Luminescent Hydroxyapatite Doped with Rare Earth Elements for Biomedical Applications. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 239. [[CrossRef](#)]
32. Webster, T.J.; Massa-Schlueter, E.A.; Smith, J.L.; Slamovich, E.B. Osteoblast Response to Hydroxyapatite Doped with Divalent and Trivalent Cations. *Biomaterials* **2004**, *25*, 2111–2121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Szyszka, K.; Rewak-Soroczynska, J.; Dorotkiewicz-Jach, A.; Ledwa, K.A.; Piecuch, A.; Giersig, M.; Drulis-Kawa, Z.; Wiglusz, R.J. Structural Modification of Nanohydroxyapatite Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ Related to Eu³⁺ and Sr²⁺ Ions Doping and Its Spectroscopic and Antimicrobial Properties. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *203*, 110884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zawisza, K.; Sobierajska, P.; Renaudin, G.; Nedelec, J.M.; Wiglusz, R.J. Correction: Effects of Crystalline Growth on Structural and Luminescence Properties of Ca(10-3x)Eu2x(PO₄)₆F₂ Nanoparticles Fabricated by Using a Microwave Driven Hydrothermal Process. *CrystEngComm* **2017**, *19*, 6936–6949.
35. Sobierajska, P.; Pazik, R.; Zawisza, K.; Renaudin, G.; Nedelec, J.M.; Wiglusz, R.J. Effect of Lithium Substitution on the Charge Compensation, Structural and Luminescence Properties of Nanocrystalline Ca₁₀(PO₄)₆F₂ Activated with Eu³⁺ Ions. *CrystEngComm* **2016**, *18*, 3447–3455. [[CrossRef](#)]
36. Sobierajska, P.; Wiglusz, R.J. Influence of the Grain Sizes on Stokes and Anti-Stokes Fluorescence in the Yb³⁺ and Tb³⁺ Ions Co-Doped Nanocrystalline Fluorapatite. *J. Alloys Compd* **2019**, *785*, 808–818. [[CrossRef](#)]

37. Mehnaoui, M.; Ternane, R.; Panczer, G.; Trabelsi-Ayadi, M.; Boulon, G. Structural and Luminescent Properties of New Pb²⁺-Doped Calcium Chlorapatites Ca_{10-x}Pb_x(PO₄)₆Cl₂(0 ≤ x ≤ 10). *J. Phys. Condens. Matter* **2008**, *20*, 275227. [[CrossRef](#)]
38. Shi, L.; Zhao, S.; Ying, Z.; Han, Y.; Li, M.; Zhang, M.; Zhang, Z. Systematic Studies on Sr₄La₆(SiO₄)₆M₂:Eu³⁺ (M = F/Cl) Phosphors: Effects of the Halogen Anions on Photoluminescence. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2019**, *30*, 1803–1812. [[CrossRef](#)]
39. Liu, N.; Mei, L.; Liao, L.; Fu, J.; Yang, D. High Thermal Stability Apatite Phosphors Ca₂La₈(SiO₄)₆O₂:Dy³⁺/Sm³⁺ for White Light Emission: Synthesis, Structure, Luminescence Properties and Energy Transfer. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 15509. [[CrossRef](#)]
40. Zhang, X.; Vecchio, K.S. Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite Rods. *J. Cryst. Growth* **2007**, *308*, 133–140. [[CrossRef](#)]
41. Ashok, M.; Kalkura, S.N.; Sundaram, N.M.; Arivuoli, D. Growth and Characterization of Hydroxyapatite Crystals by Hydrothermal Method. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 895–898. [[CrossRef](#)]
42. Xu, Y.; An, L.; Chen, L.; Xu, H.; Zeng, D.; Wang, G. Controlled Hydrothermal Synthesis of Strontium-Substituted Hydroxyapatite Nanorods and Their Application as a Drug Carrier for Proteins. *Adv. Powder Technol.* **2018**, *29*, 1042–1048. [[CrossRef](#)]
43. Kim, T.G.; Park, B. Synthesis and Growth Mechanisms of One-Dimensional Strontium Hydroxyapatite Nanostructures. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 9895–9901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Li, Z.Y.; Lam, W.M.; Yang, C.; Xu, B.; Ni, G.X.; Abbah, S.A.; Cheung, K.M.C.; Luk, K.D.K.; Lu, W.W. Chemical Composition, Crystal Size and Lattice Structural Changes after Incorporation of Strontium into Biomimetic Apatite. *Biomaterials* **2007**, *28*, 1452–1460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Paduraru, A.V.; Oprea, O.; Musuc, A.M.; Vasile, B.S.; Iordache, F.; Andronescu, E. Influence of Terbium Ions and Their Concentration on the Photoluminescence Properties of Hydroxyapatite for Biomedical Applications. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 2442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Jokić, B.; Mitrić, M.; Radmilović, V.; Drmanić, S.; Petrović, R.; Janačković, D. Synthesis and Characterization of Monetite and Hydroxyapatite Whiskers Obtained by a Hydrothermal Method. *Ceram. Int.* **2011**, *37*, 167–173. [[CrossRef](#)]
47. Gupta, S.K.; Rao, P.V.R.; George, G.; Narasaraju, T.S.B. Determination of Solubility Products of Phosphate and Vanadate Apatites of Calcium and Their Solid Solutions. *J. Mater. Sci.* **1987**, *22*, 1286–1290. [[CrossRef](#)]
48. Bochat, C.B.; Eon, J.G.; Rossi, A.M.; de Castro Perez, C.A.; da Silva San Gil, R.A. Structure of Vanadate in Calcium Phosphate and Vanadate Apatite Solid Solutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 4225–4230. [[CrossRef](#)]
49. Holder, C.F.; Schaak, R.E. Tutorial on Powder X-Ray Diffraction for Characterizing Nanoscale Materials. *ACS Nano* **2019**, *13*, 7359–7365. [[CrossRef](#)]
50. Mittemeijer, E.J.; Welzel, U. The “State of the Art” of the Diffraction Analysis of Crystallite Size and Lattice Strain. *Z. Krist.* **2008**, *223*, 552–560. [[CrossRef](#)]
51. Nowak, N.; Wiglusz, R.J. A Study of Vanadate Group Substitution into Nanosized Hydroxyapatite Doped with Eu³⁺ Ions as a Potential Tissue Replacement Material. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 77. [[CrossRef](#)]
52. Liu, J.; Ye, X.; Wang, H.; Zhu, M.; Wang, B.; Yan, H. The Influence of PH and Temperature on the Morphology of Hydroxyapatite Synthesized by Hydrothermal Method. *Ceram. Int.* **2003**, *29*, 629–633. [[CrossRef](#)]
53. Earl, J.S.; Wood, D.J.; Milne, S.J. Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite. *J. Phys. Conf. Ser.* **2006**, *26*, 268–271. [[CrossRef](#)]
54. Han, J.K.; Song, H.Y.; Saito, F.; Lee, B.T. Synthesis of High Purity Nano-Sized Hydroxyapatite Powder by Microwave-Hydrothermal Method. *Mater. Chem. Phys.* **2006**, *99*, 235–239. [[CrossRef](#)]
55. Dickens, B.; Bowen, J.S.; Brown, W.E. A Refinement of the Crystal Structure of CaHPO₄ (Synthetic Monetite). *Acta Cryst.* **1971**, *B28*, 797.
56. Guo, X.; Xiao, P. Effects of Solvents on Properties of Nanocrystalline Hydroxyapatite Produced from Hydrothermal Process. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2006**, *26*, 3383–3391. [[CrossRef](#)]
57. Sari, M.; Hening, P.; Chotimah; Ana, I.D.; Yusuf, Y. Bioceramic Hydroxyapatite-Based Scaffold with a Porous Structure Using Honeycomb as a Natural Polymeric Porogen for Bone Tissue Engineering. *Biomater. Res.* **2021**, *25*, 1–13. [[CrossRef](#)]
58. Andres-Verges, M.; Higes-Rolando, F.J.; Valenzuela-Calahorra, C.; Gonzalez-Diaz, P.F. On the Structure of Calcium-Lead Phosphate Apatites. *Spectrochim. Acta* **1983**, *39*, 1077–1082. [[CrossRef](#)]
59. Ciobanu, C.S.; Iconaru, S.L.; Massuyeau, F.; Constantin, L.V.; Costescu, A.; Predoi, D. Synthesis, Structure, and Luminescent Properties of Europium-Doped Hydroxyapatite Nanocrystalline Powders. *J. Nanomater.* **2012**, *2012*, 942801. [[CrossRef](#)]
60. Sharma, A.; Varshney, M.; Chae, K.H.; Won, S.O. Electronic Structure and Luminescence Assets in White-Light Emitting Ca₂V₂O₇, Sr₂V₂O₇ and Ba₂V₂O₇ Pyro-Vanadates: X-Ray Absorption Spectroscopy Investigations. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 26423–26431. [[CrossRef](#)]
61. Yu, H.; Song, H.; Pan, G.; Qin, R.; Fan, L.; Zhang, H.; Bai, X.; Li, S.; Zhao, H.; Lu, S. Preparation and Luminescent Properties of YVO₄:Eu³⁺ Nanofibers by Electrospinning. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008**, *8*, 1432–1436. [[CrossRef](#)]
62. Thiagarajan, K.; Theerthagiri, J.; Senthil, R.A.; Madhavan, J. Simple and Low Cost Electrode Material Based on Ca₂V₂O₇/PANI Nanoplatelets for Supercapacitor Applications. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2017**, *28*, 17354–17362. [[CrossRef](#)]
63. Odusote, J.K.; Danyuo, Y.; Baruwa, A.D.; Azeez, A.A. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite from Bovine Bone for Production of Dental Implants. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2019**, *17*, 2280800019836829. [[CrossRef](#)]
64. Galera-Gomez, P.A.; Sanz-Pinilla, S.; Otero-Aenlle, E.; Gonzalez-Diaz, P.F. Infrared Spectra of Arsenate and Vanadate Strontium Apatites. *Spectrochim. Acta* **1982**, *38*, 253–259. [[CrossRef](#)]
65. Machado, T.R.; Sczancoski, J.C.; Beltrán-Mir, H.; Nogueira, I.C.; Li, M.S.; Andrés, J.; Cordoncillo, E.; Longo, E. A Novel Approach to Obtain Highly Intense Self-Activated Photoluminescence Emissions in Hydroxyapatite Nanoparticles. *J. Solid State Chem.* **2017**, *249*, 64–69. [[CrossRef](#)]

66. Hou, D.; Pan, X.; Lai, H.; Li, J.Y.; Zhou, W.; Ye, X.; Liang, H. Luminescence, Energy Transfer and Thermal Stability of Eu^{2+} and Tb^{3+} in the $\text{BaCa}_2\text{MgSi}_2\text{O}_8$ Host. *Mater. Res. Bull.* **2017**, *89*, 57–62. [[CrossRef](#)]
67. Deshmukh, K.; Shaik, M.; Ramanan, S.R.; Kowshik, M. Self-Activated Fluorescent Hydroxyapatite Nanoparticles: A Promising Agent for Bio-Imaging and Bio-Labeling. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2*, 1257–1264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Zhang, C.; Yang, J.; Quan, Z.; Yang, P.; Li, C.; Hou, Z.; Lin, J. Hydroxyapatite Nano- and Microcrystals with Multiform Morphologies: Controllable Synthesis and Luminescence Properties. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 2725–2733. [[CrossRef](#)]
69. Santos, R.D.S.; Rezende, M.V.D.S. Atomistic Simulation of Intrinsic Defects and Trivalent and Tetravalent Ion Doping in Hydroxyapatite. *Adv. Condens. Matter Phys.* **2014**, *2014*, 609024. [[CrossRef](#)]
70. Podhorodecki, A.; Gaponenko, N.; Bański, M.; Kim, T.; Misiewicz, J. Excitation Mechanisms of Green Emission from Terbium Ions Embedded Inside the Sol-Gel Films Deposited onto Nanoporous Substrates. *ECS Trans.* **2010**, *28*, 81–88. [[CrossRef](#)]
71. Wujczyk, M.; Watras, A.; Wiglusz, R.J. The Study of the Influence of PH on the Structural and Spectroscopic Properties of Nanocrystalline Eu^{3+} ion-Doped Yttrium Orthovanadate. *Dalton Trans.* **2021**, *50*, 3724–3733. [[CrossRef](#)]
72. Heyes, A.L. On the Design of Phosphors for High-Temperature Thermometry. *J. Lumin.* **2009**, *129*, 1598–1601. [[CrossRef](#)]
73. Shintoyo, S.; Murakami, K.; Fujinami, T.; Matsumoto, N.; Mochida, N.; Ishida, T.; Sunatsuki, Y.; Watanabe, M.; Tsuchimoto, M.; Mrozinski, J.; et al. Crystal Field Splitting of the Ground State of Terbium(III) and Dysprosium(III) Complexes with a Triimidazolyl Tripod Ligand and an Acetate Determined by Magnetic Analysis and Luminescence. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 10359–10369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Kumar, V.; Som, S.; Kumar, V.; Kumar, V.; Ntwaeaborwa, O.M.; Coetsee, E.; Swart, H.C. Tunable and White Emission from $\text{ZnO}:\text{Tb}^{3+}$ Nanophosphors for Solid State Lighting Applications. *Chem. Eng. J.* **2014**, *255*, 541–552. [[CrossRef](#)]
75. Zhou, X.; Jiang, S.; Xiang, G.; Tang, X.; Luo, X.; Li, L.; Zhou, X. Tunable Emission Color of $\text{Li}_2\text{SrSiO}_4:\text{Tb}^{3+}$ Due to Cross-Relaxation Process and Optical Thermometry Investigation. *J. Am. Ceram. Soc.* **2018**, *101*, 3076–3085. [[CrossRef](#)]
76. Richardson, F.S. Terbium(III) and Europium(III) Ions as Luminescent Probes and Stains for Biomolecular Systems. *Chem. Rev.* **1982**, *82*, 541–552. [[CrossRef](#)]
77. Liu, Z.; Wang, Q.; Yao, S.; Yang, L.; Yu, S.; Feng, X.; Li, F. Synthesis and Characterization of $\text{Tb}^{3+}/\text{Gd}^{3+}$ Dual-Doped Multifunctional Hydroxyapatite Nanoparticles. *Ceram. Int.* **2014**, *40*, 2613–2617. [[CrossRef](#)]
78. Wujczyk, M.; Watras, A.; Boutinaud, P.; Bettinelli, M.; Targonska, S.; Hölsä, J.; Wiglusz, R.J. Emission Quenching and First Evidence of Tb^{3+} -to- As^{5+} Charge Transfer in Terbium(III) Ion-Doped $\text{YV}_x\text{As}_{1-x}\text{O}_4$ Solid-State Solution. *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124*, 17364–17371. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3.3. Praca „*Structural, spectroscopic, and biological characterization of novel rubidium(I) and europium(III) co-doped nano-hydroxyapatite materials and their potential use in regenerative medicine*”

Problemem badawczym podjętym w pracy pt. „*Structural, spectroscopic, and biological characterization of novel rubidium(I) and europium(III) co-doped nano-hydroxyapatite materials and their potential use in regenerative medicine*” było otrzymanie oraz charakterystyka nanomateriałów na o strukturze hydroksyapatytu, domieszkowanych jonami Eu^{3+} oraz współdomieszkowanych jonami Rb^+ .

Jak już wspomniano hydroksyapatyty należące do grupy apatytów, to materiały nieorganiczne występujące powszechnie w przyrodzie, które odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu oraz prawidłowym metabolizmie kości. Ich prosta struktura pozwala na otrzymanie syntetycznych materiałów, które poprzez subtelne modyfikacje strukturalne mogą stanowić lepszą alternatywę w dziedzinie bioobrazowania, medycyny regeneracyjnej czy inżynierii tkankowej. Syntetyczne związki o strukturze apatytu stanowią też optymalną matrycę dla jonów optycznie czynnych, takich jak na przykład jony Eu^{3+} , ze względu na możliwości stabilizowania i optymalizacji ich luminescencji. Ze względu na to, że nanometryczne fosforany wapnia oraz apatyty są z łatwością transportowane do wnętrza komórki, to optycznie czynna domieszka otwiera nowe możliwości w dziedzinie obrazowania *in vitro*. Rubid będąc pierwiastkiem biologicznie czynnym stanowi dobrą alternatywę dla dobrze już poznanego i wyeksploatowanego litu. Podobnie jak lit, jony rubidu wykazują działanie antydepresyjne oraz neuroprotektoryjne. Ponadto, jego przewagą nad jonami litu jest to, że jony rubidu wykazują działanie osteoindukcyjne i chondroindukcyjne. Dlatego też taka domieszka poprawi biogodność apatytu i oraz rozszerzy spektrum działania biologicznego.

Głównym problemem badawczym podjętym podczas realizacji niniejszej pracy była synteza i charakterystyka dwóch serii kompozytów na o strukturze hydroksyapatytu współdomieszkowanych jonami Eu^{3+} oraz Rb^+ . Podczas analizy otrzymanych materiałów określono wpływ jonów Rb^+ na strukturę krystaliczną matrycy hydroksyapatytowej oraz ustalono jak jony Rb^+ wpływają na właściwości luminescencyjne jonów Eu^{3+} wbudowanych w matrycę apatytową.

Podczas realizacji pracy otrzymano dwie serie materiałów o strukturze hydroksyapatytu. Pierwsza seria została domieszkowana jonami Eu^{3+} w stężeniu 1 mol%, natomiast druga 2 mol% w przeliczeniu na procentową zawartość molową jonów Ca^{2+} w hydroksyapatycie wapnia. Obie serie związków zostały współdomieszkowane jonami rubidu w ilości 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 mol% również w przeliczeniu na jony Ca^{2+} . Charakterystyka właściwości fizykochemicznych otrzymanych materiałów przeprowadzona była z użyciem proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej (XRPD), skaningowej mikroskopii elektronowej z

mapowaniem pierwiastków (SEM-mapping), transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), spektroskopii w podczerwieni (metoda osłabionego całkowitego odbicia ATR-FTIR), technice atomowej spektroskopii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-OES) oraz spektroskopii fotoluminescencyjnej. Do analizy właściwości biologicznych posłużył test cytotoksyczności MTT z użyciem linii 7F2 mysich osteoblastów, mikroskopia fluorescencyjna, test hemolityczny oraz mikroskopia konfokalna do oceny morfologii erytrocytów.

Wszystkie krystaliczne materiały otrzymane metodą hydrotermalną i poddane obróbce termicznej w temperaturze 500°C przez 3 godziny wykształciły heksagonalną strukturę hydroksyapatytu, która odpowiada strukturze wzorca krystalicznego hydroksyapatytu z bazy danych ICSD (ICSD-262004). Otrzymane dyfraktogramy proszkowe wyraźnie prezentują obecność charakterystycznych refleksów pochodzących od grup fosforanowych krystalicznego hydroksyapatytu w badanych próbkach, szczególnie w przedziale od 32 do 34°. Materiały współdomieszkowane jonami Rb⁺ powyżej 3 mol% charakteryzowały się obecnością obcej fazy, która zgodnie z bazą danych ICSD (ICSD-20312) należy do diwodorofosforanu rubidu RbH₂PO₄. Pojawienie się drugiej fazy zauważono w obu seriach otrzymanych związków. Jak wyjaśniono w pracy może to wynikać z różnicy w promieniu jonowym Rb⁺, który wynosi odpowiednio Rb⁺ 0,148 nm, a promień jonowy Ca²⁺ wynosi 0,099 nm. Taka różnica może powodować trudności w otrzymaniu czysto fazowych związków o strukturze hydroksyapatytu z większą domieszką Rb⁺. Wyniki widm ATR-FTIR potwierdziły obecność charakterystycznych drgań pochodzących od grup fosforanowych hydroksyapatytu: $\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$, $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$, $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$, $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ oraz specyficznych drgań od grup hydroksylowych $\nu_L(\text{OH})$ i $\nu_S(\text{OH})$. Pomiar TEM dwóch reprezentatywnych materiałów potwierdził nanometryczne rozmiary próbek, natomiast obrazy SAED dodatkowo uzupełniły wyniki uzyskane z pomiarów dyfraktometrycznych i zgodnie świadczą o ich wysokiej krystaliczności. Obrazy uzyskane z mapowania SEM oraz wyniki z pomiarów ICP-OES dostarczyły danych, które świadczą o obecności wszystkich pierwiastków, które w założeniu teoretycznym powinny znajdować się w zaprojektowanych materiałach.

