

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALJA PRAH

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALJA PRAH

**VREDNOTENJE ANORGANSKIH KOVINSKIH MATRIC IN NJIHOVIH
INTERKALATOV KOT POTENCIALNIH ADJUVANSOV**

**EVALUATION OF POTENTIAL ADJUVANT PROPERTIES OF INORGANIC
METAL FRAMEWORKS AND THEIR INTERCALATES**

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2017

Raziskovalni del magistrske naloge sem opravljala na School of Pharmacy, University College London v Londonu, na Department of Pharmaceutics pod somentorstvom dr. Garetha Williamsa. Pisanje naloge pa sem nadaljevala na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina in somentorstvom dr. Garetha Williamsa.

Alja Prah

Predsednica magistrske komisije: prof. dr. Marija Bogataj

Mentor: izr. prof. dr. Žiga Jakopin

Somentor: dr. Gareth Williams

Član: doc. dr. Tomaž Bratkovič

Vsebina

1	UVOD	1
1.1	Adjuvansi	1
1.2	Večplastne trdnine.....	2
1.3	Klasifikacija večplastnih trdnin	3
1.4	Anionske gline.....	4
1.5	Večplastni dihidroksidi	4
1.5.1.	Zgodovina LDH.....	5
1.5.2.	Priprava večplastnih dihidroksidov	5
1.5.3.	Koprecipitacija oz. soobarjanje	6
1.5.3.1.	Obarjanje pri nizki nasičenosti	6
1.5.3.2.	Obarjanje pri visoki nasičenosti	7
1.5.3.3.	Druge metode obarjanja	7
1.5.4.	Ionska izmenjava	8
1.6	Hidroksi dvojne soli	9
1.7	Interkalacija LDH in HDS.....	10
2	NAMEN DELA.....	12
3	MATERIALI IN METODE	13
3.1	Materiali.....	13
3.1.1.	Sinteza HDS in LDH ter interkalacija	13
3.1.2.	Delo s celicami	14
3.1.2.1.	Kemikalije	14
3.1.2.2.	Laboratorijska oprema.....	15
3.1.2.3.	Aparature.....	15
3.2	Metode.....	16
3.2.1.	Sinteza HDS in LDH	16
3.2.2.	Interkalacija	16
3.2.3.	Metode karakterizacije	17
3.2.3.1.	Rentgenska difrakcija (XRD).....	17
3.2.3.2.	Infrardeča spektroskopija (IR).....	18
3.2.3.3.	Termogravimetrična analiza (TGA).....	18
3.2.3.4.	Vrstični elektronski mikroskop (SEM)	18
3.2.3.5.	Velikost delcev in polidisperzni indeks (PDI).....	18
3.2.4.	Gojenje celic.....	19
3.2.4.1.	Priprava gojišč.....	19
3.2.4.2.	THP-1	19
3.2.4.3.	RAW264.7	20
3.2.5.	Test Alamar Blue.....	21

3.2.6.	Encimskoimunski testi (ELISA)	22
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	24
4.1	Karakterizacija spojin	24
4.1.1.	Karakterizacija $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov	24
4.1.2.	Karakterizacija $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8]\text{Cl}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov	29
4.1.3.	Karakterizacija $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov	33
4.1.4.	Karakterizacija $[\text{Zn}_{3,8}\text{Co}_{1,2}(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov	37
4.1.5.	Karakterizacija $[\text{Zn}_3\text{Ni}_2(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov	41
4.1.6.	Karakterizacija $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov	45
4.2	Testiranje na celicah	49
4.2.1.	Določanje volumna in koncentracije vzorca	Napaka! Zaznamek ni definiran.
4.2.2.	Citotoksičnost	50
4.2.3.	Encimskoimunski testi (ELISA)	54
5	SKLEPI	56
6	LITERATURA	57

Povzetek

Cepivom se že več desetletij dodajajo adjuvansi – to so snovi, ki povečajo imunski odziv na dano cepivo. V veliki večini primerov je kot adjuvans uporabljen ti. 'alum'. Pojavilo pa se je tudi že nekaj potencialnih alternativ za alum, med katere štejemo tudi nekatere večplastne trdnine, kot so večplastni dihidroksidi. Le-ti spadajo v splošnem med anionske gline in so večplastne anorganske kovinske strukture. Med njihove plasti lahko na enostaven način interkaliramo različne spojine in s tem vplivamo na lastnosti takega kompleksa. Večplastnim dihidroksidom sorodne strukture so tudi hidroksi dvojne soli, ki so do zdaj bile manj raziskane. Njihova sorodna struktura in enostavnost interkalacije pa dajeta možnost za pripravo kompleksov, ki bi lahko imeli potencial za spodbujanje imunskega odziva.

Namen našega dela je bil torej ovrednotiti potencial nekaterih večplastnih anorganskih kovinskih matric kot adjuvansov. V ta namen smo sintetizirali šest različnih večplastnih trdnin in vanje interkalirali tri kisline, ki so sicer prisotne tudi v Krebsovem ciklu (jantarno, jabolčno in fumarno). Vse spojine smo podrobno karakterizirali z uporabo različnih tehnik, kot so rentgenska praškovna difrakcija, infrardeča spektroskopija, termogravimetrija, vrstična elektronska mikroskopija in merjenje velikosti delcev. Tako pripravljenim spojinam smo nato na dveh celičnih linijah (THP-1 in RAW264.7) določili citotoksičnost. Izvedli smo tudi imunski test in tako izmerili koncentracijo dejavnika tumorske nekroze α in interleukina-6.

Ugotovili smo, da so vse sintetizirane hidroksi dvojne soli in njihovi interkalati bili preveč toksični, prav tako pa niso značilno povečali koncentracije citokinov. Večplastni dihidroksid in njegovi interkalati so bili manj toksični, interkalat s fumarno kislino pa je tudi nekoliko povečal koncentracijo citokinov in bi tako lahko predstavljal možnost za nadaljnje raziskave.

Ključne besede: adjuvansi, večplastni dihidroksidi, hidroksi dvojne soli, anorganske kovinske matrice, večplastne trdnine.

Abstract

For decades, components known as 'adjuvants' have been added to vaccines. Their role is to increase the immune response to the administered vaccine. In most cases, the adjuvant used is 'alum'. Some alternatives for alum have been presented, including layered solids, such as layered double hydroxides. These are layered inorganic metal frameworks and constitute a subset of anionic clays. We can easily intercalate different compounds in the interlayer region, which affects the properties of such intercalates. Hydroxy double salts have a similar structure to layered double hydroxides, but have thus far been less explored. However, their similar structure and ease of intercalation offers a unique opportunity for preparation of intercalates, that could have the potential of producing an increased immune response.

The purpose of our work was to evaluate the potential of selected layered inorganic metal frameworks as adjuvants. In order to achieve this objective, we synthesized six different layered solids in which three different acids (succinic, malic and fumaric acid) that participate in the citric acid cycle were intercalated. All synthesized products were characterised using different methods, like X-ray diffraction, infrared spectroscopy, thermogravimetry, scanning electron microscopy and measuring particle size. All products were then evaluated on two different cell lines (THP-1 and RAW 264.7) for cytotoxicity. We also conducted an ELISA to measure the release of tumour necrosis factor α and interleukin 6.

All hydroxy double salts and their intercalates proved to be cytotoxic and did not significantly increase the concentration of secreted cytokines. The layered double hydroxide and its intercalates were less toxic. In addition, the layered double hydroxide intercalated with fumaric acid slightly increased the release of the cytokines and could be a lead for further research.

Key words: adjuvants, layered double hydroxides, hydroxy double salts, inorganic metal frameworks, layered solids.

Seznam okrajšav

λ_{ex}	valovna dolžina ekscitacije
λ_{em}	valovna dolžina emitiranja
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) (angl. 2,2'- azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
Ca ₂ Al-NO ₃	[Ca ₂ Al(OH) ₆]NO ₃ · γ H ₂ O LDH
DMEM	Eaglov medij, modificiran po Dulbeccu (angl. Dulbecco's modified Eagle's medium)
ELISA	encimski imunski test (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
FBS	fetalni goveji serum (angl. fetal bovine serum)
FTIR	infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (angl. Fourier transform infrared spectroscopy)
HDS	hidroksi dvojna sol (angl. hydroxy double salt)
ICSD	baza anorganskih kristalnih struktur (angl. inorganic crystal structure database)
IL-6	interlevkin 6
LDH	večplastni dihidroksid (angl. layered double hydroxide)
LPS	lipopolisaharid (angl. lipopolysaccharide)
PBS	fosfatni pufer (angl. phosphate buffer saline)
PMA	forbol 12-miristat 13-acetat (angl. phorbol 12-myristate 13-acetate)
PDI	polidisperzni indeks (angl. polydispersity index)
RAW264.7	celična linija mišjih makrofagov
RPMI	medij za celice, ki so ga razvili v Inštitutu Roswell Park (angl. Roswell Park Memorial Institute)
SEM	vrstični elektronski mikroskop (angl. scanning electron microscope)
TGA	termogravimetrična analiza (angl. thermogravimetric analysis)
THP-1	humana monocitna celična linija
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (angl. 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine)
TNF- α	tumor nekrotizirajoči faktor alfa (angl. tumor necrosis factor alpha)
XRD	rentgenska difrakcija (angl. X-ray diffraction)

Zn-acetat	$[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ HDS
Zn-Cl	$[\text{Zn}_5(\text{OH})_8]\text{Cl}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ HDS
Zn-NO ₃	$[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ HDS
ZnCo-NO ₃	$[\text{Zn}_{3.8}\text{Co}_{1.2}(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ HDS
ZnNi-NO ₃	$[\text{Zn}_3\text{Ni}_2(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ HDS

1 Uvod

1.1 Adjuvansi

Izum cepiv je nedvomno eden izmed večjih dosežkov moderne medicine – cepiva naj bi rešila cca. 3 milijone življenj na leto. Pri cepljenju izpostavimo organizem in imunski sistem nekemu oslavljenemu antigenu v varnih pogojih, v katerih ni nevarnosti za okužbo. S tem povzročimo tvorbo spominskih celic imunskega sistema in omogočimo hitrejši in učinkovitejši odgovor na morebitne okužbe v prihodnosti.

Klasična cepiva v glavnem vsebujejo oslabljene ali inaktivirane mikrobe, medtem ko se novejša cepiva zanašajo na uporabo skrbno zasnovanih in očiščenih antigenov, ki imajo večjo varnost (1). Ker ponavadi manj intenzivno sprožijo imunski odziv, je potrebno večkratno cepljenje ali pa večja koncentracija antigena za doseganje iste učinkovitosti. Tudi s tem razlogom se k cepivom dodaja adjuvanse (iz latinskega *adiuvare*, kar pomeni *pomagati*) – to so snovi, ki povečajo imunski odziv na dano cepivo in s tem zmanjšajo potrebo po večkratnem cepljenju in hkrati omogočajo rabo manjše koncentracije antigena (2).