Badania właściwości luminescencyjnych przedstawiają widma emisji, wzbudzenia oraz czasu zaniku luminescencji jonów Eu³⁺ wbudowanych w materiały o strukturze hydroksyapatytu współdomieszkowanych jonami Rb⁺. Pomiar widm emisji przedstawiają charakterystyczne przejścia dla jonu europu na +3 stopniu utlenienia. Po wzbudzeniu światłem o długości fali 393,5 nm zaobserwowano przejścia z poziomu wzbudzonego ⁵D₀ kolejno do poziomów podstawowych ⁷F₀, ⁷F₁, ⁷F₂, ⁷F₃ oraz ⁷F₄. Widma emisji wyraźnie wskazują na wpływ jonów rubidu na właściwości luminescencyjne jonów Eu³⁺, widoczna jest zmiana kształtu przejścia 0→0 co może świadczyć o tym, że wraz ze wzrastającym stężeniem jonów Rb⁺ zmienia się pozycja krystalograficzna jonów Eu³⁺ w matrycy o strukturze hydroksyapatytu. Wyniki przedstawiają wzrastającą intensywność poszczególnych pasm wraz ze wzrastającą ilością jonów Rb⁺ w materiałach. Wzrastająca intensywność pasm emisji jonów Eu³⁺

koreluje z wynikami uzyskanymi z pomiarów wzbudzenia dla jonu Eu^{3+} . Wzrost ilości jonów Rb^+ w matrycy powoduje wzrost intensywności pasm poszczególnych przejść z poziomu podstawowego 7F_0 do poziomów wzbudzonych ${}^5H_{(7-3)}$, 5D_4 , 5L_8 , ${}^5G_{(2,3)}$, 5L_7 , 5L_6 , 5D_2 , 5D_1 jonu Eu^{3+} , jak również wzrost intensywności pasma dla przejścia z przeniesieniem ładunku (*ang. Charge Transfer*) $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$. Wyniki pomiarów emisji i wzbudzenia mają wyraźnie przełożenie na wyniki zaniku czasu luminescencji Eu^{3+} , które przedstawiają wyraźną tendencję do wydłużania się czasu życia jonów Eu^{3+} w materiałach zawierających większą domieszkę jonów Rb^+ .

Analiza właściwości biologicznych przyniosła zaskakujące rezultaty. Wyniki testu MTT potwierdziły wysoką biogodność obu serii otrzymanych związków wobec linii osteoblastów. Zaobserwowana była zwiększona aktywność biologiczna komórek zwłaszcza w najwyższych testowanych stężeniach. Wyniki testu MTT korelują z wynikami widocznymi na zdjęciach wykonanych przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, przedstawiających prawidłową morfologię oraz dużą ilość komórek żywych w stosunku do pojedynczo występujących komórek martwych. Wysoka biogodność materiałów została potwierdzona w teście hemolitycznym oraz na zdjęciach z mikroskopu konfokalnego, przedstawiających prawidłową morfologię krwinek czerwonych po 24 godzinnej inkubacji z testowanymi związkami.

Podsumowując, podczas realizacji pracy otrzymano obiecujące materiałami do potencjalnych zastosowań biomedycznych takich jak bioobrazowanie, medycyna regeneracyjna czy inżynieria tkankowa.



Article

Structural, Spectroscopic, and Biological Characterization of Novel Rubidium(I) and Europium(III) Co-Doped Nano-Hydroxyapatite Materials and Their Potential Use in Regenerative Medicine

Nicole Nowak ^{1,2,*}, Dominika Czekanowska ¹ , John M. Reeks ¹ and Rafal J. Wiglusz ^{1,*}

¹ Institute of Low Temperature and Structure Research, Polish Academy of Sciences, Okolna 2, 50-422 Wrocław, Poland

² Department of Animal Biostructure and Physiology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland

* Correspondence: n.nowak@intibs.pl (N.N.); r.wiglusz@intibs.pl (R.J.W.); Tel.: +48-071-3954-274 (N.N.); +48-071-3954-159 (R.J.W.)

Abstract: This research investigates hydrothermally synthesized hydroxyapatite nanoparticles doped with rubidium(I) and europium(III) ions. Investigation focused on establishing the influence of co-doped Eu^{3+} and Rb^{+} ions on hydroxyapatite lattice. Therefore, structural, and morphological properties were characterized via using X-ray powder diffraction (XRPD), infrared spectroscopy (FT-IR), and scanning electron microscopy (SEM), as well as transmission electron microscopy (TEM) techniques. Furthermore, this investigation evaluates the impact of various Rb^{+} ion doping concentrations on the distinct red emission of co-doped Eu^{3+} ions. Hence, luminescence properties of the obtained materials were evaluated by measuring emission excitation, emission spectra, and luminescence decays. As established by numerous studies, synthetic hydroxyapatite has excellent application in biomedical field, as it is fully biocompatible. Its biocompatible makes it highly useful in the biomedical field as a bone fracture filler or hydroxyapatite coated dental implant. By the incorporation of Eu^{3+} ions and Rb^{+} ions we established the impact these co-doped ions have on the biocompatibility of hydroxyapatite powders. Therefore, biocompatibility toward a ram's red blood cells was evaluated to exclude potential cytotoxic features of the synthesized compounds. Additionally, experimental in vitro bioactive properties of hydroxyapatite nanoparticles doped with Rb^{+} and Eu^{3+} ions were established using a mouse osteoblast model. These properties are discussed in detail as they contribute to a novel method in regenerative medicine.

Keywords: nanosized hydroxyapatite; Eu^{3+} ion-doping; Rb^{+} ion-doping; regenerative medicine; tissue engineering; photoluminescence; in vitro cell-culture study



Citation: Nowak, N.; Czekanowska, D.; Reeks, J.M.; Wiglusz, R.J. Structural, Spectroscopic, and Biological Characterization of Novel Rubidium(I) and Europium(III) Co-Doped Nano-Hydroxyapatite Materials and Their Potential Use in Regenerative Medicine. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 4475. <https://doi.org/10.3390/nano12244475>

Academic Editor: Jose L. Arias

Received: 17 November 2022

Accepted: 12 December 2022

Published: 17 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Developments in chemistry and nanotechnology have allowed for the production of synthetic hydroxyapatites. These materials exhibit the necessary mechanical properties, biocompatibility, and bioactivity to form a strong bond with living bone tissue. Due to their osteoinductive properties, hydroxyapatite ceramics are widely used as scaffolding, as filling material in polymeric biocomposite implants, and as coatings for metallic implants [1–3]. Through photo-stabilization of rare earth ions' luminescence, these materials can also be used as biomedical sensors [4]. The use of specific, biologically active dopants can improve the biocompatibility of hydroxyapatite-based compounds and enhance regenerative properties towards bone, cartilage, and even nervous tissue [5].

Rare-earth lanthanide ions (e.g., europium(III) ions) are known to have remarkable luminescence properties and are widely used in spectroscopic applications. Due to having

similar ionic radii and chemical properties, lanthanides as well as rare-earth and alkaline elements can be easily substituted for calcium (Ca^{2+}) in hydroxyapatite crystalline structure [6,7]. Europium(III) ions substituting for calcium(II) ions in the hydroxyapatite lattice introduces the possibility of obtaining new materials with better photoluminescence properties [8,9]. Furthermore, hydroxyapatites doped with europium(III) ions have excellent biocompatibility and biodegradability. They, therefore, can be used in biomedical applications as fluorescent labelling materials [10,11].

Research shows rubidium(I) ions are advantageous in biological applications. Neuroprotective properties of rubidium ions (RbCl) have been reported against pentylenetetrazole (PTZ) induced seizures. This is suggested to be mediated via NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors and NO (nitric oxide) pathway in hippocampus [12]. Another independent study confirmed Rb^+ ions (RbCl) exhibit anti-depressant activity by modulating NO pathway in mice [13]. Studies also indicate that biologically safe Rb^+ ions (RbCl) impaired osteoclastogenesis ovariectomized (OVX) and titanium (Ti) particle-induced calvaria osteolysis mouse model and instead stimulated osteogenesis in vitro [14]. Therefore, a biologically active dopant such Rb^+ ions can improve biocompatibility of hydroxyapatite-based compounds and enhance osteoinductive properties towards bone cells.

The aim of this research was to obtain hydroxyapatite (HAp) based compounds co-doped with Eu^{3+} and Rb^+ ions and investigate their nanostructure as well as their improved luminescence and biological properties. For the first time, hydroxyapatite-based composites co-doped with Eu^{3+} and Rb^+ ions were obtained in two series of powder compounds with the chemical formula $\text{Ca}_{10-(0.1+x)}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{10-(0.2+x)}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (where $x = 0.5; 1; 2; 3; 5; 7$ mol%). This study confirmed that the obtained compounds exhibit enhanced photo-luminescence properties and increased biocompatibility toward the mouse osteoblasts cell line.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis Method

Two series of novel hydroxyapatite based nanopowder materials doped with Eu^{3+} and Rb^+ ions with the chemical formula $\text{Ca}_{10-(0.1+x)}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{10-(0.2+x)}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (where $x = 0.5; 1; 2; 3; 5; 7$ mol%) were synthesized via hydrothermal method. The substrates used in synthesis were respectively $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (99.0–103.0% Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany), Eu_2O_3 (99.99% Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (>99.0% Acros Organics Chemicals-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and RbCl ($\geq 99.0\%$ Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Stoichiometric amounts of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, and RbCl were dissolved, separately, in deionized water. Next, the stoichiometric amount of Eu_2O_3 was digested in HNO_3 ($\geq 65.0\%$, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) to obtain water soluble europium nitrate ($\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$). This was then recrystallized three times (100 °C in deionized water) to eliminate the remaining of HNO_3 . The obtained $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ was then dissolved in deionized water and mixed with aqueous $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and RbCl solutions. The substrates were introduced to the aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ solution. For example, the synthesis reaction for 1 g of $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_{0.1}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, where Ca:P ratio equals 1.66 involves dissolving 2.2681 g of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in 25 mL of deionized water, 0.0119 g of RbCl in 5 mL of deionized water and 0.7765 g of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ in 10 mL of deionized water. Preparation of $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ begins with dissolving 0.0172 g of Eu_2O_3 in 5 mL of deionized water and 200 μL of HNO_3 ($\geq 65.0\%$, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) to obtain water soluble $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$. After recrystallization, $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ was dissolved in 5 mL of deionized water. When all reagents were prepared water solutions of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, RbCl and $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ were mixed in the Teflon vessel and then water solution of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ was added. The pH was then adjusted to $\text{pH} = 9.0$ using ammonia ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 25% Avantor, Gliwice, Poland). The reaction was carried out in a microwave reactor (ERTEC MV 02-02, Wrocław, Poland) for 90 min at a temperature of 245–250 °C under autogenous pressure (45–50 bar). After the synthesis, materials were dried for 1 day at 90 °C. Finally, powders

were heat treated at 500 °C for 3 h, the temperature was set to increase at the rate of 3 °C per minute.

2.2. Structural Characterization

X-ray diffraction (XRD) was used to characterize the crystal structure of the synthesized hydroxyapatite powders co-doped with Eu^{3+} and Rb^{+} ions. XRD patterns were performed using a PANalytical X'Pert Pro X-ray diffractometer (Malvern, United Kingdom) with Ni-filtered $\text{Cu K}\alpha$ radiation ($U = 40 \text{ kV}$, $I = 30 \text{ mA}$) in the 2θ range of $5\text{--}70^\circ$. The step for XRD analysis was as 0.0263 and the time per step was estimated 4.36 s per step. The XRD-recorded patterns were compared with the reference hydroxyapatite pattern from the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD). The chemical components of the synthesized materials were identified by the inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES) Agilent 720 instrument (Santa Clara, California, United States). The samples were prepared for ICP by dissolving 100 mg of nanopowder material in 2 mL of HNO_3 ($\geq 65.0\%$, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) at the temperature 120 °C and by gradual adding of deionized water to the final volume of 50 mL. The content of P(V), Eu(III), Rb(I) elements were measured in the solutions diluted 20 times and the concentration of Ca(II) was measured in the solution diluted 500 times. For these measurements, the ICP OES method (Agilent, model 720) was used to analyze 3 prepared samples of the solution in parallel. These results were compared with standard curves in the concentration range of 0.05 to 5.00 mg/mL for Ca, Eu, Rb elements and 100 to 200 mg/mL for phosphorus. To evaluate the presence of phosphate groups in the structure of obtained compounds, IR spectra were measured in the range of $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ (mid-IR) at 295 K. Attenuated total reflectance (ATR-FT-IR) measurements were recorded at a resolution of 4 cm^{-1} (32 scans) using a Nicolet iS50 infrared spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The elemental mapping analysis of the selected sample was determined by using an FEI Nova NanoSEM 230 scanning electron microscope (FEI, Hillsboro, Oregon, United States) operating at an acceleration voltage in the range 3.0–15.0 kV and spot size of 4.0–4.5. The morphology and nanostructure of obtained composites were determined using FEI Nova NanoSEM 230 scanning electron microscope (FEI, Hillsboro, Oregon, United States) operating at an acceleration voltage in the range 3.0–15.0 kV and spot size 4.0–4.5. The samples were evenly coated with a layer of graphite prior to these observations. Illustration of the map was automatically generated by the microscope software. The morphology, size, and structure of nanopowder materials were visualized by via HRTEM (High Resolution Transmission Electron Microscopy), using a Philips CM-20 Super Twin microscope (FEI, Hillsboro, Oregon, United States), operated at 200 kV. The selected hydroxyapatite based powders were prepared via dispersion in methanol. Then, a drop of suspension was deposited on a copper microscope grid covered with perforated carbon and each sample was imaged.

2.3. Luminescence Properties

Excitation and emission spectra as well as luminescence kinetics, of novel $\text{Ca}_{10-(0.1+x)}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{10-(0.2+x)}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (where $x = 0.05; 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 0.7$) nanopowder materials were collected via FLS980 fluorescence spectrometer (Edinburgh Instruments, Livingston, United Kingdom). A 450 W Xenon Lamp was used as the excitation light source during the excitation and emission spectra records. Specific excitation wavelengths were isolated using a 300 mm monochromator equipped with a holographic grating (1800 grooves per mm, blaze of 250 nm) in conjunction with the lamp. Measuring the luminescence kinetics involved utilizing a microsecond flashlamp (μF2) excitation source with a Hamamatsu R928P photomultiplier tube detector (Shizuoka, Japan). The excitation spectra and luminescence kinetics were excited by 393.5 nm light. Luminescence kinetics were observed at 616.7 nm emission which corresponds to the most intense electric dipole transition of Eu^{3+} ions (from level $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ level) [15–17].

2.4. Biological Properties

2.4.1. Preparation of Sample Suspensions

Before the preparation of the colloidal solutions, obtained powder materials were sterilized under UV light for 30 min. Then, stocks of nanosized hydroxyapatites doped with Eu^{3+} and Rb^{+} ions were prepared by forming suspensions of compounds in distilled water in the concentration 1 mg per mL. Then, each stock was bath-sonicated for 1 h at RT. Freshly prepared colloids were sterilized under the UV light for 30 min before being used in biological experiments.

2.4.2. Cell Culture and Viability Assay

Mouse osteoblasts (7F2) cell line was maintained in high glucose Alpha Modified Eagle Medium (α -MEM) with L-glutamine (Biowest, Nuaille, France) and supplemented with 200 U/mL penicillin and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, South America origin, Biowest, Nuaille, France). The cell line was incubated in standard conditions in a humid atmosphere of 95% air and 5% CO_2 at 37 °C. The cell line was passaged three times before the experiments were performed.

To evaluate biocompatibility of the obtained compounds MTT viability assay was performed on mouse osteoblasts cell line (7F2, ATCC, Manassas, Virginia, United States). 7F2 cells were seeded at a density of 1×10^4 cells per well in a 96-well plate. Cells were then treated with two series of compounds at three different concentrations: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cultures of treated and untreated cells were incubated for 24 h in the standard conditions. After that time, the medium containing the tested compounds was removed and cells were washed out once with sterile PBS. Then, freshly prepared MTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) reagent (0.5 mg/mL) was dissolved in sterile PBS and added to the cells. The negative control group was established as untreated cells and was equal 100% of viable cells. Cells were incubated in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 for 3 h at 37 °C. After that time, MTT solution was removed, and formazan crystals were dissolved by adding isopropanol. Absorbance was read at 560 nm and 670 nm (background reference). This experiment was conducted three times. The viability of used cell lines was estimated using the following formula:

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \times 100$$

To establish biocompatibility of rubidium(I) ions and its potential positive effect on proliferation rate of mouse osteoblasts cell line (7F2), RbCl (rubidium chloride) solution was prepared. 10 mM solution of RbCl was obtained by dissolving RbCl powder ($\geq 99.0\%$ Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in sterile PBS and then filtrated via sterile syringe filter (pore size 0.2 μm). The 10 mM of RbCl was further sterilized under UV light for 30 min. This prepared solution was used in the viability assay (MTT). Cells were seeded in the density 1×10^4 per well in 96-well plate, then RbCl was added to cells to obtain different final concentration of the solution: 1.0; 1.25; 2.5; 3.75 and 5.0 mM. The negative control group was established as untreated cells having 100% viability of cells. After 24 h of incubation the MTT assay as well as the calculations were performed as it was described above.

2.4.3. Evaluation of Mouse Osteoblast Morphology

To evaluate cell morphology mouse osteoblasts (7F2) were seeded in the density 5×10^4 per well at the 24-well plate and incubated with both series of compounds in the highest tested concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After 24 h incubation, cells were washed with sterile PBS, then fresh PBS was added to each well and Invitrogen™ ReadyProbes™ Cell Viability Imaging Kit (Blue—live/Green—dead) (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to visualize dead—live cell ratio. Cell morphology was observed using an Invitrogen™ EVOS™ FL Digital Inverted Fluorescence Microscope ($\times 10$ magnification) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.4.4. Hemolysis Assay

Sterile and defibrinated sheep blood (Pro Animal, Wrocław, Poland) was washed out 3 times in sterile PBS and ultimately suspended in sterile PBS (Biowest, pH 7.4) at a ratio of 1:1. $\text{Ca}_{10 - (0.1 + x)}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, and b) $\text{Ca}_{10 - (0.2 + x)}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ powders, where x equals 0.5; 1; 2; 3; 5; 7 mol% of Rb^+ ions were tested towards sheep red blood cells at concentrations of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. To establish a positive control, sheep erythrocytes were combined with 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and treated as 100% of hemolysis, negative control was obtained by mixing sheep erythrocytes with sterile PBS. After 24 h of incubation at 37 °C, positive and negative control as well as red blood cell samples treated with selected hydroxyapatite-based composites were centrifuged (5000 RPM, 5 min) to obtain supernatant. The optical density was then measured at 540 nm (Varioscan Lux, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The hemolysis percentage was calculated using the formula below:

$$\text{Hemolysis} = \frac{\text{sample absorbance} - \text{negative control absorbance}}{\text{positive control absorbance} - \text{negative control absorbance}} \times 100$$

Red blood cell morphology and the integrity of cell membranes were observed via an Invitrogen™ EVOS™ FL Digital Inverted Fluorescence Microscope ($\times 10$ magnification). Sheep erythrocytes were prepared as described above and treated with selected compounds (only with the highest concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); positive and negative control was also prepared. After 24 h of incubation at 37 °C, red blood cells were centrifuged (5000 RPM, 5 min). The supernatant was gently removed, and cell precipitate was suspended with sterile PBS at a ratio of 1:1. A blood smear was prepared by transferring 5 μL of sample onto a microscope slide and using a coverslip to obtain the smear.

3. Results and Discussion

3.1. Characterization of Structure and Morphology

Two series of hydroxyapatite-based compounds with chemical formula $\text{Ca}_{10 - (0.1 + x)}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{10 - (0.2 + x)}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, where x equals 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 mol% of Rb^+ were obtained via hydrothermal method and their structure and morphology were accurately analyzed (Figure 1A,B). X-ray diffractograms of obtained nanopowders were evaluated and compared to the standard ICSD database diffractogram pattern of hydroxyapatite crystalline material ICSD 262004. The results for investigated compounds clearly showed strict correspondence to the hydroxyapatite database pattern ICSD 262004. X-ray diffractograms of hydroxyapatite co-doped with Eu^{3+} and Rb^+ ions were also juxtaposed with pure hydroxyapatite doped with Eu^{3+} ions (1 and 2 mol%). This comparison sought to establish the influence of Eu^{3+} dopants influence the hydroxyapatite crystal's structure. Experimental XRD patterns of first and second series of hydroxyapatites co doped with 1 mol% of Eu^{3+} ions and x mol% of Rb^+ ions and with 2 mol% of Eu^{3+} ions and x mol% of Rb^+ ions (x = 0.5, 1, 2, 3, 5, 7) correspond to the pure hydroxyapatite structure. For all nanopowder series of materials containing 1 mol% of Eu^{3+}/x mol% of Rb^+ ions and 2 mol% of Eu^{3+}/x mol% of Rb^+ ions signals, especially in the range from 32° to 34° matches with distinctive phosphate groups of crystalline hydroxyapatite structure ICSD 262004 (Figure 1A,B). Interestingly, in the range of 29.51° a secondary phase can be observed in both doped series of nanopowders (Figure 1A,B), which can correspond to the signal of RbH_2PO_4 (ICSD 20312) [18,19]. This signal occurs in both series when rubidium(I) molar concentration is at 2 mol% or greater. Signal from the secondary phase increases with increasing rubidium ion concentration (Figure 1A,B). One possible explanation is that the rubidium precursor (RbCl) appears in higher concentration during the synthesis process. Therefore, with the presence of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, a secondary RbH_2PO_4 phase appears. The specific conditions (temperature, pressure) of the reaction may also influence the appearance of this secondary phase [20]. The appearance of the second phase may also result from ionic radius mismatches in the hydroxyapatite structure: calcium(II) ions Ca^{2+} (C.N. = 9) = 1.18 Å and Ca^{2+} (C.N. = 7) = 1.06 Å, europium(III) ions Eu^{3+} (C.N. = 9) = 1.12 Å

and Eu^{3+} (C.N. = 7) = 1.01 Å and rubidium(I) ions Rb^+ (C.N. = 9) = 1.51 Å [21,22]. Since Rb^+ ion has a larger ionic radius (0.148 nm) than Ca^{2+} ion (0.099 nm), the incorporation of Rb^+ ion into the hydroxyapatite crystalline structure may lead to the lattice relaxation and eventually lead to changing unit cell parameters [23].