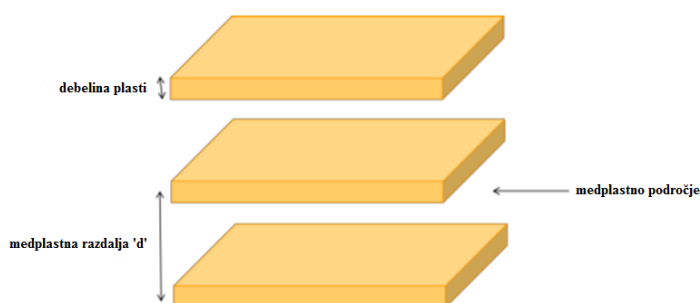
Lastnosti idealnega adjuvansa so nizka cena proizvodnje, varnost in zagotovitev dovolj močnega imunskega odgovora ob cepljenju. Najbolj pogosto se kot adjuvans v cepivih uporablja ti. 'alum', ki ga je prvi omenil Glenney leta 1926 (3). Z vidika kemijske strukture je Glenney-jev alum bil $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$. Mnogi imunologi pa dandanes pravzaprav z nazivom 'alum' (nepravilno) opisujejo tako aluminijev oksihidroksid ($AlO(OH)$) kot tudi aluminijev hidroksifosfat ($Al(OH)_x(PO_4)_y$) (4). $AlO(OH)$ ima kristalno večplastno strukturo, na površini katere so hidroksilne skupine. $Al(OH)_x(PO_4)_y$ pa ima amorfnost strukturo, na površini katere so prisotne hidroksilne in fosfatne skupine (5).

Šele leta 1997 je bilo registrirano cepivo proti gripi, v katerem kot adjuvans ni bil uporabljen alum, ampak MF59 (emulzija O/V iz skvalena, ki ga stabilizirata površinsko aktivni snovi). Kasneje sta se pojavili še AS03 (emulzija O/V iz skvalena, α -tokoferola in površinsko aktivne snovi) v cepivu proti virusu influence H5N1 in AS04 (kombinacija analoga LPS, monofosforil lipida A, in aluminijevega hidroksida) v cepivu proti virusu hepatitisa B in humanemu papiloma virusu (6).

Kljub zelo razširjeni uporabi pa aluminijevi adjuvansi niso popolni. Njihova največja pomanjkljivost je, da v glavnem spodbudijo Th2-odziv in tako niso tako uporabni proti boleznim, pri katerih le-ta nima glavne vloge (npr. znotrajcelični paraziti ali tuberkuloza) (4). Prav tako so z aluminijem domnevno povezani številni stranski učinki, za katere pa sicer ni trdnih dokazov. Zaradi teh pomanjkljivosti je vredno iskati alternativne rešitve. Anorganske spojine, ki so bile raziskane v ta namen so: kalcijev fosfat, kobaltov oksid (Co_3O_4), cinkov oksid (ZnO), drugi kovinski oksidi, zlati in srebrni nanodelci ter tudi večplastni dihidroksidi (LDH) (5).

1.2 Večplastne trdnine

Trdnine so večplastne takrat, ko so vezi med atomi iste ravnine veliko močnejše od vezi z atomi sosednjih ravnin (7). Atomi v ravnini so tako običajno vezani kovalentno, medtem ko so med sosednjimi ravninami prisotne van der Waalsove vezi. Posamezne plasti si tako lahko predstavljamo kot velike planarne makromolekule, ki naložene druga na drugo sestavijo molekularne kristale oz. večplastne trdnine. Slika 1 prikazuje tipično sestavo večplastnih trdnin.



Slika 1: Tipična sestava večplastnih trdnin.

Takšna sestava je še posebej zanimiva, saj omogoča interkalacijo iona ali molekule med plasti, ki se posledično lahko razširijo ali nabreknejo. Interkalacija je običajno reverzibilna, zato večplastne trdnine lahko običajno ohranijo svojo prvotno strukturo skozi proces interkalacije in deinterkalacije.

Prvi primeri večplastnih trdnin so se pojavili na Kitajskem med leti 600 in 700 z nastankom porcelana. Večje zanimanje za interkalacijo v večplastne trdnine pa se je začelo okoli leta 1840, ko so odkrili, da se lahko žveplova kislina vrine med plasti grafita. Šele po letu 1960 pa je to zanimanje naraslo, predvsem zaradi odkritja, da interkalacija lahko

pomembno spremeni nekatere lastnosti prvotne spojine (npr. kemične, katalitične, električne in optične) (7).

Interkalati večplastnih trdnin so zelo uporabne spojine. Med pomembnejšimi je njihova uporaba v litij-ionskih baterijah in pri heterogeni katalizi. Smektične gline, ki lahko sprejmejo tako nevtralne kot tudi nabite spojine, pa se uporabljajo za razbarvanje jedilnih olj, bistritev alkoholnih pijač in odstranjevanje kislih nečistot iz PVC-ja.

1.3 Klasifikacija večplastnih trdnin

Večplastne trdnine lahko klasificiramo na več različnih načinov. Najenostavneje jih razdelimo na anorganske in organske glede na sestavo posameznih plasti. Takšna razdelitev ima smisel, če so plasti ali povsem organske ali povsem anorganske, pomen pa izgubi, če se srečujemo z mešanimi plastmi.

Razdelimo pa jih lahko tudi glede na naboj plasti, in sicer v dve skupini, kot prikazuje Slika 2: nenabite in nabite plasti (8). Prvo skupino lahko razdelimo na izolatorje (npr. nikljev cianid, nikljev hidroksid, alkil in arilfosfonati kovin 4. skupine) in prevodnike (npr. grafit). V drugo skupino pa spadajo nekatere kationske (npr. montmorijonit, saponit, vermikulit, muskovit) in anionske gline (npr. hidrotalcit in druge hidrotalcitu podobne gline). Kationske gline so v naravi bolj pogoste; sestavljajo jih negativno nabite aluminijevo-silikatne plasti, med katerimi so kationi. Anionske gline so v naravi manj pogoste, hkrati pa jih je možno enostavno in poceni sintetizirati. Sestavljene so iz pozitivno nabitih plasti iz kovinskih hidroksidov, med njimi pa so anioni in molekule vode (9).



Slika 2: Klasifikacija večplastnih trdnin glede na naboj plasti.

Solin pa je predlagal delitev večplastnih trdnin v tri skupine na podlagi togosti in debeline posameznih plasti (10). V 1. skupino spadajo trdnine s plastmi debeline enega atoma, kot sta npr. grafit in borov nitrid. V 2. skupino spadajo trdnine, katerih plasti so običajno sestavljene iz treh ravnin med seboj povezanih atomov. V to skupino spadajo večplastni dihalogenidi (npr. MoS_2 , TiS_2 in HfS_2), železov oksiklorid in več kovinskih halidov (npr. FeCl_2 in CoCl_2). Plasti trdnin iz te skupine so bolj toge v primerjavi s trdninami 1. skupine.

V 3. skupini pa najdemo trdnine, katerih plasti so običajno sestavljene iz petih ali več ravnin med seboj povezanih atomov. Le-te so tako veliko bolj toge kot trdnine iz prvih dveh skupin. Mednje uvrščamo večplastne silikatne gline in večplastne perovskite.

1.4 Anionske gline

Gline so med najpogostejšimi minerali, ki jih lahko najdemo v naravi. Uporabljajo se lahko na veliko področjih. Pogosto jih uporabljamo kot gradbeni material, premaz in polnilo za papir, pa tudi kot livarske kalupe, v mačjih straniščih in v zdravstvene namene. Lahko se uporabljajo tudi kot adsorbenti, katalizatorji, ionski izmenjevalci, sredstva za razbarvanje (9).

1.5 Večplastni dihidroksidi

Najbolje znane anionske gline so hidrotalcitu podobni večplastni hidroksidi (v izvirniku layered double hydroxides, LDH). Le-te najdemo bodisi v naravi kot minerale ali pa jih sintetiziramo v laboratoriju. Vsi LDH, ki jih lahko najdemo v naravi, imajo strukturo, podobno hidrotalcitu oz. njegovemu heksagonalnemu analogu manaseitu (11). Večino lahko opišemo s splošno formulo $[\text{M}^{\text{II}}_{1-x}\text{M}^{\text{III}}_x(\text{OH})_{2x}]^{x+}(\text{A}^{n-})_{x/n} \cdot m\text{H}_2\text{O}$, pri čemer je M^{II} divalentna kovina (običajno Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} ali Co^{+2}), M^{III} trivalentna kovina (kot Al^{+3} , Mn^{+3} , Fe^{+3} , Ni^{+3} , Co^{+3}) in A^{n-} primeren anion.

Osnovna struktura večplastnih dihidroksidov je zelo podobna strukturi minerala brucita, $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (12). V brucitu je vsak magnezijev ion oktaedrično obkrožen s šestimi hidroksidnimi ioni, posamezni oktaedri pa si drug z drugim delijo robove in tako tvorijo neskončno dvodimenzionalno plast. Oktaeder je nekoliko sploščen, razdalja med hidroksidnimi ioni na isti strani plasti je 0,314 nm, razdalja med hidroksidnimi ioni na nasprotnih straneh pa 0,270 nm. Dolžina vezi Mg-O je približno 0,207 nm, debelina posamezne plasti pa 0,478 nm (11).

Pri hidrotalcitu dobijo plasti ob zamenjavi dela magnezijevih ionov z aluminijevimi pozitivni naboj. Le-ta je v hidrotalcitu uravnotežen s karbonatnimi ioni, ki so med plastmi. Med plastmi so tudi molekule vode, ki so z vodikovimi vezmi vezane na OH skupine v plasteh ali na ione med plastmi. Elektrostatske interakcije in vodikove vezi med posameznimi plastmi ter ioni oz. molekulami, ki so med njimi, omogočajo trdnost celotne večplastne strukture hidrotalcita.

1.5.1. Zgodovina LDH

Večplastne dihidrokside poznamo že več kot 150 let, od odkritja minerala hidrotalcita leta 1842 na Švedskem. Leta 1915 je formulo hidrotalcita, $[\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}]\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pravilno določil Manasse (13), ki je prvi prepoznal pomembnost karbonatnih ionov v strukturi tega minerala. Feitknecht je v 30-ih in 40-ih letih 20. stoletja veliko pisal o nastanku večplastnih dihidroksidov ob dodatku baze v raztopino, ki vsebuje M^{II} in M^{III} ione. Napačno pa je sklepal, da se v njihovi strukturi izmenjujejo plasti bogate z npr. aluminijem in plasti bogate z npr. magnezijem (14). Šele po letu 1960 pa sta Allman (15) in Taylor (16) s pomočjo rentgenske praškovne difrakcije določila tudi glavne značilnosti strukture večplastnih dihidroksidov.

Termično razgradnjo hidrotalcita in njegovo pretvorbo v spinel je leta 1944 opisal Caillere (17). Mg-Al mešane hidrokside (kasneje prepoznane kot hidrotalcit) so že leta 1960 začeli uporabljati kot antacide (18), uporaba hidrotalcitnih polnil za zaviranje gorenja pa je bila patentirana leta 1975 (19). Leta 1973 je Miyata objavil prelomno raziskavo o sintezi in fizikalno-kemijskih lastnostih hidrotalcitu podobnih spojin (20), od takrat pa je interes za večplastne dihidrokside le še naraščal in do danes so izvedli veliko raziskav na tem področju, veliko pa ostaja še tudi neraziskanega.