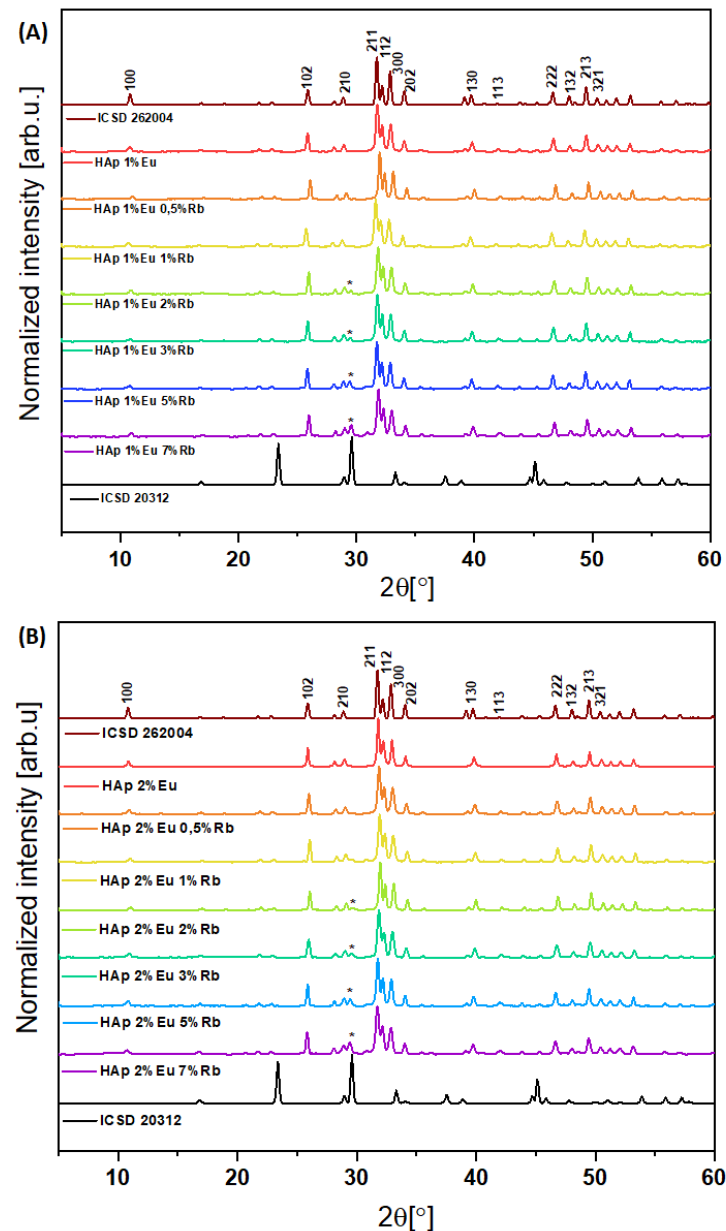


Figure 1. XRD results of $\text{Ca}_{10-(0.1+x)}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (A), and $\text{Ca}_{10-(0.2+x)}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (B), where x equals 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 mol% of Rb^+ ions. The obtained materials were thermally treated at a temperature of 500 °C for 3 h. The XRD results are compared with the ICSD database hydroxyapatite. (*) RbH_2PO_4 (ICSD 20312) [18,19].

The FT-IR spectra of two series of obtained nanopowders $\text{Ca}_{10-(0.1+x)}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{10-(0.2+x)}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, (where x equals 0.5, 1, 2, 3, 5, 7) confirmed crystalline hydroxyapatite structure through the presence of distinctive active vibrational bands, which correspond to phosphate groups (PO_4^{3-}) and hydroxyl groups (OH^-) (Figure 2A,B). There is a characteristic double degenerate bending mode (ν_2) of the P–O–P at 561.1838 cm^{-1} in the samples HAp 1 mol% Eu^{3+} and x mol% Rb^+ ions and at 561.1838 cm^{-1} in the samples HAp with 2 mol% Eu^{3+} x mol% Rb^+ ions. Triply degenerate

bending mode (ν_4) of the P–O bonds are visible at 599.7532 cm^{-1} for samples which contain HAp 1 mol% Eu^{3+} and x mol% Rb^+ ions and at 599.2711 cm^{-1} for compounds with 2 mol% Eu^{3+} and x mol% Rb^+ ions [24,25]. Moreover, the presence of non-degenerate symmetric stretching mode (ν_1) of P–O bond at 1019.677 cm^{-1} and at 962.3051 cm^{-1} can be observed in HAp based compounds with 1 mol% Eu^{3+} , x mol% of Rb^+ ions and at 1021.605 cm^{-1} and at 963.2693 cm^{-1} for second series of HAp based compounds with 2 mol% Eu^{3+} , x mol% of Rb^+ ions. The triply degenerate asymmetric stretching mode (ν_3) of the P–O bond are detected at 1088.137 cm^{-1} for hydroxyapatite nanomaterials with 1 %mol Eu^{3+} , x mol% of Rb^+ ions, but also at 1089.102 cm^{-1} for the second series of hydroxyapatite nanopowder materials co-doped with 2%mol Eu^{3+} x mol% of Rb^+ ions [26,27]. Additionally, a narrow vibrational band can be seen at 3572.485 cm^{-1} for HAp co-doped with 1 %mol Eu^{3+} , x mol% of Rb^+ ions. A narrow band is also seen at 3572.968 cm^{-1} for HAp co-doped with 2% mol Eu^{3+} , x mol% of Rb^+ ions and it is seen due to stretching frequencies of hydroxyl groups OH^- of the surface-absorbed water [28].

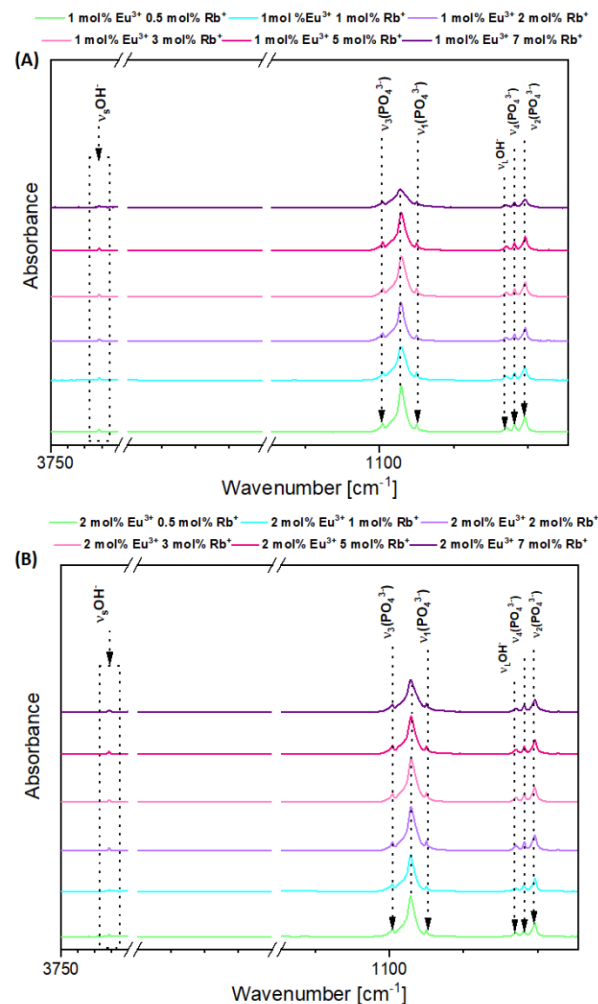


Figure 2. FT-IR spectra of $\text{Ca}_{10 - (0.1 + x)}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (A) and $\text{Ca}_{10 - (0.2 + x)}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (B), where x equals 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 mol% of Rb^+ ions.

The XRD results show evidence of a second phase (Figure 1A,B), especially among the samples with a concentration of co-doped rubidium(I) ions more than 2 mol%. By using Rietveld refinement and X-ray diffractometry results it is possible to evaluate the structural details of the samples, e.g., phase quantities, size and shape of crystallites, unit cell dimensions, atomic coordinates/bond lengths, and vacancies in the structure of the measured sample [29,30]. Through the use of FT-IR, it is possible to analyze many frequency components

in the desired sample like for instance vibrational bands from phosphate groups (PO_4^{3-}) and hydroxyl groups (OH^-) in hydroxyapatite structure [31]. Therefore, further investigation evaluated the molar concentrations of rubidium(I), europium(III), calcium(II) and phosphorous(V) via ICP-OES technique. This technique allows us to identify and quantify elements within matrix of the tested sample (Table 1) [32]. The ICP-OES measurements showed that actual content of desired elements is highly consistent with theoretical assumptions. The concentration of Eu^{3+} ions in the investigated samples is identical to the theoretical formulas. Additionally, it is clear (Table 1), that calcium(II) ions in the hydroxyapatite structure are nicely substituted by rubidium(I) and europium(III) ions among all measured samples. However, the concentration of rubidium(I) ions is slightly greater than theoretical values, as is the concentration of phosphorus. These results can along with X-ray diffractograms indicate the appearance of the second phase of RbH_2PO_4 (Figure 1A,B) [18,19]. Further confirmation of the presence of the desired elements in the materials was provided by SEM image and SEM-EDS mapping of the representative sample: $\text{Ca}_{9.1}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_{0.7}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Figure 3). EDS maps confirm the presence of all theoretical elements like calcium(II), phosphorous(V), europium(III), rubidium(I) and oxygen(II). Moreover, all these elements are evenly distributed over the whole surface of hydroxyapatite based crystalline sample. Transmission Electron Microscopy technique was used to evaluate the nanostructure of the materials. In the Figure 4, TEM images clearly confirmed nanosized structure of two selected samples: $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_{0.1}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $\text{Ca}_{9.7}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_{0.2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. In agreement with the Selected Area Electron Diffraction (SAED) technique, both sample materials showed excellently developed spotty rings, which highly correspond with crystalline structure of hydroxyapatite powder [33,34].

Table 1. The elemental contents in the selected nanomaterial samples of $\text{Ca}_{10-(0.2+x)}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, where $x = 1, 3, 5, 7$ based on ICP-OES measurements.

Sample	ICP OES Technique Results			
	n Ca [mol]	n Eu [mol]	n Rb [mol]	n P [mol]
$\text{Ca}_{9.7}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_{0.1}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9.66	0.20	0.14	7.01
$\text{Ca}_{9.5}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_{0.3}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9.43	0.20	0.37	7.17
$\text{Ca}_{9.3}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_{0.5}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9.20	0.20	0.60	7.27
$\text{Ca}_{9.1}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_{0.7}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9.00	0.20	0.81	7.44

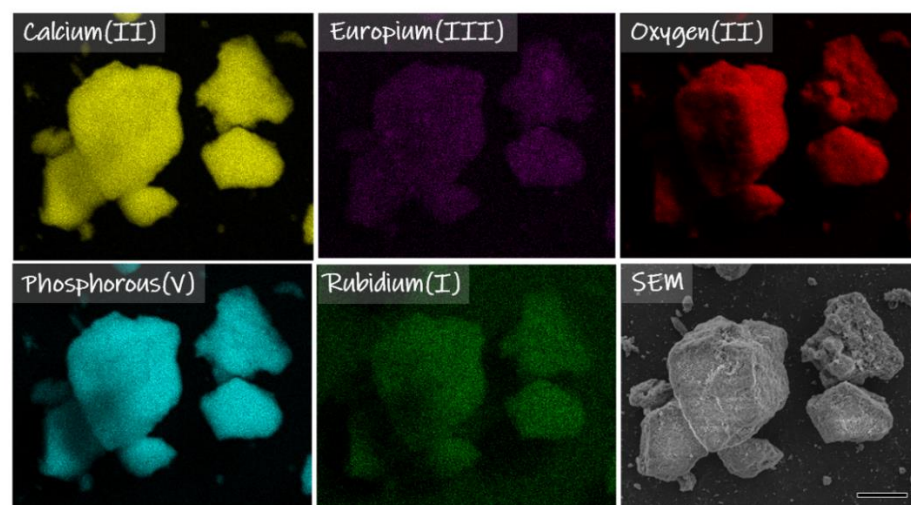


Figure 3. SEM image and SEM-EDS mapping of $\text{Ca}_{9.1}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_{0.7}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ compound. Images show the elemental composition of the sample which contains calcium, phosphorous, europium, rubidium, and oxygen. Scale bar equals 10 μm .

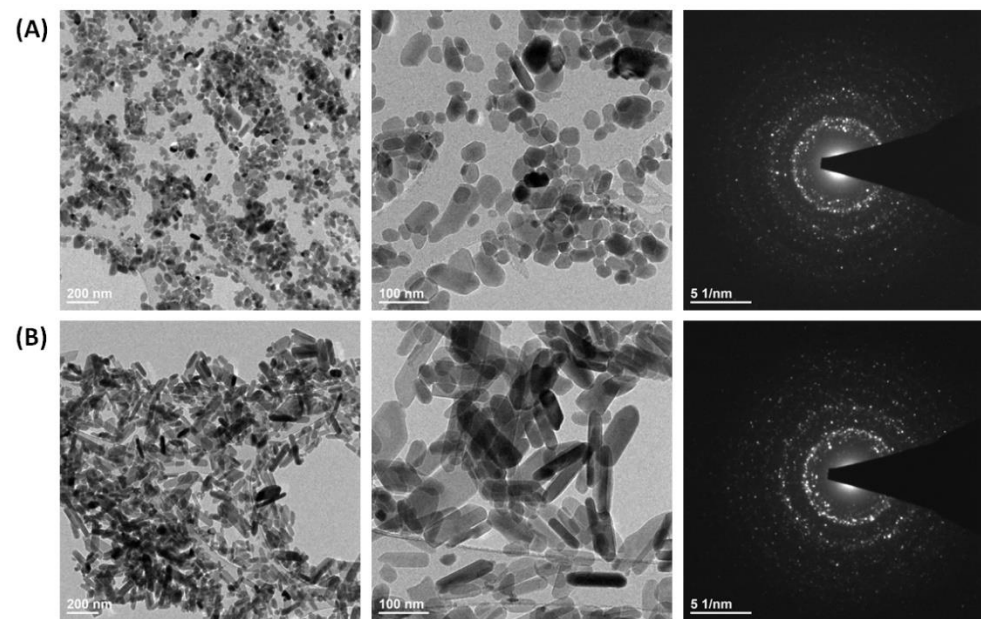


Figure 4. TEM images and SAED images of (A) $\text{Ca}_{9.8}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_{0.1}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (B) $\text{Ca}_{9.7}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_{0.2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

3.2. Investigation of Luminescence Properties

The results obtained by X-ray diffractometry (Figure 1A,B), clearly showed the crystalline hydroxyapatite structure appearance among the obtained nanopowders. However, there is an observed second phase for the hydroxyapatite-based compounds doped with 1 and 2 mol% of Eu^{3+} ions and co-doped with 3 mol% and more of Rb^+ ions. As mentioned earlier, the presence of the second phase may indicate the appearance of RbH_2PO_4 in the mentioned samples. The XRD results seem to be confirmed also by Inductive Coupled Plasma Mass Spectroscopy (Table 1). Therefore, emission and excitation spectra for all obtained samples were recorded to establish whether the presence of the assumed RbH_2PO_4 has an influence on the luminescence properties of rubidium(I) and europium(III) co-doped nano-hydroxyapatite powder materials.

The presence of europium(III) ions incorporated into the structure of hydroxyapatites was confirmed with luminescence studies. Samples were excited with 393.5 nm light to obtain emission spectra characteristic for Eu^{3+} ions. High quality emission spectra in the range of red-orange light were obtained for both 1% and 2% Eu^{3+} ions doped hydroxyapatites and co-doped with various concentration of Rb^+ ions (Figure 5A,B). For the first series of compounds ($\text{Ca}_{10-(0.1+x)}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), five peaks are present as shown in Figure 5A. These peaks are present at 573.7 nm; 586.7 nm ($\text{Rb}_x \leq 3$)/588.8 nm ($\text{Rb}_x \geq 5$); 616.7 nm; 650.3 nm; 697.5 nm ($\text{Rb}_x \geq 5$)/700.2 nm ($\text{Rb}_x \leq 3$). The second series of obtained materials ($\text{Ca}_{10-(0.2+x)}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) show five emission peaks in Figure 5B. These are at wavelengths of 573.6 nm; 586.7 nm ($\text{Rb}_x \geq 3$)/ 589.6 nm ($\text{Rb}_x \leq 2$); 616.7 nm; 650.9 nm ($\text{Rb}_x \geq 3$)/654.2 nm ($\text{Rb}_x \leq 2$); 697.6 nm ($\text{Rb}_x \geq 3$)/700.5 nm ($\text{Rb}_x \leq 2$). These peaks characterize the transition from the excited level of $^5\text{D}_0$ to the levels of $^7\text{F}_{0-4}$ of Eu^{3+} ions [15]. The transitions are assigned respectively as: $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_3$, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$, with increasing wavelength value [15,35,36]. Figure 5A,B, show the most intense peak corresponding to the $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ transition. The peaks corresponding to this transition are observed at wavelengths in the range of 605–630 nm, with a maximum intensity at 616.7 nm [9,10,15,37]. Furthermore, the strictly forbidden transition of Eu^{3+} ion from the level $^5\text{D}_0$ to $^7\text{F}_0$ is well observed. The appearance of forbidden transition, according to the Judd-Ofelt theory, is a perfect example of the violation of selection rules. The most possible explanation of such Judd-Ofelt theory breakdown is that this transition is caused by crystal field perturbation, known also as J-mixing. Forbidden transition from level $^5\text{D}_0$

to 7F_0 can be also due to mixing of low-lying the charge-transfer states [38,39]. Intriguingly, some correlation exists between these two mechanisms, since J-mixing is increased by strong crystal-field effects, indicating these two effects can be interdependent [15,39]. The observation of the transition 0–0 indicates that Eu^{3+} ions occupy sites with the local symmetry of C_n , C_{nv} , C_s , where “n” equals 1, 2, 3, 4, 6. This agrees with the theory that transition occurs only in the point symmetries that contain the linear terms in the crystal field Hamiltonian [38,39]. Nonetheless, three distinct splits of the transition 5D_0 to 7F_0 are observed among all obtained nanopowders, as shown in Figure 5A,B. Results indicate that Eu^{3+} ions can occupy three different crystallographic sites in the hydroxyapatite-based host lattice [40]. It is worth mentioning that the occupancy of the crystallographic sites changes when concentration of Rb^+ ions increase. This is especially notable when rubidium ions concentration is equal to or greater than 2 mol%. Changes in the transition 0–0 observed for obtained nanopowder materials (Figure 5A,B) may indicate, that by substituting Ca^{2+} by Eu^{3+} and by Rb^+ creates a charge imbalance, leading to lattice distortion [38]. The charge imbalance and difference between ionic radii of Ca^{2+} , Eu^{3+} and Rb^+ ions, as mentioned in paragraph 3.1., can lead to various defects creation in the hydroxyapatite host lattice. Cationic dopants such Eu^{3+} ions or Rb^+ ions may typically substitute into two distinct Ca^{2+} sites in the hydroxyapatite structure: Ca_1 and Ca_2 with the site symmetry C_3 and C_s , respectively. Analyzing 0–0 transition can help determine which site Ca_1 or Ca_2 is preferable by Eu^{3+} ions [41]. Among both groups of obtained compounds, Eu^{3+} ions clearly showed more affinity to occupy the Ca_2 site in samples which contain less than 5 mol% of Rb^+ ions (Figure 5A,B). The results indicate that doped Rb^+ ions clearly affect structure of the hydroxyapatite lattice and, therefore, Eu^{3+} occupancy sites in the host lattice. This leads to changes of the ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ transition. The appearance of the 5D_0 to 7F_1 directly refers to crystal-field splitting of the 7F_1 level [15,17]. Observation of magnetic dipole transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ showed the occurrence of more than three distinct lines indicative of the presence of more than one equivalent site for the europium(III) ions. All representative samples of Eu^{3+} and Rb^+ ions co-doped hydroxyapatite nanopowder materials exhibit such features (Figure 5A,B). Nonetheless, according to the literature magnetic dipole transition is nearly independent of alteration in the local environment of Eu^{3+} ions in the crystal lattice. This work shows some changes of the transition are observed for the samples which contain 5 mol% and more of Rb^+ ions. Hence, such reshaping of the ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ transition may indicate lattice disruption of these representatives [36]. Hypertensive transition, known as the ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ transition, presents similar tendency with respect to the shape alterations, which can be observed in the Figure 5A,B. Contrary to magnetic dipole transition, hypertensive transition is strongly affected even by slight changes in the local environment of Eu^{3+} ions in the host lattice [15,36,42]. Therefore, analysis of the reshaped transition leads to the conclusion that Rb^+ ions strongly affect the host lattice of obtained nanopowders. This is especially notable among the samples which are co-doped with 3 mol% and more of Rb^+ ions.