1.5.2. Priprava večplastnih dihidroksidov

Večplastne dihidrokside lahko sintetiziramo na veliko različnih načinov. Med direktne metode priprave sodijo koprecipitacija oz. soobarjanje, sol-gel sinteza, metoda mehke kemije (»chimie douce«), reakcija sol-oksid, hidrotermalna rast in elektrokemična sinteza. Indirektne metode priprave, ki kot predhodnik uporabljajo drug LDH, pa so vse metode ionske izmenjave (direktna anionska izmenjava, anionska izmenjava z napadom kisline in eliminacijo gostujočega iona v medplastnem prostoru ter anionska izmenjava s tvorbo soli

površinsko aktivne snovi) in druge metode, ki ne koristijo ionske izmenjave (metoda razslojevanja in ponovne izgradnje ter metoda rekonstrukcije LDH) (21).

1.5.3. Koprecipitacija oz. soobarjanje

Metoda soobarjanja je najpogostejša metoda za sintezo večplastnih dihidroksidov, delno tudi zato, ker je enostavna za uporabo tudi pri pripravi večjih količin. Pri metodi soobarjanja se premešata vodni raztopini dveh kovinskih soli v prisotnosti aniona in baze - tako pride do nukleacije in rasti kovinskih hidroksidnih plasti.

Ta metoda se lahko uporablja le, če je željen medplastni anion vezan vsaj toliko močno kot protiion v uporabljeni kovinski soli. Zato se večinoma uporabljajo nitrati in kloridi, ne pa sulfati. Večja pomanjkljivost je, da anion, ki ga vnašamo v večplastni dihidroksid, ne sme prelahko tvoriti netopnih soli s prisotnimi kationi – LDH fosfatov zato ne moremo pripraviti na tak način (11).

Če želimo doseči sočasno obarjanje dveh ali več kationov, mora sinteza potekati v prenasičeni raztopini. Običajno prenasičenje dosegamo z nadzorom pH vrednosti raztopine. V tem primeru mora pH biti višji ali enak tistemu pH, pri katerem se obori najbolj topen hidroksid (22).

Po soobarjanju je nastala spojina pogosto podvržena še toplotni obdelavi. Cilj le-te je izboljšan izkoristek in/ali kristalna struktura amorfnih ali slabše kristaliziranih materialov. Pogosto pri tovrstnem postopku vodno suspenzijo LDH segrevamo par ur ali več dni, na temperaturi med 273 K in 373 K. Drug način pa je segrevanje vzorca v zlati ali srebrni kapsuli ali v avtoklavu iz nerjavečega jekla pod visokim pritiskom (med 10 in 150 Mpa) (23). V laboratorijskem merilu pa se reakcijska zmes pogosto meša več dni na povišani temperaturi.

Pogosto se uporabljata dve različni metodi soobarjanja: obarjanje pri nizki nasičenosti in obarjanje pri visoki nasičenosti.

1.5.3.1. Obarjanje pri nizki nasičenosti

Obarjanje pri nizki nasičenosti običajno poteka tako, da v reaktor, ki vsebuje vodno raztopino zelenega medplastnega aniona, dodajamo mešani raztopini divalentne in trivalentne kovinske soli v želenem razmerju. Hkrati se dodaja tudi raztopina baze, in sicer

s kontrolirano hitrostjo, tako da se pH ohranja na želeni vrednosti, ki prinaša soobarjanje obeh kovinskih soli. Hitrost dodajanja se lahko kontrolira z ročnim nadzorovanjem pH vrednosti ali z uporabo avtomatske naprave za titriranje, kar običajno prinaša boljše rezultate (24). Anion, ki ga želimo interkalirati, mora imeti visoko afiniteto do plasti LDH in mora biti prisoten v presežku, saj sicer lahko pride do vključitve proti-anionov kovinskih soli. LDH imajo zelo visoko afiniteto do karbonatnih anionov, zato se reakcije običajno izvajajo v dušikovi atmosferi, da se s tem izognemo absorpciji ogljikovega dioksida iz zraka, ki bi lahko povzročil nastanek karbonatnih ionov. Prednost te metode je, da preko natančnega nadzora pH raztopine omogoča natančno kontrolo gostote naboja (razmerje M^{II}/M^{III}) hidroksidnih plasti nastajajočega LDH. Prav tako pri obarjanju ob nizki nasičenosti običajno nastajajo oborine z bolj urejeno kristalno strukturo kot pri obarjanju ob visoki nasičenosti, saj je v prvem primeru hitrost rasti kristala višja kot hitrost nukleacije (25).

1.5.3.2. Obarjanje pri visoki nasičenosti

Pri tej metodi gre za dodajanje mešane raztopine M^{II}/M^{III} soli v bazično raztopino, ki vsebuje ustrezen medplastni anion. Ob uporabi tega postopka običajno dobimo materiale z manj urejeno kristalno strukturo, saj pride do nastanka velikega števila kristalizacijskih jeder (25). Pri tej metodi se neprekinjeno spreminja pH raztopine, zato pogosto pride do tvorbe nečistih $M(OH)_2$ in/ali $M(OH)_3$ faz, in posledično nastanka LDH z neželenim razmerjem M^{II}/M^{III} . Toplotna obdelava po soobarjanju lahko poveča kristalno urejenost amorfni materialov.

V prvem objavljenem patentu za sintezo LDH, ki so se uporabljali kot predhodniki katalizatorjev, so uporabili obarjanje pri visoki nasičenosti. $Mg/Al-CO_3$, $Ni/Al-CO_3$, $Co/Mn/Al-CO_3$, $Co/Mn/Mg/Al-CO_3$ in $Ni/Cr/Al-CO_3$ LDH, kot tudi drugi dikovinski in večkovinski LDH so bili sintetizirani z dodajanjem raztopine, ki je vsebovala soli, v raztopino $NaHCO_3$ (26).

1.5.3.3. Druge metode obarjanja

Kristali nastajajo v dveh korakih – najprej nukleacija, nato rast kristala. Med rastjo pa dejansko poteka še več različnih procesov, kot so npr. aglomeracija, lomljenje, Ostwaldovo zorenje. Tako pri obarjanju pri visoki kot tudi pri nizki nasičenosti pa postopek mešanja raztopin soli in baze poteka kar nekaj časa, zato imajo jedra, ki nastanejo na začetku

postopka, veliko več časa za rast, kot tista, ki nastanejo na koncu. Nemogoče se je torej izogniti široki porazdelitvi velikosti nastalih kristalov. S tradicionalnima metodama obarjanja je tako težko nadzorovati velikost delcev in porazdelitev LDH.

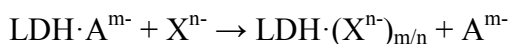
To težavo bi lahko rešila nova metoda, pri kateri bi nukleacija in rast kristala potekali strogo ločeno (27). Pri taki metodi najprej pride do zelo hitrega mešanja in nukleacije v koloidnem mlinu, ki mu sledi ločen proces rasti. LDH, sintetizirani s to metodo, imajo podobne lastnosti kot LDH, sintetizirani s klasičnima metodama obarjanja, ima pa nova metoda več prednosti – nastali materiali so manjši in tudi porazdelitev velikosti je ožja. To naj bi bila posledica ekstremnih sil v koloidnem mlinu, ki preprečujejo agregacijo jeder. Ta metoda je primerna tudi za sintezo večjih količin in se že uporablja za proizvodnjo LDH na Kitajskem.

Sinteza LDH pa je možna tudi preko hidrolize uree; tako dobimo končne produkte z bolj urejeno kristalno strukturo (28). Urea je šibka Brønstedova baza, ki je zelo dobro topna v vodi. Hitrost hidrolize uree pa lahko enostavno nadzorujemo s kontrolo temperature reakcijske mešanice. Na enak način lahko vplivamo tudi na končni pH reakcije, ki je približno 9. Tak pH pa je primeren za obarjanje številnih kovinskih hidroksidov.

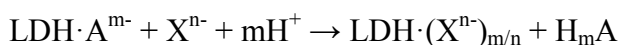
1.5.4. Ionska izmenjava

Soobarjanje je daleč najbolj pogosta metoda za sintezo večplastnih dihidroksidov. Seveda obstajajo primeri, ko se ta metoda ne more uporabiti – npr. ko kovinski kationi ali anioni niso stabilni v bazičnih raztopinah, ali ko je reakcija med kovinskimi ioni in anioni bolj ugodna. V takih primerih se lahko uporabi metoda ionske izmenjave, pri kateri anione v LDH zamenjamo s tistimi, ki jih želimo vstaviti. To je tudi najbolj uporabna metoda za sintezo interkalatov. Reakcija poteka preprosto tako, da v vodni raztopini, ki vsebuje presežek aniona, ki ga želimo vstaviti, raztopimo LDH (29).

Ionska izmenjava običajno poteka po enem izmed dveh principov:



ali



Pri prvem procesu predhodnik vsebuje le enovalentne anione, kot so klorid, nitrat ali perklorat, ki imajo šibke elektrostatske interakcije s plastmi. Pri drugem procesu pa predhodnik vsebuje anione, ki lahko reagirajo s kislino, kot so karbonati ali karboksilati (npr. tereftalat).

Na uspešno ionsko izmenjavo vpliva več faktorjev:

- afiniteta do novega aniona (v splošnem velja, da imajo ioni z večjim nabojem in manjšim ionskim radijem večji potencial za izmenjavo),
- medij, v katerem reakcija poteka (vodni medij naj bi olajšal izmenjavo anorganskih anionov, organsko topilo pa organskih anionov) (29),
- pH vrednost (ne sme biti nižja od 4, saj bi se pod to vrednostjo začele raztapljati bazične LDH plasti),
- sestava plasti,
- temperatura (v glavnem naj bi reakcija potekala hitreje pri višjih temperaturah) (22).

1.6 Hidroksi dvojne soli

Hidroksi dvojne soli (v izvirniku hydroxy double salts, HDS) so po obnašanju in strukturi zelo podobne LDH, vendar so do zdaj bile dosti manj raziskane. LDH vsebujejo mešanico divalentnih in trivalentnih kovinskih ionov, medtem ko pri HDS najdemo mešanico le divalentnih kovinskih ionov. Splošna formula HDS je $[(M^{2+}_{2-x}Me^{2+}_x)(OH)_{4-y}]X^{n-}_{y/h} \cdot zH_2O$, pri tem sta M^{2+} in Me^{2+} divalentna kovinska iona (npr. Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} ali Zn^{2+}), X^{n-} pa je medplastni anion (30). Slednjega se da enostavno zamenjati s pomočjo ionske izmenjave, tako v HDS lahko vstavimo širok spekter anionov.

Primer HDS-a je cinkova bazična sol (ZBS) $[Zn_5(OH)_8](NO_3)_2 \cdot 2H_2O$, ki je sestavljena iz oktaedrov $M(OH)_6$, ki si delijo robove, z eno tretjino praznih oktaedričnih mest in z dodatnimi Zn^{2+} kationi nameščenimi nad in pod plastmi (31).

Metode priprave HDS so v splošnem zelo podobne metodam priprave LDH.