The excitation spectra were measured in the wavelength range of 250–550 nm, for which the emission was monitored at 616.7 nm. The first series of compounds $\text{Ca}_{10-(0.1+x)}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, where $x = 0.5; 1; 2; 3; 5; 7$ mol% showed peaks from transitions distinct to Eu^{3+} ions. These are transitions ${}^7F_0 \rightarrow {}^5H_{(3-7)}$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_4$ and ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_8$ as well as transitions ${}^7F_0 \rightarrow {}^5G_{(2,3)}$ and ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_7$. Moreover, for this group of nanopowders, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_2$, and ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_1$ transitions were also recorded (Figure 6A). Interestingly, among the first series of compounds, samples co-doped with 1 mol% of Eu^{3+} ions and 3, 5, and 7 mol% of Rb^+ ions exhibited additional transitions from the level ${}^7F_0 \rightarrow {}^5F_{(4-1)}$ and ${}^7F_0 \rightarrow {}^3P_0$. These transitions were recorded only for these three compounds of first series (Figure 6A). More notably, pure hydroxyapatite doped only with 1 mol% of Eu^{3+} ions lacked these transitions (Figure 6A). The intensities of respective transitions change and exhibit dependence on the rubidium(I) concentration. The results show enhanced intensities of individual transitions ${}^7F_0 \rightarrow {}^5H_{(7-3)}$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_4$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_8$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5G_{(2,3)}$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_7$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_2$, and ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_1$ as Rb^+ ion concentration increases. This

trend is especially notable for the following transitions: ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_4$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_8$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_2$, and ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_1$. In the spectra recorded for samples co-doped with 1 mol% of Eu^{3+} and 0.5–7 mol% of Rb^+ ions, an intense peak is visible at approximately 270 nm. This distinct transition corresponds to the charge transfer (CT) of an electron between the ionized oxygen atom and the europium ion ($\text{O}_2^- \rightarrow \text{Eu}^{3+}$) [17,36,42]. Our results are consistent with other results which provided data of charge transfer between O_2^- and Eu^{3+} ions in the hydroxyapatite structure. As shown in Figure 6A, there is a trend of increasing CT from O_2^- to Eu^{3+} as rubidium(I) ion concentration increases. The spectra obtained for second series of compounds showed similar peaks representative of transitions distinct to Eu^{3+} ions. These transitions are: ${}^7F_0 \rightarrow {}^5H_{(7-3)}$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_4$, and ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_8$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5G_{(2,3)}$, and ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_7$ as well as transitions ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$, ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_2$, and ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_1$ (Figure 6B). As opposed to the first series of compounds, the second series showed transition from the level ${}^7F_0 \rightarrow {}^5F_{(4-1)}$ and ${}^7F_0 \rightarrow {}^3P_0$ in all samples. This may indicate that increased concentration of Eu^{3+} enhances these transitions. The spectra also showed an increased intensity of CT from oxygen to europium for the samples which contain 2, 3, 5, 7 mol% of Rb^+ ions. Previous studies of similar material agree with our results [40,42]. Moreover, the charge transfer from oxygen to europium seems to be slightly shifted toward the highest wavelength number. However, this could be caused by the incorporation of the rubidium ions into the hydroxyapatite crystal lattice. The peak positions for the excitation and emission spectra are consistent with those expected for Eu^{3+} ions incorporated into calcium(II) ions sites in the hydroxyapatite lattice [40,43–46].

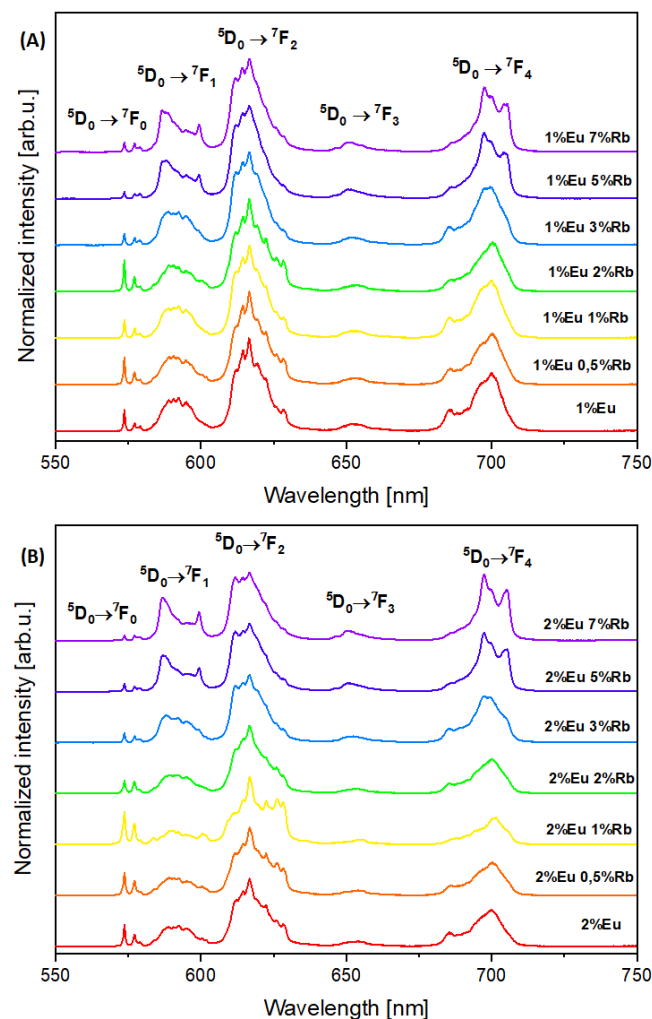


Figure 5. Emission spectra of (A) $\text{Ca}_{10-(0.1+x)}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ and (B) $\text{Ca}_{10-(0.2+x)}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, where x equals 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 mol% of Rb^+ ions.

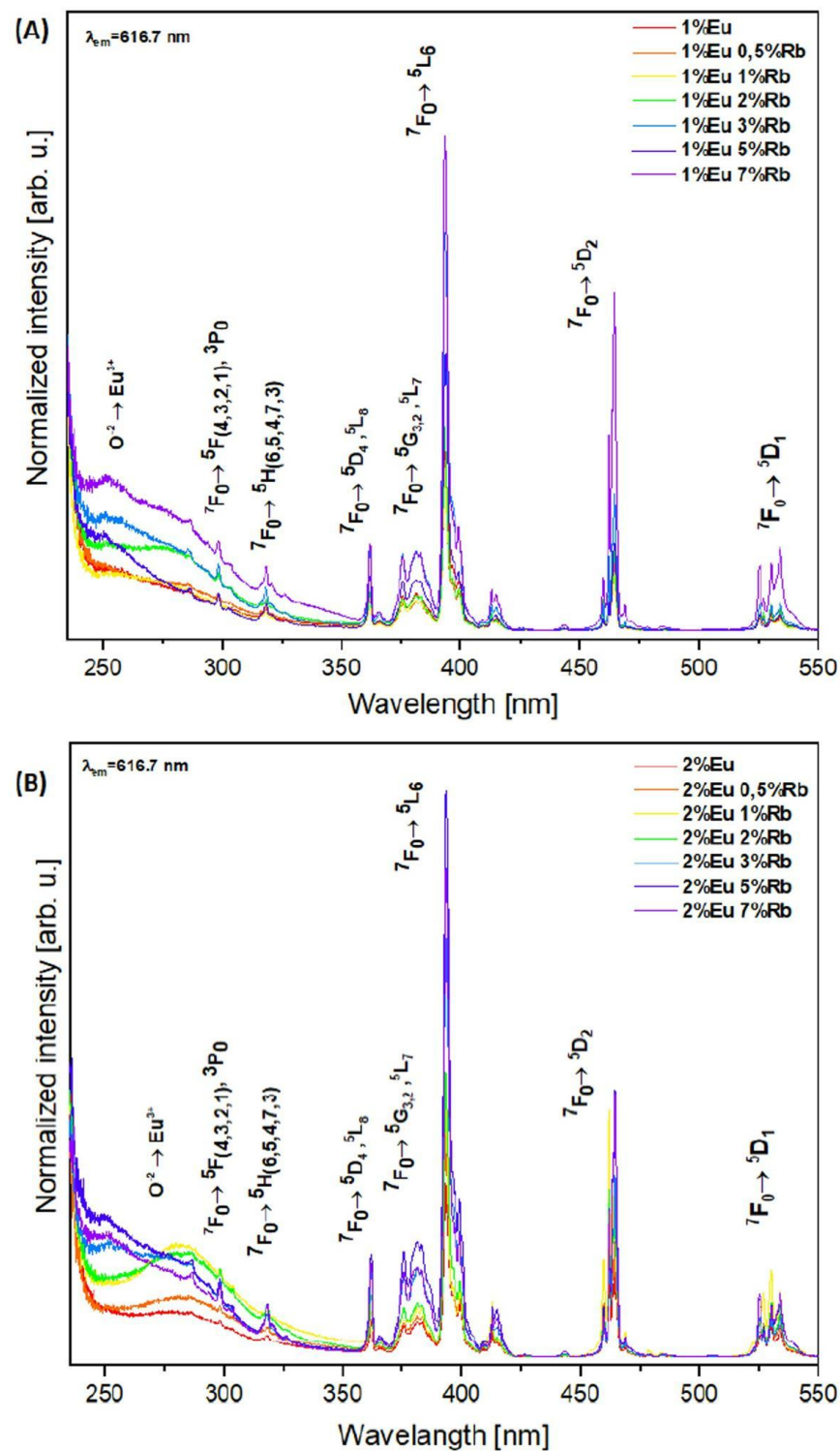


Figure 6. Excitation spectra of (A) $\text{Ca}_{10 - (0.1 + x)}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ and (B) $\text{Ca}_{10 - (0.2 + x)}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, where x equals 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 mol% of Rb^+ ions.

To evaluate the influence of Rb^+ ions on the fluorescence lifetime and luminescence kinetics of Eu^{3+} doped hydroxyapatite materials, the luminescence decay profiles were recorded for both series of materials (Figure 7A,B). The luminescence kinetics for both series showed strong correlation between the lifetime of Eu^{3+} ions and the concentration of co-doped Rb^+ ions in the hydroxyapatite crystal lattice (Figure 7A,B). It should be noted that among samples containing 1 mol% of Eu^{3+} ions, increasing concentrations of

rubidium(I) ions led to elongated lifetime of Eu^{3+} ion-related luminescence (Figure 7A). There is a similar correlation for the samples containing 2 mol% of Eu^{3+} ions. However, this tendency is limited to samples containing 3 mol% or less of co-doped Rb^+ ions (Figure 7B). Samples which are co-doped with 5 mol% and 7 mol% of Rb^+ ions showed a decrease in luminescence relative to the other samples. This may indicate that hydroxyapatite nanopowders exhibit quenching when co-doped with 2 mol% of Eu^{3+} ions and more than 3 mol% of Rb^+ ions.

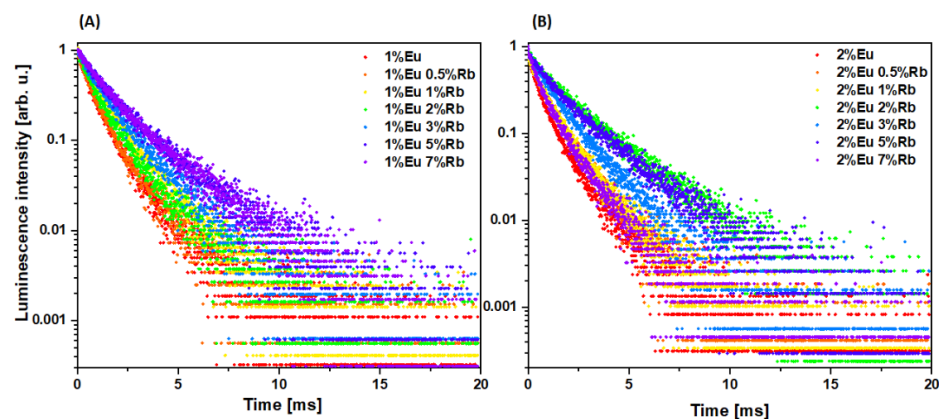


Figure 7. Luminescence decay profiles of (A) $\text{Ca}_{10 - (0.1 + x)}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ and (B) $\text{Ca}_{10 - (0.2 + x)}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, where x equals 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 mol% of Rb^+ ions.

3.3. Evaluation of Biological Properties

3.3.1. Biocompatibility of Obtained Compounds

Both series of compounds exhibit full cytocompatibility toward mouse osteoblasts after 24 h of incubation. The highest tested concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cells showed viability maintained at 80% and more, which is above IC_{50} (Figure 8). First series of compound showed that the most intensive proliferation rate for the HAp sample containing 1 mol% of Eu^{3+} and 2 mol% of Rb^+ ions, where 140% of cell viability is observed at the final concentration of compound 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A small drop-in proliferation rate is observed when sample concentration increases to 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. However, viability is still maintained well above 100% relative to the negative control. The optimal concentration of nanoparticles for mouse osteoblasts viability is 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for HAp doped with 1 mol% of Eu^{3+} and 2 mol% of Rb^+ ions, HAp doped with 1 mol% of Eu^{3+} and 3 mol% of Rb^+ ions, and HAp doped with 1 mol% of Eu^{3+} 7 mol% of Rb^+ ions (Figure 8A). While concentration 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ is suitable for cells for almost all tested powder materials. For the second series of tested materials 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seems to be also the most adequate to promote cells viability. For the second series of doped HAp compounds, concentrations of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -maintained cell viability at or above 120% (Figure 8B). Our results fully agree with existing studies where hydroxyapatite doped with Rb^+ ions were obtained and promoted proliferation of MG-63 osteosarcoma cell line in the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [47]. However, these compounds and their concentration should be chosen carefully, as one must consider the corresponding increased viability of cancer cells. Another study also confirmed the biocompatibility of rubidium-coated mesoporous glass ceramics and corroborated enhanced adhesion and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells (HBMSCs) [48]. Similarly, our study confirmed full cytocompatibility toward normal bone cell line, which indicates that our powder materials can be used in future studies, such as and in vivo mouse model.

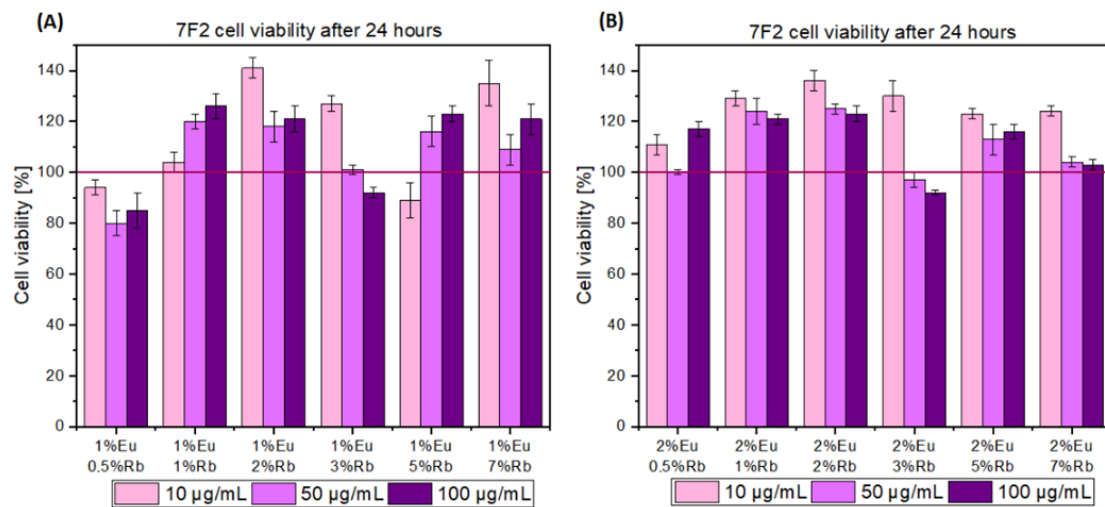


Figure 8. MTT cytotoxicity assay of (A) $\text{Ca}_{10-(0.1+x)}\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ and (B) $\text{Ca}_{10-(0.2+x)}\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, where x equals 0.5, 1, 2, 3 mol% of Rb^+ ions. The final concentration of the tested compounds was established at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Red bar marked as 100% of cell viability in the negative control probe.

In addition to the viability assessment of nanopowders, the influence of rubidium ions on proliferation rate of mouse osteoblasts cell lines was investigated (Figure 9). Various concentrations of RbCl were used to evaluate 7F2 cell line viability after 24 h of incubation. It appeared that all tested concentrations of RbCl solution positively affected viability of 7F2 cell line relative to untreated cells, which were established as negative control (Figure 9). Cells treated with 1 mM of RbCl showed around 140% viability, and a gradual increase in viability was observed with increasing RbCl concentration. Remarkably, 7F2 cells treated with the highest tested concentration of 5 mM RbCl exhibited viability above 200% relative to the negative control. Furthermore, our results confirmed those of previous studies, which tested RbCl toward primary murine bone marrow monocytes (BMMs) [14]. This research also illustrated the impact of RbCl on osteoclastogenesis and osteoblastogenesis by affecting Jnk and p38-mediated NF- κ B activation. By the inhibition of RANKL-induced expression, RbCl attenuate osteoclast marker genes and impairs osteoclastogenesis. Despite the RbCl elevated ALP (alkaline phosphatase) activity and therefore the process of mineralization on both in vitro and in vivo level [14].

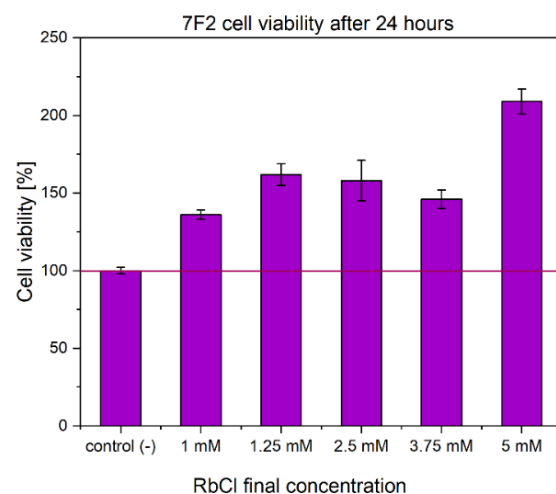


Figure 9. MTT cytotoxicity assay of RbCl towards mouse osteoblasts. Red bar marked as 100% of cell viability in the negative control probe.

Cell morphology and the ratio of live and dead mouse osteoblasts cells were visualized after 24 h incubation with both series of obtained nanopowders having a final concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 10). The results of this experiments agreed with the results obtained in the MTT viability assay and clearly showed that morphology and live/dead ratio of 7F2 cell line is the same as those of cells observed in the negative control (untreated cells). Therefore, captured images confirmed results of previously conducted viability assay. Furthermore, unaltered spindle shape of cells and undisturbed cell membrane are comparable to those in the negative control. This indicates full cytocompatibility of synthesized nanopowders (Figure 10).

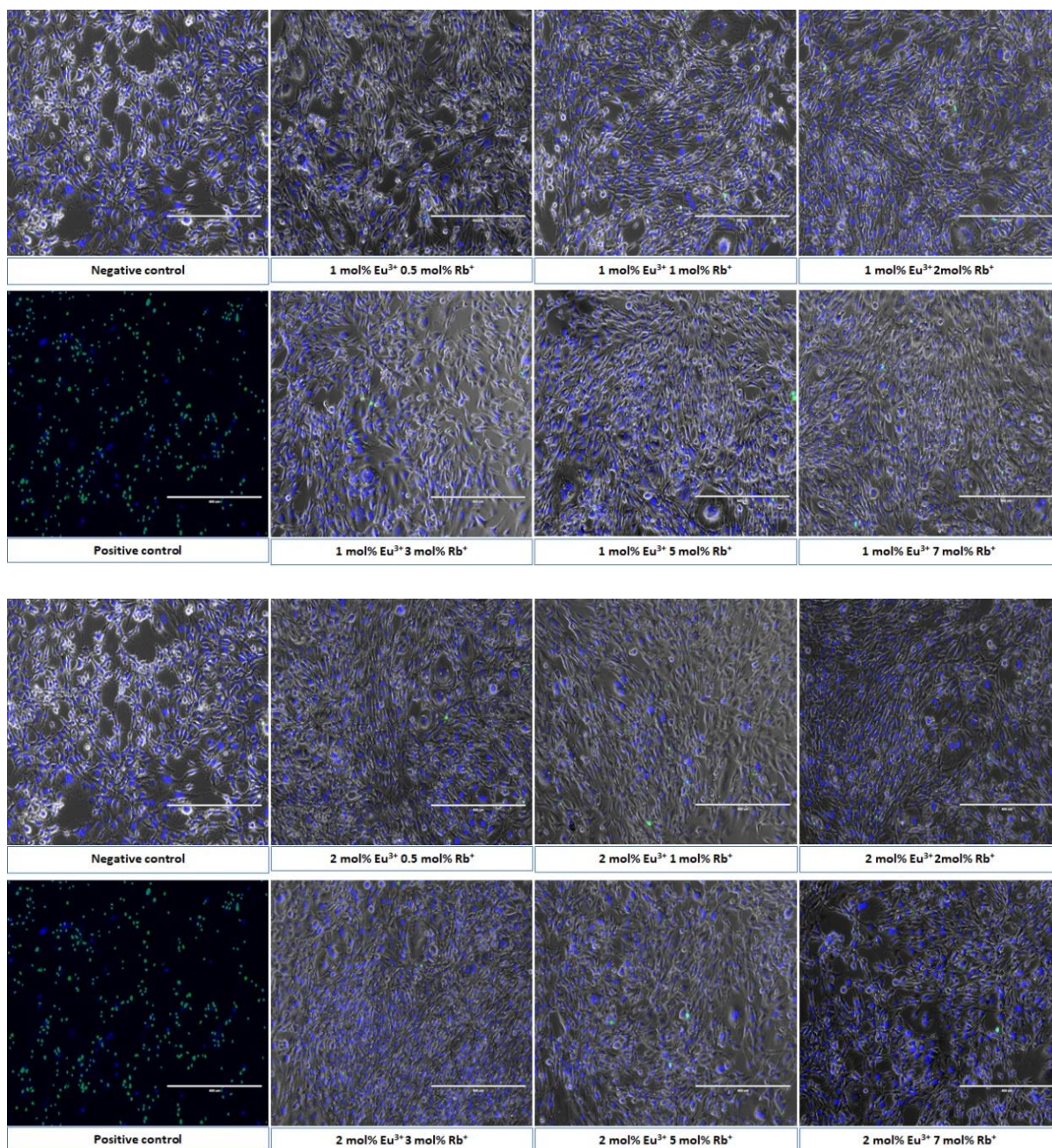


Figure 10. Mouse osteoblasts morphology after 24 h of incubation with both series of compounds $\text{Ca}_{10} - (0.1 + x)\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{10} - (0.2 + x)\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, where $x = 0.5; 1; 2; 3; 5; 7$ mol%) at the final concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The morphology was compared with negative control (PBS buffer) and positive control (1% H_2O_2). Scale bar equals 400 μm .

3.3.2. Evaluation of Hemocompatibility

The hemocompatibility of obtained nanopowders was established in two steps. First, the hemolysis assay was conducted. This was carried out by incubating the purified red blood cells with two different final concentrations of nanopowders: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. To established positive control, red blood cells were incubated with 10% SDS solution (100% hemolysis). A negative control was established by incubating red blood cells with sterile PBS solution. The incubation period was set up at 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. After the established incubation time, the amount of released hemoglobin was measured. As it was confirmed in another study, the 5% of released hemoglobin is commonly acceptable as a naturally occurring hemolysis in the blood system and above this critical point, tested compounds can be classified as potentially harmful toward mammalian erythrocytes [49]. Therefore, hemolysis assay results clearly indicate the hemocompatibility of the presented materials in both tested concentrations (Figure 11). All materials showed hemoglobin release at the level below the critical point of 5% and the results were fully comparable with negative control. Even the standard deviation bars did not cross the critical point (5% of hemolysis) (Figure 11A,B).

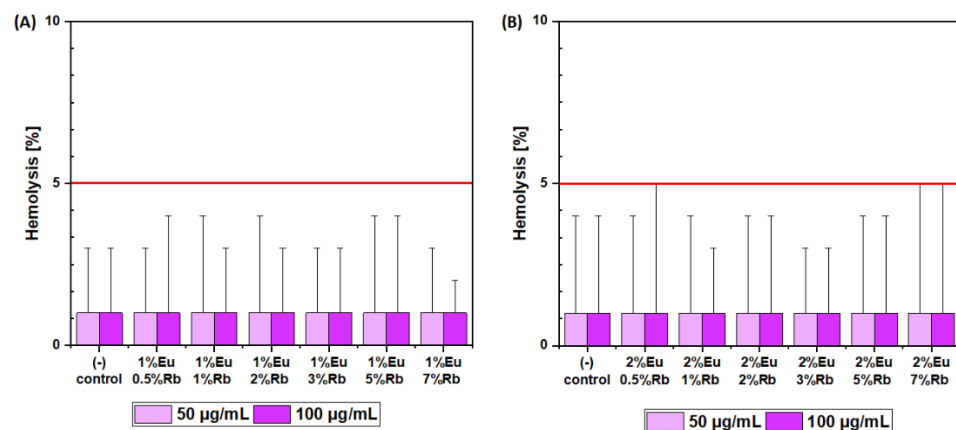


Figure 11. Hemoglobin release after 24 h incubation in (A) $\text{Ca}_{10} - (0.1 + x)\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ and (B) $\text{Ca}_{10} - (0.2 + x)\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, where x equals 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 mol% of Rb^+ ions. The red line is equal to 5% of physiological hemoglobin release. The results were compared with red blood cells treated with PBS buffer (1% of hemolysis—negative control) and 1% SDS (100% of hemolysis—positive control).

To confirm the hemocompatibility of the tested materials, the morphology of red blood cells was visualized after 24 h of incubation by performing blood smear. The results of this experiment confirmed the results from the hemolysis assay. Since the results of hemolysis assay showed hemocompatibility of both tested concentrations (50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cell morphology visualization was performed after treatment with the highest tested concentration of obtained nanomaterials. No morphological changes of erythrocytes were observed after incubation with both series of doped HAp samples at the final concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The smooth and round shape of the erythrocytes exhibited no membrane disruption or shape alteration. These results are consistent with the negative control (Figure 12). Despite differences between the sedimentation rate of the hydroxyapatite-based materials (in distilled water 12.320 ± 1.003 mm/min— 35.130 ± 2.147 mm/min) and red blood cells (in adult sheep erythrocytes, the sedimentation rate was estimated at 0.0333 to 0.0417 mm/min), which could contribute to friction and mechanical damage of erythrocytes, no harmful effect was observed [50,51].

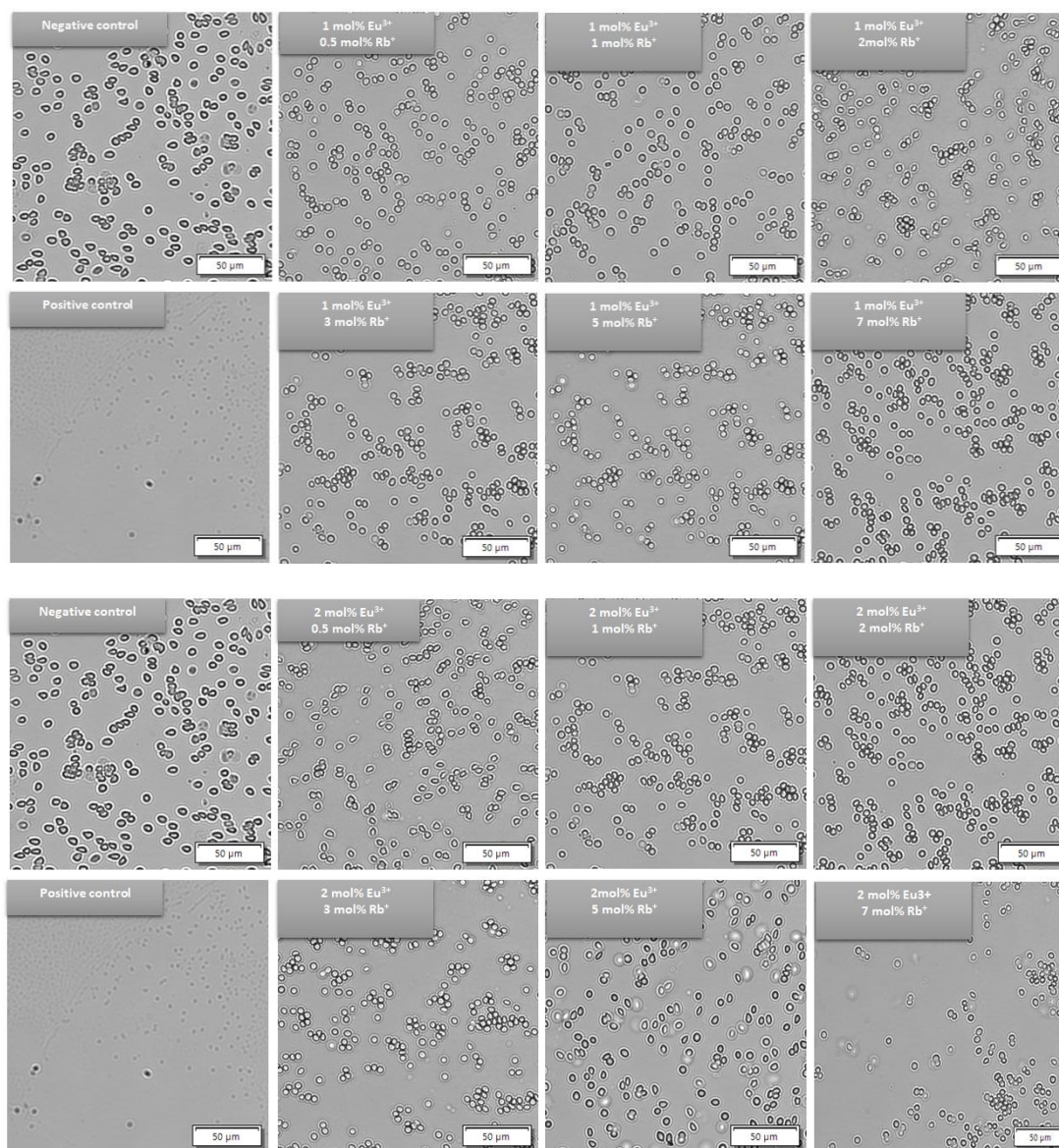


Figure 12. Red blood cell morphology after 24 h of incubation both series of compounds $\text{Ca}_{10} - (0.1 + x)\text{Eu}_{0.1}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ and $\text{Ca}_{10} - (0.2 + x)\text{Eu}_{0.2}\text{Rb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, where $x = 0.5; 1; 2; 3; 5; 7$ mol%) at the final concentration $100 \mu\text{g}/\text{mL}$. The morphology of red blood cells was compared with negative control (PBS buffer) and positive control (1% SDS).

4. Conclusions

This paper presents the structural characterization, luminescence, and biological properties of nanopowder hydroxyapatite materials co-doped with 1 mol% and 2 mol% of Eu^{3+} ions and various concentrations of Rb^+ ions (0.5; 1; 2; 3; 5; 7 mol%). The samples were obtained via the hydrothermal method and thermally treated at 500°C . They exhibited hydroxyapatite hexagonal structure. However, the structural results (XRPD—X-ray powder diffraction) indicated a slight signal from a secondary phase in samples containing more than 2 mol% of Rb^+ ions. XRD in conjunction with ICP-OES confirmed that the signal of the secondary phase is RbH_2PO_4 . Therefore, we confirmed that Eu^{3+} ions do not influence the hydroxyapatite lattice. Elevated molar concentrations of Rb^+ ions, however, lead to the formation of a secondary phase. On the other hand, FT-IR spectra of obtained materials are consistent with spectra for pure hydroxyapatite powder materials. Hence, hydroxyapatite structure remains but it is contaminated with the secondary phase, identified as RbH_2PO_4 .

The luminescence study showed the characteristic red-orange emission spectra of Eu^{3+} ions incorporated into the materials. While distinctive emission of europium(III) remains consistent among all samples, it can be noted that 0–1, 0–2, and 0–4 transitions increase with higher concentration of Rb^+ dopant ions. These results reflect those obtained by measuring Eu^{3+} lifetime. Our study confirmed that incorporation of rubidium(I) ions into hydroxyapatite lattice leads to elongation of the luminescence lifetime of Eu^{3+} ions in the matrix. This can be promising factor when considering applications of the obtained compounds in the bioimaging field. Clearly, further investigation is required, especially considering in vitro and in vivo bioimaging tests. Finally, cytotoxicity and hemolysis assays results confirmed the biocompatibility and hemocompatibility of the synthesized samples toward mouse osteoblasts and sheep erythrocytes. This was confirmed for the highest tested concentrations of our nanopowders. Yet, further cytotoxicity tests should be provided in future research. This should be conducted to evaluate the compatibility of synthesized compounds with different cell lines such as dermal fibroblasts or keratinocyte cell lines. More importantly, these materials should be tested against cancer cell lines to exclude potential cancerogenous features. Hydroxyapatite materials co-doped with 1 mol% and 2 mol% of Eu^{3+} ions and various concentration of Rb^+ ions are promising materials for biomedical applications, especially with respect to bone regenerative medicine.

Author Contributions: Conceptualization, N.N. and R.J.W.; methodology, N.N., D.C. and R.J.W.; software, N.N. and D.C.; validation, N.N., D.C., J.M.R. and R.J.W.; formal analysis, N.N. and D.C.; investigation, N.N., D.C. and R.J.W.; resources, N.N. and R.J.W.; data curation, N.N., D.C. and R.J.W.; writing—original draft preparation, N.N., D.C., J.M.R. and R.J.W.; writing—review and editing, N.N., D.C., J.M.R. and R.J.W.; visualization, N.N. and D.C.; supervision, R.J.W.; project administration, R.J.W.; funding acquisition, R.J.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors would like to acknowledge the National Science Centre Poland (NCN) for financial support within the Project ‘Biocompatible materials with theranostics’ properties for precision medical application’ (No. UMO-2021/43/B/ST5/02960). “The APC was funded by Gmina Wrocław–Urząd Miejski Wrocławia under agreement No. DOT-BWU-72/2022”.

Data Availability Statement: Data are available from the authors upon request.

Acknowledgments: We are grateful to E. Bukowska for XRPD measurements and to D. Szymanski for SEM-EDS spectra as well as Piotr Wozniak for TEM images.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Awasthi, S.; Pandey, S.K.; Arunan, E.; Srivastava, C. A Review on Hydroxyapatite Coatings for the Biomedical Applications: Experimental and Theoretical Perspectives. *J. Mater. Chem. B* **2021**, *9*, 228–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Majhooll, A.A.; Zainol, I.; Jaafar, C.N.A.; Alsailawi, H.A.; Hassan, M.Z.; Mudhafar, M.; Majhool, A.A.; Asaad, A. A Brief Review on Biomedical Applications of Hydroxyapatite Use as Fillers in Polymer. *J. Chem. Chem. Eng.* **2019**, *13*, 112–119. [[CrossRef](#)]
3. Fiume, E.; Magnaterra, G.; Rahdar, A.; Verné, E.; Baino, F. Hydroxyapatite for Biomedical Applications: A Short Overview. *Ceramics* **2021**, *4*, 542–563. [[CrossRef](#)]
4. Szcześ, A.; Hołysz, L.; Chibowski, E. Synthesis of Hydroxyapatite for Biomedical Applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *249*, 321–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Khojasteh, A.; Motamedian, S.R.; Rad, M.R.; Shahriari, M.H.; Nadjmi, N. Polymeric vs Hydroxyapatite-Based Scaffolds on Dental Pulp Stem Cell Proliferation and Differentiation. *World World J. Stem Cells* **2015**, *7*, 1215–1221. [[CrossRef](#)]
6. Harrowfield, J.M.; Ogden, M.I.; Richmond, W.R.; White, A.H. Lanthanide Ions as Calcium Substitutes: A Structural Comparison of Europium and Calcium Complexes of a Ditopic Calixarene. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1991**, *8*, 2153–2160. [[CrossRef](#)]
7. Victor, S.P.; Gayathri Devi, M.G.; Paul, W.; Vijayan, V.M.; Muthu, J.; Sharma, C.P. Europium Doped Calcium Deficient Hydroxyapatite as Theranostic Nanoplatfroms: Effect of Structure and Aspect Ratio. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3*, 3588–3595. [[CrossRef](#)]
8. Kandarakis, I.; Cavouras, D.; Panayiotakis, G.S.; Triantis, D.; Nomicos, C.D. Europium-Activated Phosphors for Use in X-Ray Detectors of Medical Imaging Systems. *Eur. Radiol.* **1998**, *8*, 313–318. [[CrossRef](#)]
9. Yang, P.; Quan, Z.; Li, C.; Kang, X.; Lian, H.; Lin, J. Bioactive, Luminescent and Mesoporous Europium-Doped Hydroxyapatite as a Drug Carrier. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4341–4347. [[CrossRef](#)]

10. Han, Y.; Wang, X.; Li, S. Biocompatible Europium Doped Hydroxyapatite Nanoparticles as a Biological Fluorescent Probe. *Curr. Nanosci.* **2010**, *6*, 178–183. [[CrossRef](#)]
11. Escudero, A.; Calvo, M.E.; Rivera-ferna, S. Microwave-Assisted Synthesis of Biocompatible Europium-Doped Calcium Hydroxyapatite and Fluoroapatite Luminescent Nanospindles Functionalized with Poly(acrylic acid). *Langmuir* **2013**, *29*, 1985–1994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Rahimi, N.; Hassanipour, M.; Yarmohammadi, F.; Faghir-Ghanesefat, H.; Pourshadi, N.; Bahramnejad, E.; Dehpour, A.R. Nitric Oxide and Glutamate Are Contributors of Anti-Seizure Activity of Rubidium Chloride: A Comparison with Lithium. *Neurosci. Lett.* **2019**, *708*, 134349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kordjazzy, N.; Haj-Mirzaian, A.; Amiri, S.; Ostadhadi, S.; Kordjazzy, M.; Sharifzadeh, M.; Dehpour, A.R. Elevated Level of Nitric Oxide Mediates the Anti-Depressant Effect of Rubidium Chloride in Mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *762*, 411–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ouyang, Z.; Huang, Q.; Liu, B.; Wu, H.; Liu, T.; Liu, Y. Rubidium Chloride Targets JNK/P38-Mediated NF-KB Activation to Attenuate Osteoclastogenesis and Facilitate Osteoblastogenesis. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Binnemans, K. Interpretation of Europium(III) Spectra. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *295*, 1–45. [[CrossRef](#)]
16. Cacciotti, I.; Bianco, A.; Pezzotti, G.; Gusmano, G. Synthesis, Thermal Behaviour and Luminescence Properties of Rare Earth-Doped Titania Nanofibers. *Chem. Eng. J.* **2011**, *166*, 751–764. [[CrossRef](#)]
17. Werts, M.H.V.; Jukes, R.T.F.; Verhoeven, J.W. The Emission Spectrum and the Radiative Lifetime of Eu^{3+} in Luminescent Lanthanide Complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*, 1542–1548. [[CrossRef](#)]
18. Gaydamaka, A.A.; Ponomareva, V.G.; Bagryantseva, I.N. Phase Composition, Thermal and Transport Properties of the System Based on the Mono- and Dihydrogen Phosphates of Rubidium. *Solid State Ionics* **2019**, *329*, 124–130. [[CrossRef](#)]
19. Komornikov, V.A.; Grebenev, V.V.; Andreev, P.V.; Dmitricheva, E.V. Study of Phase Equilibria in the $\text{Rb}_3\text{H}(\text{SO}_4)_2\text{-RbH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ System. *Crystallogr. Rep.* **2015**, *60*, 431–437. [[CrossRef](#)]
20. Hoy, R.F.; Chambers, D.C. Silica-Related Diseases in the Modern World. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2020**, *75*, 2805–2817. [[CrossRef](#)]
21. Szyszka, K.; Targońska, S.; Lewińska, A.; Watras, A.; Wiglusz, R.J. Quenching of the Eu_3^{3+} Luminescence by Cu^{2+} Ions in the Nanosized Hydroxyapatite Designed for Future Bio-Detection. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ressler, A.; Žužič, A.; Ivanišević, I.; Kamboj, N.; Ivanković, H. Ionic Substituted Hydroxyapatite for Bone Regeneration Applications: A Review. *Open Ceram.* **2021**, *6*, 100122. [[CrossRef](#)]
23. Shannon, R.D. Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides. *Acta Crystallogr. Sect. A* **1976**, *32*, 751–767. [[CrossRef](#)]
24. Odusote, J.K.; Danyuo, Y.; Baruwa, A.D.; Azeez, A.A. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite from Bovine Bone for Production of Dental Implants. *Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2019**, *17*. [[CrossRef](#)]
25. Sari, M.; Hening, P.; Chotimah; Ana, I.D.; Yusuf, Y. Bioceramic Hydroxyapatite-Based Scaffold with a Porous Structure Using Honeycomb as a Natural Polymeric Porogen for Bone Tissue Engineering. *Biomater. Res.* **2021**, *25*, 2. [[CrossRef](#)]
26. Gheisari, H.; Karamian, E.; Abdollahi, M. A Novel Hydroxyapatite-Hardystonite Nanocomposite Ceramic. *Ceram. Int.* **2015**, *41*, 5967–5975. [[CrossRef](#)]
27. Hanifi, A.; Fathi, M.H. Bioresorbability Evaluation of Hydroxyapatite Nanopowders in a Stimulated Body Fluid Medium. *Iran. J. Pharm. Sci.* **2008**, *4*, 141–148.
28. Ciobanu, C.S.; Iconaru, S.L.; Massuyeau, F.; Constantin, L.V.; Costescu, A.; Predoi, D. Synthesis, Structure, and Luminescent Properties of Europium-Doped Hydroxyapatite Nanocrystalline Powders. *J. Nanomater.* **2012**, *2012*, 942801. [[CrossRef](#)]
29. Saville, A.I.; Creuziger, A.; Mitchell, E.B.; Vogel, S.C.; Benzing, J.T.; Klemm-Toole, J.; Clarke, K.D.; Clarke, A.J. MAUD Rietveld Refinement Software for Neutron Diffraction Texture Studies of Single- and Dual-Phase Materials. *Integr. Mater. Manuf. Innov.* **2021**, *10*, 461–487. [[CrossRef](#)]
30. Longo, E.; de Almeida La Porta, F. *Recent Advances in Complex Functional Materials: From Design to Application*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; ISBN 9783319538983.
31. Jaggi, N. *Handbook of Applied Solid State Spectroscopy*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2006; ISBN 0387375902.
32. Wilschefski, S.C.; Baxter, M.R. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin. Biochem. Rev.* **2019**, *40*, 115–133. [[CrossRef](#)]
33. Suvorova, E.I.; Buffat, P.A. Electron Diffraction from Micro- and Nanoparticles of Hydroxyapatite. *J. Microsc.* **1999**, *196*, 46–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zhuang, Z.; Miki, T.; Yumoto, M.; Konishi, T.; Aizawa, M. Ultrastructural Observation of Hydroxyapatite Ceramics with Preferred Orientation to A-Plane Using High-Resolution Transmission Electron Microscopy. *Procedia Eng.* **2012**, *36*, 121–127. [[CrossRef](#)]
35. Maciejewska, K.; Poźniak, B.; Tikhomirov, M.; Kobylińska, A.; Marciniak, L. Synthesis, Cytotoxicity Assessment and Optical Properties Characterization of Colloidal $\text{Gdpo}_4\text{:Mn}^{2+}$, Eu^{3+} for High Sensitivity Luminescent Nanothermometers Operating in the Physiological Temperature Range. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Szyszka, K.; Targonska, S.; Gazinska, M.; Szustakiewicz, K.; Wiglusz, R.J. The Comprehensive Approach to Preparation and Investigation of the Eu^{3+} Doped Hydroxyapatite/Poly(L-Lactide) Nanocomposites: Promising Materials for Theranostics Application. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1146. [[CrossRef](#)]