1.7 Interkalacija LDH in HDS

LDH in HDS so izredno uporabni na številnih področjih. Zamenjavo medplastnega aniona pri obeh skupinah spojin dosežemo enostavno, predvsem z metodo ionske izmenjave, z njo pa vplivamo na lastnosti spojin in s tem na funkcionalnost. Spojine, ki jih interkaliramo so na tak način stabilizirane in zaščitene pred toploto in svetlobo, interkalati pa lahko delujejo tudi kot rezervoarji, iz katerih se interkalirana spojina kontrolirano sprošča dalj časa (32).

Predvsem v LDH so uspeli interkalirati veliko različnih kompleksnih anionov. Williams in sodelavci so v celo družino LDH s splošno formulo $[MAl_4(OH)_{12}](NO_3)_2 \cdot yH_2O$ ($M = Zn, Cu, Ni, Co$) interkalirali več različnih dikarboksilatov, mono- in disulfonatov (33). Khan in sodelavci so v več različnih LDH interkalirali več kot 50 različnih spojin (zdravilne učinkovine, agrokemikalije, vitamine, eterična olja, barvila), ki so precej uporabne v industriji (34). Li in sodelavci so na LDH nanodelce adsorbirali DNA in ugotovili, da imajo takšni plazmidni kompleksi velik potencial za uporabo pri protitumorskih cepivih (35). Markland in sodelavci so v tri različne »gostitelje« LDH interkalirali umetna sladila (acesulfam K, ciklamat in saharin), pomožno snov za preprečevanje grenkobe (ferulat) in izboljševalec okusa (teobromin) in opazovali njihovo sproščanje v umetni slini (32). Takšni interkalati bi se lahko uporabljali v prehrabni industriji. Millange in sodelavci so raziskovali selektivno interkalacijo 1,4-benzendikarboksilatnega aniona iz raztopine, v kateri je bil tudi 1,2-benzendikarboksilatni anion (36). To bi lahko predstavljalo enostaven in učinkovit način za ločevanje in čiščenje teh (in morda tudi drugih) izomerov.

Bull in sodelavci so v HDS $Zn-NO_3$ interkalirali ibuprofen, diklofenak in 2,4,5-triklorofenoksiocetno kislino in opazovali njihovo sproščanje - nastale nanostrukture bi se lahko v prihodnosti uporabljale kot dostavni sistemi za zdravila (31). Jin in sodelavci so v HDS $Zn-Cl$ interkalirali $Mn(II)$ komplekse – takšni sistemi bi se lahko uporabljali kot kontrastna sredstva pri magnetni resonanci (37). Kaassis in sodelavci so v tri različne HDS ($Zn-NO_3$, $ZnCo-NO_3$ in $ZnNi-NO_3$) interkalirali diklofenak, naproksen in valprojsko kislino (38). Isti avtor je s kolegi v dva biokompatibilna HDS ($FeZn-Cl$ in $MgZn-Cl$) interkaliral naproksen in raziskal podaljšano sproščanje le-tega iz HDS. Iz interkalata HDS-naproksen so kasneje pripravili tudi tablete, ki so ustrezale vsem zahtevam ameriške farmakopeje in bi tako lahko predstavljale nov način za dostavo farmacevtskih učinkovin (30). Taj in sodelavci so prav tako pripravili tableto iz HDS, ki je vseboval ibuprofen in

ugotovili, da se interkalirana učinkovina sprošča kontrolirano v pogojih podobnih gastrointestinalnemu traktu (39).

2 Namen dela

Večplastne trdnine so se na več področjih izkazale kot uporabne spojine, predvsem zaradi enostavne zamenljivosti medplastnih ionov in s tem vpliva na lastnosti nastalih interkalatov. Tako iz LDH kot iz HDS so sintetizirali že veliko različnih interkalatov, hkrati pa potekajo tudi študije, ki raziskujejo potencial uporabe interkalatov LDH kot adjuvansov, katerih rezultati veliko obetajo. HDS so še precej neraziskane spojine, kar predstavlja priložnost za nova odkritja.

V magistrski nalogi bomo preverili potencial petih različnih HDS in enega LDH, ter njihovih interkalatov s tremi kislinami (jantarno, jabolčno in fumarno), kot adjuvansov. V ta namen bomo najprej osnovne spojine sintetizirali in jih karakterizirali z uporabo več tehnik – infrardeče spektroskopije, rentgenske praškovne difrakcije, vrstične elektronske mikroskopije, termogravimetrije in merjenjem velikosti delcev ter polidisperznega indeksa. Sintetizirali bomo tudi interkalate posameznih HDS in LDH s vsako izmed treh kislin in tudi te karakterizirali z že omenjenimi tehnikami. Postopke interkalacije bomo poskušali optimizirati s spreminjanjem dolžine in temperature reakcije.

Vse spojine bomo preizkusili na dveh celičnih linijah – THP-1 (humani monociti) in RAW264.7 (mišji makrofagi). Po inkubaciji celic z našimi spojinami bomo sprva preverili stopnjo celične citotoksičnosti. Izvedli pa bomo tudi test ELISA, s katerim bomo preko učinka spojin na nastajanje citokinov TNF- α in IL-6 preverjali prisotnost morebitnega imunskega odziva.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1. Sinteza HDS in LDH ter interkalacija