37. García Domínguez, G.; Garrido Hernández, A.; Cerón Montes, G.; Morales Ramírez, A.J.; de la Torre, S.D. Structural and Luminescent Properties of Europium-Doped and Undoped Hydroxyapatite Powders Sintered by Spark Plasma. *Ceram. Silik.* **2019**, *63*, 100–109. [[CrossRef](#)]
38. Chen, X.Y.; Liu, G.K. The Standard and Anomalous Crystal-Field Spectra of Eu^{3+} . *J. Solid State Chem.* **2005**, *178*, 419–428. [[CrossRef](#)]
39. Souza, A.S.; Oliveira, Y.A.R.; Couto Dos Santos, M.A. Enhanced Approach to the Eu^{3+} Ion $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ Transition Intensity. *Opt. Mater.* **2013**, *35*, 1633–1635. [[CrossRef](#)]
40. Jia, Z.; Zhang, X.; Hua, X.; Dong, Y.; Li, H.; Feng, C.; Wang, Y.; Xia, M. Engineering Mixed Polyanion Red-Emitting $\text{Rb}_2\text{Bi}(\text{PO}_4)(\text{WO}_4):\text{Eu}^{3+}$ Phosphors with Negligible Thermal Quenching and High Quantum Yield. *J. Alloy. Compd.* **2020**, *844*, 155875. [[CrossRef](#)]
41. Matsunaga, K.; Murata, H.; Mizoguchi, T. Atsushi Nakahira Mechanism of Incorporation of Zinc into Hydroxyapatite. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 2289–2293. [[CrossRef](#)]
42. Bunzli, J.C.G.; Plancherel, D.; Pradervand, G.O. $\text{Eu}(\text{III})$ Ion as Luminescent Probe: Structural Investigation of Complexes between Europium Nitrate and Two Polyethers. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 980–984. [[CrossRef](#)]
43. Grigorjevaite, J.; Ezerskyte, E.; Minderyte, A.; Stanionyte, S.; Juskenas, R.; Sakirzanovas, S.; Katelnikovas, A. Optical Properties of Red-Emitting $\text{Rb}_2\text{Bi}(\text{PO}_4)(\text{MoO}_4)\text{Eu}^{3+}$ Powders and Ceramics with High Quantum Efficiency for White LEDs. *Materials* **2019**, *12*, 3275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Du, F.; Zhu, R.; Huang, Y.; Taob, Y.; Seo, H.J. Luminescence and Microstructures of Eu^{3+} -Doped $\text{Ca}_9\text{LiGd}_{2/3}(\text{PO}_4)_7$. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 11433–11440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Song, E.; Zhao, W.; Zhou, G.; Dou, X.; Yi, C.; Zhou, M. Luminescence Properties of Red Phosphors $\text{Ca}_{10}\text{Li}(\text{PO}_4)_7:\text{Eu}^{3+}$. *J. Rare Earths* **2011**, *29*, 440–443. [[CrossRef](#)]
46. Atuchin, V.V.; Subanakov, A.K.; Aleksandrovsky, A.S.; Bazarov, B.G.; Bazarova, J.G.; Gavrilova, T.A.; Krylov, A.S.; Molokeev, M.S.; Oreshonkov, A.S.; Stefanovich, S.Y. Structural and Spectroscopic Properties of New Noncentrosymmetric Self-Activated Borate $\text{Rb}_3\text{EuB}_6\text{O}_{12}$ with B_5O_{10} Units. *Mater. Des.* **2018**, *140*, 488–494. [[CrossRef](#)]
47. Liu, Y.; Tan, Y.; Wu, J. Rubidium Doped Nano-Hydroxyapatite with Cytocompatibility and Antibacterial. *J. Asian Ceram. Soc.* **2021**, *9*, 300–310. [[CrossRef](#)]
48. Tan, Y.N.; Chen, W.J.; Wei, W.; Huang, Q.L.; He, X. Rubidium-Modified Bioactive Glass-Ceramics with Hydroxyapatite Crystals for Bone Regeneration. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China (Engl. Ed.)* **2021**, *31*, 521–532. [[CrossRef](#)]
49. Guan, R.G.; Johnson, I.; Cui, T.; Zhao, T.; Zhao, Z.Y.; Li, X.; Liu, H. Electrodeposition of Hydroxyapatite Coating on Mg-4.0Zn-1.0Ca-0.6Zr Alloy and in Vitro Evaluation of Degradation, Hemolysis, and Cytotoxicity. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2012**, *100A*, 999–1015. [[CrossRef](#)]
50. Slota, D.; Gła̧b, M.; Tyliszczak, B.; Dogulas, T.E.L.; Rudnicka, K.; Miernik, K.; Urbaniak, M.M.; Rusek-Wala, P.; Sobczak-upiec, A. Composites Based on Hydroxyapatite and Whey Protein Isolate for Applications in Bone Regeneration. *Materials* **2021**, *14*, 2317. [[CrossRef](#)]
51. Reda, H. Sedimentation Rate in Sheep. *Br. Vet. J.* **1950**, *106*, 235–239. [[CrossRef](#)]

4. Wnioski i podsumowania

Dokładnie przemyślane, zaprojektowane oraz przeprowadzone badania pozwoliły na uzyskanie syntetycznych związków o strukturze hydroksyapatytu o ciekawych cechach strukturalnych jak również interesujących właściwościach luminescencyjnych i przede wszystkim biologicznych. Materiały o strukturze hydroksyapatytu zostały domieszkowane jonami optycznie czynnymi Eu^{3+} i Tb^{3+} oraz biologicznie czynnymi jak V^{5+} , Sr^{2+} i Rb^+ . Różnorodność domieszek w strukturze matrycy o strukturze hydroksyapatytu oraz dokładna analiza właściwości każdej otrzymanej serii związków pozwoliła wysunąć następujące wnioski:

1. Nanomateriały o strukturze hydroksyapatytu otrzymane metodą współstrąceniową, domieszkowane jonami Eu^{3+} , w których grupa fosforanowa (PO_4^{3-}) została stopniowo zastąpiona grupą wanadanową (VO_4^{3-}) wykazują krystaliczną i czysto-fazową strukturę jedynie do dwóch grup (VO_4^{3-}) podstawionych za grupę (PO_4^{3-}). Dodatkowo, badania właściwości optycznych jonów Eu^{3+} wbudowanych strukturę związków, świadczą o wygaszaniu ich luminescencji wraz ze wzrastającą ilością grup (VO_4^{3-}).
2. Niemniej mimo uzyskania materiałów o dwufazowych, wykazują one wysoką biogodność wobec linii ludzkich fibroblastów skórnych oraz erytrocytów. Co dodatkowo zostało potwierdzone stopniowym uwalnianiem jonów w symulowanym płynie ustrojowym. Dlatego materiały te są odpowiednie do dalszych badań biologicznych jako potencjalne wypełniacze tkankowe.
3. Materiały o strukturze hydroksyapatytu zsyntezowane metodą hydrotermalną, w których grupa (PO_4^{3-}) została zastąpiona dwoma grupami (VO_4^{3-}), współdomieszkowane zostały dodatkowo jonami Tb^{3+} oraz Sr^{2+} . Wykazują one czysto-fazową strukturę w temperaturze wyżarzania maksymalnie do 600°C . Jednak optymalna temperatura wyżarzania dla osiągnięcia najlepszych właściwości luminescencyjnych jonów Tb^{3+} wbudowanych w matrycę wynosiła 500°C .
4. Badania właściwości biologicznych potwierdziły wysoką biogodność otrzymanych materiałów nie tylko wobec fibroblastów ludzkich, ale również wobec fibroblastów mysich. Szczególnie w relatywnie wysokich stężeniach aktywność metaboliczna obu linii komórkowych osiągała najwyższe wyniki, dlatego z powodzeniem nadają się one do dalszych testów biologicznych w tym testów *in vivo*.
5. Nanomateriały o strukturze hydroksyapatytu otrzymane metodą hydrotermalną domieszkowane zostały jonami Eu^{3+} . Materiały zostały również współdomieszkowane jonami Rb^+ i we wzrastającym stężeniu wykazały czystość fazową do 3 mol% jonów Rb^+ w strukturze krystalicznej.
6. Podczas analizy właściwości optycznych wyraźnie wykazano, że obecność jonów Rb^+ wpływa na wzrost intensywności widm emisji i wzbudzenia jonów Eu^{3+} w strukturze hydroksyapatytu. Co

przekłada się również na wydłużenie czasu zaniku luminescencji jonów Eu^{3+} przez obecność jonów Rb^+ w sieci krystalicznej.

7. Analiza właściwości biologicznych wykazała wysoką biogodność zarówno wobec linii osteoblastów oraz erytrocytów w związku z tym otrzymane materiały nadają się do bardziej zaawansowanych badań biologicznych, włączając w to testy *in vivo*.

5. Streszczenie

Medycyna regeneracyjna oraz inżynieria tkankowa to wciąż rozwijające się dziedziny nauki. Poszukują nowych, lepszych rozwiązań w celu znalezienia optymalnych materiałów do wypełnień uszkodzonych tkanek, jednocześnie jednoczesną indukcją proliferacji zdrowych komórek oraz szybszą regeneracją struktur tkankowych. Najlepszym sposobem do osiągnięcia takiego efektu jest stosowanie materiałów naturalnych, ale na tyle prostych by możliwe było łatwe i szybkie otrzymanie ich syntetycznych odpowiedników. Dobrze znane, jednak wciąż mało doceniane związki z grupy apatytów posiadają niezwykle duży potencjał ze względu na swoją prostą strukturę oraz wysoką biogodność tkankową. Obecne w organizmie indukują procesy kościotwórcze tkanki kostnej oraz wzmacniają szkliwo zębów. Syntetyczne apatyty posiadają znaczną przewagę nad naturalnymi odpowiednikami, ze względu na możliwość ich modyfikacji. Zastosowane modyfikacje w postaci jonów biologicznie aktywnych czy jonów optycznie czynnych stwarza możliwości wykorzystania takich materiałów nie tylko w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej, ale także w dziedzinie bioobrazowania.

W pracy doktorskiej skupiono się przede wszystkim na otrzymaniu związków o strukturze hydroksyapatytów domieszkowanych czynnymi optycznie jonami Eu^{3+} i Tb^{3+} oraz biologicznie aktywnymi jonami V^{5+} , Sr^{2+} i Rb^{+} oraz charakterystyce ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych. Metody pomiarowe takie jak XRPD, ATR-FTIR, SEM, TEM, ICP-OES, umożliwiły charakterystykę struktury krystalicznej, rozmiaru ziaren, morfologii oraz zawartości pierwiastków. Analiza widm emisji, wzbudzenia i czasu zaniku luminescencji pozwoliła określić jak poszczególne domieszki wpływają na właściwości optyczne jonów lantanowców. Natomiast wyniki uzyskane z testów biologicznych pozwoliły określić wpływ poszczególnych domieszek na poprawę biogodności matrycy hydroksyapatytowej.

Wspólny tematycznie cykl artykułów wchodzący w skład rozprawy doktorskiej zawiera trzy opublikowane prace naukowe. Każda z nich prezentuje jak poszczególne modyfikacje struktury hydroksyapatytu wpływają na jego strukturę, morfologię a także właściwości optyczne jonów Eu^{3+} i Tb^{3+} . Ponadto przedstawia jak poszczególne jony wpływają na poprawę jego właściwości biologicznych.

6. Summary

Regenerative medicine and tissue engineering are ever-evolving fields of science. They are looking for new and better solutions to find optimal materials for filling damaged tissues, while simultaneously inducing proliferation of healthy cells and faster regeneration of tissue structures. The best way to achieve such an effect is to use natural materials, but simple enough to make it possible to easily and quickly obtain their synthetic counterparts. Well-known but still little appreciated compounds from the apatite group have extremely high potential due to their simple structure and high tissue biocompatibility. When present in the body, they induce bone-forming processes of bone tissue and strengthen tooth enamel. Synthetic apatites have a significant advantage over their natural counterparts due to the possibility of their modification. Applied modifications in the form of biologically active ions or optically active ions create opportunities for the use of such materials not only in tissue engineering and regenerative medicine, but also in the field of bioimaging.

The dissertation mainly focused on obtaining, hydroxyapatite structured materials doped with optically active Eu^{3+} and Tb^{3+} ions and biologically active V^{5+} , Sr^{2+} and Rb^{+} ions and characterizing their physicochemical and biological properties. Measurement methods such as XRPD, ATR-FTIR, SEM, TEM, ICP-OES, allowed us to characterize the crystal structure, grain size, morphology and elemental content. Analysis of emission, excitation and luminescence decay time spectra made it possible to determine how individual dopants affect the optical properties of lanthanide ions. In turn, the results obtained from bioassays made it possible to determine the effect of individual dopants on improving the biocompatibility of the hydroxyapatite matrix.

The thematically common series of articles included in the dissertation includes three published scientific papers. Each of them presents how individual modifications to the structure of hydroxyapatite affect its structure, morphology and also the optical properties of Eu^{3+} and Tb^{3+} ions. In addition, it shows how individual ions improve its biological properties.

7. Bibliografia

1. Rinaldo Florencio-Silva, Gisela Rodrigues da Silva Sasso, Estela Sasso-Cerri, Manuel Jesus Simões, and P.S.C. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, doi:10.1016/S0923-2532(05)80182-6.
2. Lopes, D.; Martins-Cruz, C.; Oliveira, M.B.; Mano, J.F. Bone Physiology as Inspiration for Tissue Regenerative Therapies. *Biomaterials* **2018**, *185*, 240–275, doi:10.1016/j.biomaterials.2018.09.028.
3. Liu, Y.; Zhou, G.; Cao, Y. Recent Progress in Cartilage Tissue Engineering—Our Experience and Future Directions. *Engineering* **2017**, *3*, 28–35, doi:10.1016/J.ENG.2017.01.010.
4. Nicolaides, M.; Pafitanis, G.; Vris, A. Open Tibial Fractures: An Overview. *J Clin Orthop Trauma* **2021**, *20*, doi:10.1016/j.jcot.2021.101483.
5. Trabulsy PP; Kerley SM; Hoffman WY. A Prospective Study of Early Soft Tissue Coverage of Grade IIIB Tibial Fractures. *J Trauma* **1994**, *36*, 661–668, doi:doi: 10.1097/00005373-199405000-00011.
6. Calmar, E.A.; Vinci, R.J. The Anatomy and Physiology of Bone Fracture and Healing. *Clin Ped Emerg Med* **2002**, *3*, 85–93, DOI: 10.1053/epem.2002.127037
7. Silver, J.; Schwab, M.E.; Popovich, P.G. Central Nervous System Regenerative Failure: Role of Oligodendrocytes, Astrocytes, and Microglia. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2015**, *7*, doi:10.1101/cshperspect.a020602.
8. Watson, E.C.; Adams, R.H. Biology of Bone: The Vasculature of the Skeletal System. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2018**, *8*, doi:10.1101/cshperspect.a031559.
9. Huysseune, A. *Skeletal System*; 2000;
10. Tsintou, M.; Dalamagkas, K.; Makris, N. Taking Central Nervous System Regenerative Therapies to the Clinic: Curing Rodents versus Nonhuman Primates versus Humans. *Neural Regen Res* **2020**, *15*, 425–437.
11. Tam, R.Y.; Fuehrmann, T.; Mitrousis, N.; Shoichet, M.S. Regenerative Therapies for Central Nervous System Diseases: A Biomaterials Approach. *Neuropsychopharmacology* **2014**, *39*, 169–188.
12. Alunni, A.; Bally-Cuif, L. A Comparative View of Regenerative Neurogenesis in Vertebrates. *Development (Cambridge)* **2016**, *143*, 741–753.
13. Zhao, X.; Moore, D.L. Neural Stem Cells: Developmental Mechanisms and Disease Modeling. *Cell Tissue Res* **2018**, *371*.
14. Toda, T.; Gage, F.H. Review: Adult Neurogenesis Contributes to Hippocampal Plasticity. *Cell Tissue Res* **2018**, *373*, 693–709.
15. Sally Temple The Development of Neural Stem Cells. *Nature* **2001**, *414*, 112–117, doi:https://doi.org/10.1038/35102174.
16. Bosak, V.; Murata, K.; Bludau, O.; Brand, M. Role of the Immune Response in Initiating Central Nervous System Regeneration in Vertebrates: Learning from the Fish. *International Journal of Developmental Biology* **2018**, *62*, 403–417, doi:10.1387/ijdb.180033vb.
17. Sorrells, S.F.; Paredes, M.F.; Cebrian-Silla, A.; Sandoval, K.; Qi, D.; Kelley, K.W.; James, D.; Mayer, S.; Chang, J.; Auguste, K.I.; et al. Human Hippocampal Neurogenesis Drops Sharply in Children to Undetectable Levels in Adults. *Nature* **2018**, *555*, 377–381, doi:10.1038/nature25975.
18. D’Andrea, G.; Ceccarelli, M.; Bernini, R.; Clemente, M.; Santi, L.; Caruso, C.; Micheli, L.; Tirone, F. Hydroxytyrosol Stimulates Neurogenesis in Aged Dentate Gyrus by Enhancing Stem and Progenitor Cell Proliferation and Neuron Survival. *FASEB Journal* **2020**, *34*, 4512–4526, doi:10.1096/fj.201902643R.
19. Brann, J.H.; Firestein, S.J. A Lifetime of Neurogenesis in the Olfactory System. *Front Neurosci* **2014**.
20. Lledo, P.M.; Valley, M. Adult Olfactory Bulb Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2016**, *8*, doi:10.1101/cshperspect.a018945.
21. Lim, D.A.; Alvarez-Buylla, A. The Adult Ventricular–Subventricular Zone (V–SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2016**, *8*, doi:10.1101/cshperspect.a018820.
22. Richard Marsell and Thomas Einhorn The Biology of Fracture Healing. *Injury* **2011**, *42*, 551–555, doi:doi:10.1016/j.injury.2011.03.031.

23. Perez, J.R.; Kouroupis, D.; Li, D.J.; Best, T.M.; Kaplan, L.; Correa, D. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Front Bioeng Biotechnol* **2018**, *6*, 1–23, doi:10.3389/fbioe.2018.00105.
24. Dimitriou, R.; Tsiridis, E.; Giannoudis, P. V. Current Concepts of Molecular Aspects of Bone Healing. *Injury* **2005**, *36*, 1392–1404.
25. Mountziaris, P.M.; Mikos, A.G. Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* **2008**, *14*, 179–186.
26. Lissenberg-Thunnissen, S.N.; De Gorter, D.J.J.; Sier, C.F.M.; Schipper, I.B. Use and Efficacy of Bone Morphogenetic Proteins in Fracture Healing. *Int Orthop* **2011**, *35*, 1271–1280.
27. Sakou, T. Bone Morphogenetic Proteins: From Basic Studies to Clinical Approaches. *Bone* **1998**, *22*.
28. Katagiri, T.; Watabe, T. Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2016**, *8*, doi:10.1101/cshperspect.a021899.
29. Wang, R.N.; Green, J.; Wang, Z.; Deng, Y.; Qiao, M.; Peabody, M.; Zhang, Q.; Ye, J.; Yan, Z.; Denduluri, S.; et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling in Development and Human Diseases. *Genes Dis* **2014**, *1*, 87–105.
30. Lademann, F.; Hofbauer, L.C.; Rauner, M. The Bone Morphogenetic Protein Pathway: The Osteoclastic Perspective. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*.
31. Poniatowski, L.A.; Wojdasiewicz, P.; Gasik, R.; Szukiewicz, D. Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the Role of Growth Factors in Regulation of Fracture Healing Biology and Potential Clinical Applications. *Mediators Inflamm* **2015**, *2015*.
32. Wan, M.; Li, C.; Zhen, G.; Jiao, K.; He, W.; Jia, X.; Wang, W.; Shi, C.; Xing, Q.; Chen, Y.F.; et al. Injury-Activated Transforming Growth Factor β Controls Mobilization of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Remodeling. *Stem Cells* **2012**, *30*, 2498–2511, doi:10.1002/stem.1208.
33. Beck, L.S.; Ament, E.P.; Xu, Y.; Deguzman, L.; Lee, T.; Nguyen, W.P.; Gillett, N.A. *TGF- β 1 Induces Bone Closure of Skull Defects: Temporal Dynamics of Bone Formation in Defects Exposed to RhTGF- β 1*; Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, 1993; Vol. 8;.
34. Falk, S.; Wurdak, H.; Ittner, L.M.; Ille, F.; Sumara, G.; Schmid, M.T.; Draganova, K.; Lang, K.S.; Paratore, C.; Leveen, P.; et al. Brain Area-Specific Effect of TGF- β Signaling on Wnt-Dependent Neural Stem Cell Expansion. *Cell Stem Cell* **2008**, *2*, 472–483, doi:10.1016/j.stem.2008.03.006.
35. Flanders, K.C.; Ludecke, G.; Engels, S.; Cissel, D.S.; Roberts, A.B.; Kondaiah, P.; Lafyatis, R.; Sporn, M.B.; Unsicker, K. *Localization and Actions of Transforming Growth Factor's in the Embryonic Nervous System*; 1991; Vol. 113;.
36. Eric J. Nestler; Steven E. Hyman; David M. Holtzman; Robert C. Malenka Atypical Neurotransmitters. In *Molecular Neuropsychopharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*; McGraw Hill, 2014 ISBN 978-0-07-182769-0.
37. Lin, K.; Wu, C.; Chang, J. Advances in Synthesis of Calcium Phosphate Crystals with Controlled Size and Shape. *Acta Biomater* **2014**, *10*, 4071–4102, doi:10.1016/j.actbio.2014.06.017.
38. Hou, X.; Zhang, L.; Zhou, Z.; Luo, X.; Wang, T.; Zhao, X.; Lu, B.; Chen, F.; Zheng, L. Calcium Phosphate-Based Biomaterials for Bone Repair. *J Funct Biomater* **2022**, *13*.
39. Von Euw, S.; Wang, Y.; Laurent, G.; Drouet, C.; Babonneau, F.; Nassif, N.; Azaïs, T. Bone Mineral: New Insights into Its Chemical Composition. *Sci Rep* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-44620-6.
40. Gelli, R.; Ridi, F.; Baglioni, P. The Importance of Being Amorphous: Calcium and Magnesium Phosphates in the Human Body. *Adv Colloid Interface Sci* **2019**, *269*, 219–235.
41. Janning, C.; Willbold, E.; Vogt, C.; Nellesen, J.; Meyer-Lindenberg, A.; Windhagen, H.; Thorey, F.; Witte, F. Magnesium Hydroxide Temporarily Enhancing Osteoblast Activity and Decreasing the Osteoclast Number in Peri-Implant Bone Remodelling. *Acta Biomater* **2010**, *6*, 1861–1868, doi:10.1016/j.actbio.2009.12.037.
42. Skinner, H.C.W.; Jahren, A.H. 8.04 Biomineralization. In *Treatise on Geochemistry*; Heinrich D. Holland, Karl K. Turekian, Eds.; Pergamon, 2007; pp. 1–69 ISBN ISBN 9780080437514.
43. Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Sfihi, H. Chemical Diversity of Apatites. In *Proceedings of the Materials in Clinical Applications VII*; Trans Tech Publications Ltd, October 10 2006; Vol. 49, pp. 27–36.
44. Hughes, J.M. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates By J. C. Elliot (The London Hospital Medical College). Elsevier: Amsterdam. 1994. Xii + 389 Pp. ISBN 0-444-81582-1. *J Am Chem Soc* **1996**, *118*, 3072–3072, doi:10.1021/JA945007T.

45. Tite, T.; Popa, A.C.; Balescu, L.M.; Bogdan, I.M.; Pasuk, I.; Ferreira, J.M.F.; Stan, G.E. Cationic Substitutions in Hydroxyapatite: Current Status of the Derived Biofunctional Effects and Their in Vitro Interrogation Methods. *Materials* **2018**, *11*, 1–62, doi:10.3390/ma11112081.
46. Vasile Antoniac Editor, I. *Cationic and Anionic Substitutions in Hydroxyapatite*, In: *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*; Springer International Publishing, 2016; ISBN 978-3-319-12460-5.
47. Hazrah, K.S.; Antao, S.M. Apatite, Ca₁₀(PO₄)₆(OH,F,Cl)₂: Structural Variations, Natural Solid Solutions, Intergrowths, and Zoning. *Minerals* **2022**, *12*, doi:10.3390/min12050527.
48. Pan, Y.; Fleet, M.E. Compositions of the Apatite-Group Minerals: Substitution Mechanisms and Controlling Factors. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **2002**, *48*, 13–49, doi:10.2138/rmg.2002.48.2.
49. Resende, N.S.; Nele, M.; Salim, V.M.M. Effects of Anion Substitution on the Acid Properties of Hydroxyapatite. *Thermochim Acta* **2006**, *451*, 16–21, doi:10.1016/j.tca.2006.08.012.
50. Saghiri, M.A.; Vakhnovetsky, J.; Vakhnovetsky, A.; Ghobrial, M.; Nath, D.; Morgano, S.M. Functional Role of Inorganic Trace Elements in Dentin Apatite Tissue—Part 1: Mg, Sr, Zn, and Fe. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2022**, *71*, 126932, doi:10.1016/J.JTEMB.2022.126932.
51. Borkowski, L.; Przekora, A.; Belcarz, A.; Palka, K.; Jozefaciuk, G.; Lübek, T.; Jojczuk, M.; Nogalski, A.; Ginalska, G. Fluorapatite Ceramics for Bone Tissue Regeneration: Synthesis, Characterization and Assessment of Biomedical Potential. *Materials Science and Engineering C* **2020**, *116*, doi:10.1016/j.msec.2020.111211.
52. Neacsu, I.A.; Stoica, A.E.; Vasile, B.S.; Andronescu, E. Luminescent Hydroxyapatite Doped with Rare Earth Elements for Biomedical Applications. *Nanomaterials* **2019**, *9*.
53. Victor, S.P.; Gayathri Devi, M.G.; Paul, W.; Vijayan, V.M.; Muthu, J.; Sharma, C.P. Europium Doped Calcium Deficient Hydroxyapatite as Theranostic Nanoplatfoms: Effect of Structure and Aspect Ratio. *ACS Biomater Sci Eng* **2017**, *3*, 3588–3595, doi:10.1021/acsbmaterials.7b00453.
54. Deshmukh, K.; Shaik, M.; Ramanan, S.R.; Kowshik, M. *Self-Activated Fluorescent Hydroxyapatite Nanoparticles: A Promising Agent for Bio-Imaging and Bio-Labeling*; 2016;
55. Mondal, S.; Pal, U. 3D Hydroxyapatite Scaffold for Bone Regeneration and Local Drug Delivery Applications. *J Drug Deliv Sci Technol* **2019**, *53*, 101131, doi:10.1016/j.jddst.2019.101131.
56. Li, Y.; Zheng, X.; Chu, Q. Bio-Based Nanomaterials for Cancer Therapy. *Nano Today* **2021**, *38*.
57. Zhang, R.X.; Li, J.; Zhang, T.; Amini, M.A.; He, C.; Lu, B.; Ahmed, T.; Lip, H.; Rauth, A.M.; Wu, X.Y. Importance of Integrating Nanotechnology with Pharmacology and Physiology for Innovative Drug Delivery and Therapy - An Illustration with Firsthand Examples. *Acta Pharmacol Sin* **2018**, *39*, 825–844.
58. Kumar Dash, D.; Kant Panik, R.; Kumar Sahu, A.; Tripathi, V. Role of Nanobiotechnology in Drug Discovery, Development and Molecular Diagnostic. In *Applications of Nanobiotechnology*; IntechOpen, 2020.
59. Cacciotti, I. Multisubstituted Hydroxyapatite Powders and Coatings: The Influence of the Codoping on the Hydroxyapatite Performances. *Int J Appl Ceram Technol* **2019**, *16*, 1864–1884, doi:10.1111/ijac.13229.
60. Swetha, M.; Sahithi, K.; Moorthi, A.; Srinivasan, N.; Ramasamy, K.; Selvamurugan, N. Biocomposites Containing Natural Polymers and Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering. *Int J Biol Macromol* **2010**, *47*, 1–4, doi:10.1016/j.jbiomac.2010.03.015.
61. Odusote, J.K.; Danyuo, Y.; Baruwa, A.D.; Azeez, A.A. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite from Bovine Bone for Production of Dental Implants. *J Appl Biomater Funct Mater* **2019**, *17*, doi:10.1177/2280800019836829.
62. Ventura, R. Bone Regeneration of Decellularized In-Vivo Deposited Extracellular Matrix (ECM) on Hydroxyapatite Sponge Scaffold. *MOJ Cell Science & Report* **2016**, *3*, 3–6, doi:10.15406/mojcsr.2016.03.00057.
63. Szcześ, A.; Hołysz, L.; Chibowski, E. Synthesis of Hydroxyapatite for Biomedical Applications. *Adv Colloid Interface Sci* **2017**, *249*, 321–330, doi:10.1016/j.cis.2017.04.007.
64. Zou, Q.; Li, Y.; Zhang, L.; Zuo, Y.; Li, J.; Li, X. Characterization and Cytocompatibility of Nano-Hydroxyapatite/Chitosan Bone Cement with the Addition of Calcium Salts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2009**, *90 B*, 156–164, doi:10.1002/jbm.b.31267.
65. Calasans-Maia, M.D.; de Melo, B.R.; Alves, A.T.N.N.; Resende, R.F. de B.; Louro, R.S.; Sartoretto, S.C.; Granjeiro, J.M.; Alves, G.G. Cytocompatibility and Biocompatibility of Nanostructured Carbonated Hydroxyapatite Spheres for Bone Repair. *Journal of Applied Oral Science* **2015**, *23*, 599–608, doi:10.1590/1678-775720150122.

66. Bianco, A.; Bozzo, B.M.; Del Gaudio, C.; Cacciotti, I.; Armentano, I.; Dottori, M.; D'Angelo, F.; Martino, S.; Orlicchio, A.; Kenny, J.M. Poly (L-Lactic Acid)/Calcium-Deficient Nanohydroxyapatite Electrospun Mats for Bone Marrow Stem Cell Cultures. *J Bioact Compat Polym* **2011**, *26*, 225–241, doi:10.1177/0883911511406250.
67. Huang, B.; Caetano, G.; Vyas, C.; Blaker, J.J.; Diver, C.; Bártolo, P. Polymer-Ceramic Composite Scaffolds: The Effect of Hydroxyapatite and β -Tri-Calcium Phosphate. *Materials* **2018**, *11*, doi:10.3390/ma11010129.
68. Abou Neel EA; Aljabo A; Strange A; Ibrahim S; Coathup M; Young AM; Bozec L; Mudera V. Demineralization-Remineralization Dynamics in Teeth and Bone. *Int J Nanomedicine* **2016**, *11*, 4735–4741, doi:10.2147/IJN.S107624.
69. Shanmugam, S.; Gopal, B. Copper Substituted Hydroxyapatite and Fluorapatite: Synthesis, Characterization and Antimicrobial Properties. *Ceram Int* **2014**, *40*, 15655–15662, doi:10.1016/j.ceramint.2014.07.086.
70. Pajor, K.; Pajchel, L.; Kolmas, J. Hydroxyapatite and Fluorapatite in Conservative Dentistry and Oral Implantology—a Review. *Materials* **2019**, *12*.
71. Anastasiou, A.D.; Nerantzaki, M.; Gounari, E.; Duggal, M.S.; Giannoudis, P. V.; Jha, A.; Bikiaris, D. Antibacterial Properties and Regenerative Potential of Sr²⁺ and Ce³⁺ Doped Fluorapatites; a Potential Solution for Peri-Implantitis. *Sci Rep* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-50916-4.
72. Alhilou, A.; Do, T.; Mizban, L.; Clarkson, B.H.; Wood, D.J.; Katsikogianni, M.G. Physicochemical and Antibacterial Characterization of a Novel Fluorapatite Coating. *ACS Omega* **2016**, *1*, 264–276, doi:10.1021/acsomega.6b00080.
73. Rassy, W.Y.; Ripper, D.; Pomare, E.; Winkler, S.; Koppensteiner, A.; Spadiut, O.; Schild, D. Incorporation of Ionic Rare Earth Elements as a Form of Microbial Environmental Remediation. *Front Environ Sci* **2023**, *11*, doi:10.3389/fenvs.2023.1112612.
74. Hower, J.C.; Granite, E.J.; Mayfield, D.B.; Lewis, A.S.; Finkelman, R.B. Notes on Contributions to the Science of Rare Earth Element Enrichment in Coal and Coal Combustion Byproducts. *Minerals* **2016**, *6*.
75. Seitz, M.; Oliver, A.G.; Raymond, K.N. The Lanthanide Contraction Revisited. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 11153–11160, doi:10.1021/ja072750f.
76. Hasegawa, M.; Ohmagari, H.; Tanaka, H.; Machida, K. Luminescence of Lanthanide Complexes: From Fundamental to Prospective Approaches Related to Water- and Molecular-Stimuli. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2022**, *50*.
77. Pyykko, E. Relativistic Effects in Structural Chemistry. *Chem Rev* **1988**, *88*, 563–594, doi:10.1021/cr00085a006.
78. Johnson, D.A.; Nelson, P.G. Valencies of the Lanthanides. *Found Chem* **2018**, *20*, 15–27, doi:10.1007/s10698-017-9291-6.
79. Bünzli, J.-C.G.; Eliseeva, S. V. Basics of Lanthanide Photophysics. In *Lanthanide Luminescence. Springer Series on Fluorescence*; Hänninen, P., Härmä, H., Eds.; Springer, Berlin, Heidelberg, 2010; Vol. 7, pp. 1–45 ISBN 978-3-642-21022-8.
80. Werts, M.H. V Making Sense of Lanthanide Luminescence. *Science Progress (1933-)* **2005**, *88*, 101–131.
81. Bünzli, J.C.G.; Piguet, C. Taking Advantage of Luminescent Lanthanide Ions. *Chem Soc Rev* **2005**, *34*, 1048–1077.
82. Bünzli, J.C.G. Benefiting from the Unique Properties of Lanthanide Ions. *Acc Chem Res* **2006**, *39*, 53–61.
83. Pan, Y.; Xie, X.; Huang, Q.; Gao, C.; Wang, Y.; Wang, L.; Yang, B.; Su, H.; Huang, L.; Huang, W. Inherently Eu²⁺/Eu³⁺ Codoped Sc₂O₃ Nanoparticles as High-Performance Nanothermometers. *Advanced Materials* **2018**, *30*, doi:10.1002/adma.201705256.
84. Van De Voorde, M.; Geboes, B.; Vander Hoogerstraete, T.; Van Hecke, K.; Cardinaels, T.; Binnemans, K. Stability of Europium(II) in Aqueous Nitrate Solutions. *Dalton Transactions* **2019**, *48*, 14758–14768, doi:10.1039/c9dt03139a.
85. Pan, Y.; Wang, W.; Zhu, Y.; Xu, H.; Noh, H.M.; Jeong, J.H.; Liu, X.; Li, L. Eu³⁺→Eu²⁺ Unusual Reduction and Bond Energy in MA₂Si₂O₆:Eu (M=Li, Na, K, Rb, Cs). *Ceram Int* **2018**, *44*, 8484–8491, doi:10.1016/j.ceramint.2018.02.046.
86. Binnemans, K. Interpretation of Europium(III) Spectra. *Coord Chem Rev* **2015**, *295*, 1–45, doi:10.1016/j.ccr.2015.02.015.
87. Singh, A.K.; O'Donnell, K.P.; Edwards, P.R.; Cameron, D.; Lorenz, K.; Kappers, M.J.; Boćkowski, M.; Yamaga, M.; Prakash, R. Luminescence of Eu³⁺ in GaN(Mg, Eu): Transitions from the 5D₁ Level. *Appl Phys Lett* **2017**, *111*, doi:10.1063/1.5001143.
88. Porcher, P.; Caro, P. Crystal Field Parameters for Eu³⁺ in KY₃F₁₀. *J. Chem. Phys.* **1976**, *65*, 89–94.

89. Chen, X.Y.; Liu, G.K. The Standard and Anomalous Crystal-Field Spectra of Eu³⁺. *J Solid State Chem* **2005**, *178*, 419–428, doi:10.1016/j.jssc.2004.09.002.
90. Souza, A.S.; Oliveira, Y.A.R.; Couto Dos Santos, M.A. Enhanced Approach to the Eu³⁺ Ion 5D₀ → 7F₀ Transition Intensity. *Opt Mater (Amst)* **2013**, *35*, 1633–1635, doi:10.1016/j.optmat.2013.04.010.
91. Werts, M.H.V.; Jukes, R.T.F.; Verhoeven, J.W. The Emission Spectrum and the Radiative Lifetime of Eu³⁺ in Luminescent Lanthanide Complexes. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2002**, *4*, 1542–1548, doi:10.1039/b107770h.
92. Szyszka, K.; Targonska, S.; Gazinska, M.; Szustakiewicz, K.; Wiglusz, R.J. The Comprehensive Approach to Preparation and Investigation of the Eu³⁺ Doped Hydroxyapatite/Poly(L-Lactide) Nanocomposites: Promising Materials for Theranostics Application. *Nanomaterials* **2019**, *9*, doi:10.3390/nano9081146.
93. Kesavulu, C.R.; Kumar, K.K.; Vijaya, N.; Lim, K.S.; Jayasankar, C.K. Thermal, Vibrational and Optical Properties of Eu³⁺-Doped Lead Fluorophosphate Glasses for Red Laser Applications. *Mater Chem Phys* **2013**, *141*, 903–911, doi:10.1016/j.matchemphys.2013.06.021.
94. Harrowfield, J.M.; Ogden, M.I.; Richmond, W.R.; White, A.H. Lanthanide Ions as Calcium Substitutes: A Structural Comparison of Europium and Calcium Complexes of a Ditopic Calixarene. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1991**, 2153–2160, doi:10.1039/DT9910002153.
95. Victor, S.P.; Gayathri Devi, M.G.; Paul, W.; Vijayan, V.M.; Muthu, J.; Sharma, C.P. Europium Doped Calcium Deficient Hydroxyapatite as Theranostic Nanoplatforms: Effect of Structure and Aspect Ratio. *ACS Biomater Sci Eng* **2017**, *3*, 3588–3595, doi:10.1021/acsbmaterials.7b00453.
96. Kandarakis, I.; Cavouras, D.; Panayiotakis, G.S.; Triantis, D.; Nomicos, C.D. Europium-Activated Phosphors for Use in X-Ray Detectors of Medical Imaging Systems. *Eur Radiol* **1998**, *8*, 313–318, doi:10.1007/s003300050387.
97. Yang, P.; Quan, Z.; Li, C.; Kang, X.; Lian, H.; Lin, J. Bioactive, Luminescent and Mesoporous Europium-Doped Hydroxyapatite as a Drug Carrier. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4341–4347, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.07.042.
98. Han, Y.; Wang, X.; Li, S. *Biocompatible Europium Doped Hydroxyapatite Nanoparticles as a Biological Fluorescent Probe*; 2010; Vol. 6;
99. Escudero, A.; Calvo, M.E.; Rivera-ferna, S. Microwave-Assisted Synthesis of Biocompatible Europium-Doped Calcium Hydroxyapatite and Fluoroapatite Luminescent Nanospindles Functionalized with Poly(Acrylic Acid). **2013**.
100. Andronescu, E.; Predoi, D.; Neacsu, I.A.; Paduraru, A.V.; Musuc, A.M.; Trusca, R.; Oprea, O.; Tanasa, E.; Vasile, O.R.; Nicoara, A.I.; et al. Photoluminescent Hydroxylapatite: Eu³⁺ Doping Effect on Biological Behaviour. *Nanomaterials* **2019**, *9*, doi:10.3390/nano9091187.
101. García Domínguez, G.; Garrido Hernández, A.; Cerón Montes, G.; Morales Ramírez, A.J.; de la Torre, S.D. Structural and Luminescent Properties of Europium-Doped and Undoped Hydroxyapatite Powders Sintered by Spark Plasma. *Ceramics - Silikaty* **2019**, *63*, 100–109, doi:10.13168/cs.2019.0002.
102. Chen, F.; Zhu, Y.J.; Zhang, K.H.; Wu, J.; Wang, K.W.; Tang, Q.L.; Mo, X.M. Europium-Doped Amorphous Calcium Phosphate Porous Nanospheres: Preparation and Application as Luminescent Drug Carriers. *Nanoscale Res Lett* **2011**, *6*, 1–9, doi:10.1186/1556-276X-6-67.
103. Carpenter, C.M.; Sun, C.; Prax, G.; Rao, R.; Xing, L. Hybrid X-Ray/Optical Luminescence Imaging: Characterization of Experimental Conditions. *Med Phys* **2010**, *37*, 4011–4018, doi:10.1118/1.3457332.
104. Palumbo, C.T.; Zivkovic, I.; Scopelliti, R.; Mazzanti, M. Molecular Complex of Tb in the +4 Oxidation State. *J Am Chem Soc* **2019**, *141*, 9827–9831, doi:10.1021/jacs.9b05337.
105. Li, W.L.; Chen, T.T.; Chen, W.J.; Li, J.; Wang, L.S. Monovalent Lanthanide(I) in Borozene Complexes. *Nat Commun* **2021**, *12*, doi:10.1038/s41467-021-26785-9.
106. Arnold, P.L.; Petrukhina, M.A.; Bochenkov, V.E.; Shabatina, T.I.; Zagorskii, V. V.; Sergeev, G.B.; Cloke, F.G.N. Arene Complexation of Sm, Eu, Tm and Yb Atoms: A Variable Temperature Spectroscopic Investigation. *J Organomet Chem* **2003**, *688*, 49–55, doi:10.1016/j.jorganchem.2003.08.028.
107. Paramasivam, K.R.; Radhakrishnan, M.; Balasubramanian, C. Optical Properties of Terbium Fluoride Thin Films. *Journal of Optics* **1983**, *12*, 43–45, doi:https://doi.org/10.1007/BF03549071.
108. Valiev, U. V.; Karimov, D.N.; Ma, C.G.; Sultonov, O.Z.; Pelenovich, V.O. Tb³⁺ Ion Optical and Magneto-Optical Properties in the Cubic Crystals KTb₃F₁₀. *Materials* **2022**, *15*, doi:10.3390/ma15227999.
109. Verhoeven, J.D.; Ostenson, J.E.; Gibson, E.D.; McMasters, O.D. The Effect of Composition and Magnetic Heat Treatment on the Magnetostriction of Tb_xDy_{1-x}Fe_y Twinned Single Crystals. *J Appl Phys* **1989**, *66*, 772–779, doi:10.1063/1.343496.

110. Houqng, Z.; Jlanguo, L.; Xmrong, W.; Yanhong, X.; Hongping, Z. Applications of Terfenol-D in China. *J Alloys Compd* **1997**, *258*, 49–52.
111. Kalusniak, S.; Castellano-Hernández, E.; Yalçinoğlu, H.; Tanaka, H.; Kränkel, C. Spectroscopic Properties of Tb³⁺ as an Ion for Visible Lasers. *Appl Phys B* **2022**, *128*, doi:10.1007/s00340-022-07759-1.
112. Tanaka, H.; Kalusniak, S.; Badtke, M.; Demesh, M.; Kuleshov, N. V.; Kannari, F.; Kränkel, C. Visible Solid-State Lasers Based on Pr³⁺ and Tb³⁺. *Prog Quantum Electron* **2022**, *84*.
113. Richardson, F.S. Terbium(III) and Europium(III) Ions as Luminescent Probes and Stains for Biomolecular Systems. *Chem Rev* **1982**, *82*, 541–552, doi:DOI: 10.1021/cr00051a004.
114. Kalusniak, S.; Tanaka, H.; Castellano-Hernández, E.; Kränkel, C. UV-Pumped Visible Tb³⁺-Lasers. *Opt Lett* **2020**, *45*, 6170, doi:10.1364/ol.411072.
115. Castellano-Hernández, E.; Kalusniak, S.; Metz, P.W.; Kränkel, C. Diode-Pumped Laser Operation of Tb³⁺:LiLuF₄ in the Green and Yellow Spectral Range. *Laser Photon Rev* **2020**, *14*, doi:10.1002/lpor.201900229.
116. Li, L.; Liu, Y.; Tao, J.; Zhang, M.; Pan, H.; Xu, X.; Tang, R. Surface Modification of Hydroxyapatite Nanocrystallite by a Small Amount of Terbium Provides a Biocompatible Fluorescent Probe. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 12219–12224, doi:10.1021/jp8026463.
117. Paduraru, A.V.; Oprea, O.; Musuc, A.M.; Vasile, B.S.; Iordache, F.; Andronescu, E. Influence of Terbium Ions and Their Concentration on the Photoluminescence Properties of Hydroxyapatite for Biomedical Applications. *Nanomaterials* **2021**, *11*, doi:10.3390/nano11092442.
118. Fanizza, E.; Depalo, N.; Fedorenko, S.; Iacobazzi, R.M.; Mukhametshina, A.; Zairov, R.; Salatino, A.; Vischio, F.; Panniello, A.; Laquintana, V.; et al. Green Fluorescent Terbium (III) Complex Doped Silica Nanoparticles. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20133139.
119. Sharfalddin, A.A.; Al-Younis, I.M.; Mohammed, H.A.; Dhahri, M.; Mouffouk, F.; Abu Ali, H.; Anwar, M.J.; Qureshi, K.A.; Hussien, M.A.; Alghrably, M.; et al. Therapeutic Properties of Vanadium Complexes. *Inorganics (Basel)* **2022**, *10*.
120. Goc, A. Biological Activity of Vanadium Compounds. *Cent Eur J Biol* **2006**, *1*, 314–332.
121. Zhang, W.; Lan, Y.; Ma, M.; Chai, S.; Zuo, Q.; Kim, K.H.; Gao, Y. A Novel Chitosan–Vanadium–Titanium–Magnetite Composite as a Superior Adsorbent for Organic Dyes in Wastewater. *Environ Int* **2020**, *142*, doi:10.1016/j.envint.2020.105798.
122. Babar, B.M.; Mohite, A.A.; Patil, V.L.; Pawar, U.T.; Kadam, L.D.; Kadam, P.M.; Patil, P.S. Sol-Gel Prepared Vanadium Oxide for Photocatalytic Degradation of Methylene Blue Dye. In Proceedings of the Materials Today: Proceedings; Elsevier Ltd, 2020; Vol. 43, pp. 2673–2677.
123. Oliveira, H.S.; Oliveira, L.C.A.; Pereira, M.C.; Ardisson, J.D.; Souza, P.P.; Patrício, P.O.; Moura, F.C.C. Nanostructured Vanadium-Doped Iron Oxide: Catalytic Oxidation of Methylene Blue Dye. *New Journal of Chemistry* **2015**, *39*, 3051–3058, doi:10.1039/c4nj02063d.
124. Treviño, S.; Díaz, A.; Sánchez-Lara, E.; Sanchez-Gaytan, B.L.; Perez-Aguilar, J.M.; González-Vergara, E. Vanadium in Biological Action: Chemical, Pharmacological Aspects, and Metabolic Implications in Diabetes Mellitus. *Biol Trace Elem Res* **2019**, *188*, 68–98, doi:10.1007/s12011-018-1540-6.
125. Crans, D.C.; Smee, J.J.; Gaidamauskas, E.; Yang, L. The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. *Chem Rev* **2004**, *104*, 849–902.
126. Odate, S.; Pawlik, J.R. The Role of Vanadium in the Chemical Defense of the Solitary Tunicate, *Phallusia Nigra*. *J Chem Ecol* **2007**, *33*, 643–654, doi:10.1007/s10886-007-9251-z.
127. Malinovsky, D.; Kashulin, N.A. Vanadium Isotope Ratio Measurements in Fruit-Bodies of: *Amanita Muscaria*. *Analytical Methods* **2016**, *8*, 5921–5929, doi:10.1039/c6ay01436d.
128. Braeuer, S.; Walenta, M.; Steiner, L.; Goessler, W. Determination of the Naturally Occurring Vanadium-Complex Amavadin in: *Amanita Muscaria* with HPLC-ICPMS. *J Anal At Spectrom* **2021**, *36*, 954–967, doi:10.1039/d0ja00518e.
129. Barrio, D.A.; Etcheverry, S.B. Vanadium and Bone Development: Putative Signaling Pathways. In Proceedings of the Canadian Journal of Physiology and Pharmacology; July 2006; Vol. 84, pp. 677–686.
130. Gerling, N.; Culmsee, C.; Klumpp, S.; Krieglstein, J. The Tyrosine Phosphatase Inhibitor Orthovanadate Mimics NGF-Induced Neuroprotective Signaling in Rat Hippocampal Neurons. *Neurochem Int* **2004**, *44*, 505–520, doi:10.1016/j.neuint.2003.08.013.

131. A Morita; J Zhu; N Suzuki; A Enomoto; Y Matsumoto; M Tomita; T Suzuki; K Ohtomo; Y Hosoi Sodium Orthovanadate Suppresses DNA Damage-Induced Caspase Activation and Apoptosis by Inactivating P53. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 499–511, doi:10.1038/sj.cdd.4401768.
132. Akinori Morita; Shinichi Yamamoto; Bing Wang; Kaoru Tanaka; Norio Suzuki; Shin Aoki; Azusa Ito; Tomohisa Nanao; Soichiro Ohya; Minako Yoshino; et al. Sodium Orthovanadate Inhibits P53-Mediated Apoptosis. *Cancer Res* **2010**, *70*, 257–265, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3771.
133. Uthus, E.O.; Nielsen, F.H. Effect of Vanadium, Iodine and Their Interaction on Growth, Blood Variables, Liver Trace Elements and Thyroid Status Indices in Rats. *Magnes Trace Elem* 1990, *9*, 219–226.
134. Matsumoto J; Morioka M; Hasegawa Y; Kawano T; Yoshinaga Y; Maeda T; Yano S; Kai Y; Fukunaga K; Kuratsu J. Sodium Orthovanadate Enhances Proliferation of Progenitor Cells in the Adult Rat Subventricular Zone after Focal Cerebral Ischemia. *J Pharmacol Exp Ther.* **2006**, *318*, 982–991, doi:doi: 10.1124/jpet.106.104562.
135. Hazard, S.W.; Zwemer, C.F.; Mackay, D.R.; Koduru, S. V.; Ravnicek, D.J.; Ehrlich, H.P. Topical Vanadate Enhances the Repair of Median Laparotomy Incisions. *Journal of Surgical Research* **2017**, *207*, 102–107, doi:10.1016/j.jss.2016.08.078.
136. Wise, M.A. Mineralogy Trace Element Chemistry of Lithium-Rich Micas from Rare-Element Granitic Pegmatites. *Mineralogy and Petrology* **1995**, *55*, 203–215, doi:10.1007/BF01162588.
137. Chapovsky, P.L. Bose-Einstein Condensation of Rubidium Atoms. *JETP Lett* **2012**, *95*, 132–136, doi:10.1134/S0021364012030046.
138. Shvarchuck, I.; Dieckmann, K.; Zielonkowski, M.; Walraven, J.T.M. Broad-Area Diode-Laser System for a Rubidium Bose-Einstein Condensation Experiment. *Appl Phys B* **2000**, *71*, 475–480, doi:10.1007/s003400000395.
139. Martin Halpern Rubidium-Strontium Date of Possibly 3 Billion Years for a Granitic Rock from Antarctica. *Science (1979)* **1970**, *169*, 977–978.
140. Yen CK; Yano Y; Budinger TF; Friedland RP; Derenzo SE; Huesman RH; O'Brien HA Brain Tumor Evaluation Using Rb-82 and Positron Emission Tomography. *J Nucl Med.* **1982**, *23*, 532–537.
141. Liu, Y.; Tan, Y.; Wu, J. Rubidium Doped Nano-Hydroxyapatite with Cytocompatibility and Antibacterial. *Journal of Asian Ceramic Societies* **2021**, *9*, 300–310, doi:10.1080/21870764.2020.1865861.
142. Rahimi, N.; Hassanipour, M.; Yarmohammadi, F.; Faghir-Ghanesefat, H.; Pourshadi, N.; Bahramnejad, E.; Dehpour, A.R. Nitric Oxide and Glutamate Are Contributors of Anti-Seizure Activity of Rubidium Chloride: A Comparison with Lithium. *Neurosci Lett* **2019**, *708*, 134349, doi:10.1016/j.neulet.2019.134349.
143. Ouyang, Z.; Huang, Q.; Liu, B.; Wu, H.; Liu, T.; Liu, Y. Rubidium Chloride Targets JNK/P38-Mediated NF-KB Activation to Attenuate Osteoclastogenesis and Facilitate Osteoblastogenesis. *Front Pharmacol* **2019**, *10*, 1–12, doi:10.3389/fphar.2019.00584.
144. Bose, S.; Fielding, G.; Tarafder, S.; Bandyopadhyay, A. Understanding of Dopant-Induced Osteogenesis and Angiogenesis in Calcium Phosphate Ceramics. *Trends Biotechnol* 2013, *31*, 594–605.
145. Pantulap, U.; Arango-Ospina, M.; Boccaccini, A.R. Bioactive Glasses Incorporating Less-Common Ions to Improve Biological and Physical Properties. *J Mater Sci Mater Med* 2022, *33*.
146. TAN, Y. ni; CHEN, W. juan; WEI, W.; HUANG, Q. li; HE, X. Rubidium-Modified Bioactive Glass-Ceramics with Hydroxyapatite Crystals for Bone Regeneration. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)* **2021**, *31*, 521–532, doi:10.1016/S1003-6326(21)65514-0.
147. Wada, T.; Nakashima, T.; Hiroshi, N.; Penninger, J.M. RANKL-RANK Signaling in Osteoclastogenesis and Bone Disease. *Trends Mol Med* 2006, *12*, 17–25.
148. Lee, K.; Chung, Y.H.; Ahn, H.; Kim, H.; Rho, J.; Jeong, D. Selective Regulation of MAPK Signaling Mediates RANKL-Dependent Osteoclast Differentiation. *Int J Biol Sci* **2016**, *12*, 235–245, doi:10.7150/ijbs.13814.
149. Takayanagi H; Kim S; Koga T; Nishina H; Isshiki M; Yoshida H; Saiura A; Isobe M; Yokochi T; Inoue J; et al. Induction and Activation of the Transcription Factor NFATc1 (NFAT2) Integrate RANKL Signaling in Terminal Differentiation of Osteoclasts. *Dev Cell* **2002**, *3*, 889–901.
150. Ikeda, F.; Matsubara, T.; Tsurukai, T.; Hata, K.; Nishimura, R.; Yoneda, T. JNK/c-Jun Signaling Mediates an Anti-Apoptotic Effect of RANKL in Osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research* **2008**, *23*, 907–914, doi:10.1359/jbmr.080211.
151. Tobeiha, M.; Moghadasian, M.H.; Amin, N.; Jafarnejad, S. RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. *Biomed Res Int* **2020**, *2020*, doi:10.1155/2020/6910312.

152. Gao, Y.; Sun, Y.; Wang, D.; Chen, B.; Gu, W. Geological and Geochemical Constraints on the Origin of the Sr Mineralization in Huayingshan Ore District, Chongqing, South China. *Minerals* **2023**, *13*, doi:10.3390/min13020279.
153. MacMillan, J.P.; Park, J.W.; Gerstenberg, R.; Wagner, H.; Köhler, K.; Wallbrecht, P. Strontium and Strontium Compounds. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2000; pp. 1–8.
154. Qiu, K.; Zhao, X.J.; Wan, C.X.; Zhao, C.S.; Chen, Y.W. Effect of Strontium Ions on the Growth of ROS17/2.8 Cells on Porous Calcium Polyphosphate Scaffolds. *Biomaterials* **2006**, *27*, 1277–1286, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.08.006.
155. Ni, G.X.; Yao, Z.P.; Huang, G.T.; Liu, W.G.; Lu, W.W. The Effect of Strontium Incorporation in Hydroxyapatite on Osteoblasts in Vitro. *J Mater Sci Mater Med* **2011**, *22*, 961–967, doi:10.1007/s10856-011-4264-0.
156. Zhang, J.; Zhu, X.; Kong, Y.; Huang, Y.; Dang, X.; Mei, L.; Zhao, B.; Lin, Q.; Wang, J. Strontium Stimulates Alkaline Phosphatase and Bone Morphogenetic Protein-4 Expression in Rat Chondrocytes Cultured in Vitro. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2019**, *55*, 15–19, doi:10.1016/j.jtemb.2019.05.008.
157. Physiology, C.; Peng, S.; Zhou, G.; Luk, K.D.; Cheung, K.M.; Li, Z.; Moon Lam, W.; Zhou, Z.; Lu, W.W. Strontium Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Through the Ras/MAPK Signaling Pathway. *Original Paper Cell Physiol Biochem* **2009**, *23*, 165–174.
158. Rybchyn, M.S.; Slater, M.; Conigrave, A.D.; Mason, R.S. An Akt-Dependent Increase in Canonical Wnt Signaling and a Decrease in Sclerostin Protein Levels Are Involved in Strontium Ranelate-Induced Osteogenic Effects in Human Osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 23771–23779, doi:10.1074/jbc.M111.251116.
159. Peng, S.; Liu, X.S.; Zhou, G.; Li, Z.; Luk, K.D.K.; Guo, X.E.; Lu, W.W. Osteoprotegerin Deficiency Attenuates Strontium-Mediated Inhibition of Osteoclastogenesis and Bone Resorption. *Journal of Bone and Mineral Research* **2011**, *26*, 1272–1282, doi:10.1002/jbmr.325.
160. Atkins, G.J.; Welldon, K.J.; Halbout, P.; Findlay, D.M. Strontium Ranelate Treatment of Human Primary Osteoblasts Promotes an Osteocyte-like Phenotype While Eliciting an Osteoprotegerin Response. *Osteoporosis International* **2009**, *20*, 653–664, doi:10.1007/s00198-008-0728-6.
161. Barralet, J.; Gbureck, U.; Habibovic, P.; Vorndran, E.; Gerard, C.; Doillon, C.J. *Angiogenesis in Calcium Phosphate Scaffolds by Inorganic Copper Ion Release*;
162. Vahabzadeh, S.; Roy, M.; Bose, S. Effects of Silicon on Osteoclast Cell Mediated Degradation, in Vivo Osteogenesis and Vasculogenesis of Brushite Cement. *J Mater Chem B* **2015**, *3*, 8973–8982, doi:10.1039/c5tb01081k.
163. Maïmoun, L.; Brennan, T.C.; Badoud, I.; Dubois-Ferriere, V.; Rizzoli, R.; Ammann, P. Strontium Ranelate Improves Implant Osseointegration. *Bone* **2010**, *46*, 1436–1441, doi:10.1016/j.bone.2010.01.379.
164. Alegre, D.N.; Ribeiro, C.; Sousa, C.; Correia, J.; Silva, L.; De Almeida, L. Possible Benefits of Strontium Ranelate in Complicated Long Bone Fractures. *Rheumatol Int* **2012**, *32*, 439–443, doi:10.1007/s00296-010-1687-8.
165. Mondal, S.; Nguyen, V.T.; Park, S.; Choi, J.; Thien Vo, T.M.; Shin, J.H.; Kang, Y.H.; Oh, J. Rare Earth Element Doped Hydroxyapatite Luminescent Bioceramics Contrast Agent for Enhanced Biomedical Imaging and Therapeutic Applications. *Ceram Int* **2020**, *46*, 29249–29260, doi:10.1016/j.ceramint.2020.08.099.
166. Ptáček, P. Synthetic Phase with the Structure of Apatite. In *Apatites and their Synthetic Analogues - Synthesis, Structure, Properties and Applications*; InTech, 2016.
167. Ramesh, S.; Natasha, A.N.; Tan, C.Y.; Bang, L.T.; Niakan, A.; Purbolaksono, J.; Chandran, H.; Ching, C.Y.; Ramesh, S.; Teng, W.D. Characteristics and Properties of Hydroxyapatite Derived by Sol–Gel and Wet Chemical Precipitation Methods. *Ceram Int* **2015**, *41*, 10434–10441, doi:10.1016/j.ceramint.2015.04.105.
168. Adeleye, A.T.; John, K.I.; Adeleye, P.G.; Akande, A.A.; Banjoko, O.O. One-Dimensional Titanate Nanotube Materials: Heterogeneous Solid Catalysts for Sustainable Synthesis of Biofuel Precursors/Value-Added Chemicals—a Review. *J Mater Sci* **2021**, *56*, 18391–18416.
169. Abidi, S.S.A.; Murtaza, Q. Synthesis and Characterization of Nano-Hydroxyapatite Powder Using Wet Chemical Precipitation Reaction. *J Mater Sci Technol* **2014**, *30*, 307–310, doi:10.1016/j.jmst.2013.10.011.
170. Sadat-Shojai, M.; Khorasani, M.T.; Dinpanah-Khoshdargi, E.; Jamshidi, A. Synthesis Methods for Nanosized Hydroxyapatite with Diverse Structures. *Acta Biomater* **2013**, *9*, 7591–7621.
171. Rojas, L.; Olmedo, H.; García-Piñeres, A.J.; Silveira, C.; Tasic, L.; Fraga, F.; Montero, M.L. Simple Route for Nano-Hydroxyapatite Properties Expansion. *Biomedical Materials (Bristol)* **2015**, *10*, doi:10.1088/1748-6041/10/5/055015.
172. Longo, E.; de Almeida La Porta, F. *Recent Advances in Complex Functional Materials: From Design to Application*; Springer International Publishing, 2017; ISBN 9783319538983.

173. Biggemann, D.; Da Silva, M.H.P.; Rossi, A.M.; Ramirez, A.J. High-Resolution Transmission Electron Microscopy Study of Nanostructured Hydroxyapatite. *Microscopy and Microanalysis* **2008**, *14*, 433–438, doi:10.1017/S1431927608080744.
174. Zhuang, Z.; Miki, T.; Yumoto, M.; Konishi, T.; Aizawa, M. Ultrastructural Observation of Hydroxyapatite Ceramics with Preferred Orientation to A-Plane Using High-Resolution Transmission Electron Microscopy. In Proceedings of the Procedia Engineering; Elsevier Ltd, 2012; Vol. 36, pp. 121–127.
175. David B. Williams; C. Barry Carter Transmission Electron Microscopy. In; Springer US, 2009; Vol. 1, pp. 3–22.
176. Resano, M.; Vanhaecke, F.; De Loos-Vollebregt, M.T.C. Electrothermal Vaporization for Sample Introduction in Atomic Absorption, Atomic Emission and Plasma Mass Spectrometry - A Critical Review with Focus on Solid Sampling and Slurry Analysis. *J Anal At Spectrom* **2008**, *23*, 1450–1475, doi:10.1039/b807756h.
177. Scheffler, G.L.; Pozebon, D.; Beauchemin, D. Improving the Analytical Performance of Electrothermal Vaporization Coupled to Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry Using a Mixed-Gas Plasma. *J Anal At Spectrom* **2019**, *34*, 891–898, doi:10.1039/c9ja00010k.
178. Khan, S.A.; Khan, S.B.; Khan, L.U.; Farooq, A.; Akhtar, K.; Asiri, A.M. Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization. In *Handbook of Materials Characterization*; Springer International Publishing, 2018; pp. 317–344 ISBN 9783319929552.
179. Joseph R. Lakowicz Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Joseph R. Lakowicz, Ed.; Springer : New York, NY, 2017; pp. 27–61.