3.1.1.1. Kemikalije

- ZnO (cinkov oksid, čistota $\geq 99\%$, Sigma Aldrich)
- $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cinkov nitrat heksahidrat, čistota $\geq 98\%$, AlfaAesar)
- $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (kobaltov (II) nitrat heksahidrat, čistota $\geq 96\%$, VWR Prolabo)
- $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (nikljev nitrat heksahidrat, čistota $\geq 98,5\%$, Sigma Aldrich)
- ZnCl_2 (cinkov klorid, čistota $\geq 98\%$, AlfaAesar)
- $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cinkov acetat dihidrat, čistota $\geq 99\%$, Sigma Aldrich)
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (kalcijev nitrat tetrahidrat, čistota 99-103%, Sigma Aldrich)
- $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (aluminijev nitrat nonahidrat, čistota $\geq 98\%$, Sigma Aldrich)
- NaOH (natrijev hidroksid, čistota $\geq 98,5\%$, Fisher Scientific UK)
- NaNO_3 (natrijev nitrat, čistota $\geq 99\%$, Sigma Aldrich)
- jantarna kislina (čistota $\geq 99,0\%$, Sigma Aldrich)
- dinatrijeva sol jabolčne kisline (čistota $\geq 95\%$, Sigma)
- fumarna kislina (čistota $\geq 99,0\%$, Acros organics)
- natrijev hidroksid (čistota $\geq 97,0\%$, Fisher Scientific UK)

3.1.1.2. Laboratorijska oprema

- pH elektroda 3in1 (VWR)
- magnetno mešalo s toplotno ploščo (RET basic C, IKA)
- magnetno mešalo (Cimarec i Poly, Fisher Scientific UK)

- prenosna tehtnica Navigator XL (OHAUS)
- analizna tehtnica Pioneer (OHAUS)
- analizna tehtnica CPA225D (sartorius)
- konvekcijska pečica (Carbolite Gero Ltd.)
- avtomatske pipete Discovery Comfort (HTL)
- laboratorijska steklovina: čaše, merilni valji, epruvete, merilne bučke, viale

3.1.2. Delo s celicami

3.1.2.1. Kemikalije

- RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX (Gibco)
- DMEM (1X) + 4.5/L D-glukoza + L-glutamin + piruvat (Gibco)
- Heat Inactivated FBS (goveji fetalni serum, Gibco)
- penicilin/streptomycin (Gibco)
- Trypan Blue barvilo 0,4% (tripan modro, Gibco)
- DPBS (1X) fosfatni pufer, brez CaCl_2 in MgCl_2 (Gibco)
- TrypLE Express (1X) + Phenol Red (stabilni tripsin s fenol rdečim, Gibco)
- Alamar Blue (natrijeva sol resazurina, Sigma)
- Komplet ELISA za določanje človeških/mišjih $\text{TNF-}\alpha/\text{IL-6}$ (Insight Biotechnology Limited)
- DPBS 1x10L (Gibco)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich)
- BSA (goveji serumski albumin, čistota > 98%, Sigma-Aldrich)
- raztopina substrata ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina), Sigma)

- raztopina substrata TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, Sigma)

3.1.2.2. Laboratorijska oprema

- Neubauerjeva izboljšana komora za štetje (Marienfeld)
- 50 mL sterilne centrifugirke (Sarstedt)
- 15 mL sterilne centrifugirke (Corning)
- 250 mL sterilne steklenice za gojenje celic (Greiner)
- sterilno strgalo za celice (TRP)
- mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami z ravnim dnom (Thermo Scientific)
- mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami in U dnom (Greiner)
- avtomatska multikanalna pipeta Discovery Comfort (HTL)
- ELISA mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami z ravnim dnom (Thermo Scientific)

3.1.2.3. Aparature

- Binder C 170 inkubator (37 °C, 5% CO₂)
- centrifuga 5804R (Eppendorf)
- EVOS FL invertni fluorescenčni mikroskop
- centrifuga z ohlajanjem LMC-4200R (Grant-bio)
- rotamikser/vorteks (Hook & Tucker Instruments)
- magnetno mešalo z možnostjo segrevanja SC162 (Stuart)
- Autura avtomatiziran umivalec mikrotitrskih plošč (Mikura)
- mešalnik za mikrotitrne plošče (SciQuip)

3.2 Metode

3.2.1. Sinteza HDS in LDH

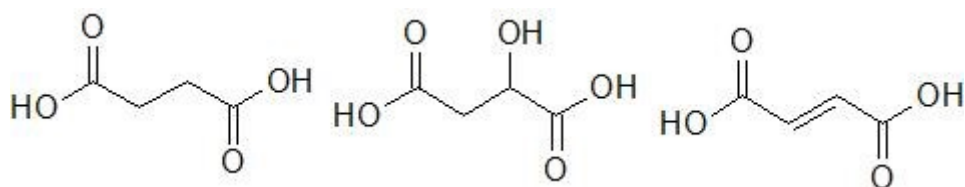
Vse HDS in LDH smo sintetizirali z metodami, opisanimi v literaturi (40). $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ (Zn- NO_3) smo pripravili z mešanjem 4,2 g ZnO in 24,1 g $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ v 60 mL deionizirane vode. Reakcijska mešanica se je mešala 6 dni, nato smo produkt očistili s pomočjo vakuumске filtracije in ga sprali z vodo in z majhnim volumnom acetona. Tako očiščen beli prah smo shranili za kasnejšo uporabo.

$[\text{Zn}_{3,8}\text{Co}_{1,2}(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ (ZnCo- NO_3) smo pripravili z mešanjem 3,0 g ZnO in 8,7 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ v 18 mL deionizirane vode. $[\text{Zn}_3\text{Ni}_2(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ (ZnNi- NO_3) smo pripravili z mešanjem 3,0 g ZnO in 8,7 g $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ v 18 mL deionizirane vode. $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8]\text{Cl}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ (Zn-Cl) smo pripravili z mešanjem 3,0 g ZnO in 7,3 g ZnCl_2 v 18 mL deionizirane vode. $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ (Zn-acetat) smo pripravili z mešanjem 3,0 g ZnO in 8,1 g $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v 18 mL deionizirane vode. Postopek sinteze in čiščenja je bil pri vseh HDS enak. Vse sintetizirane spojine so bile praškaste, ZnCo- NO_3 je bil rdeče barve, ZnNi- NO_3 zeleno-modre, ostali bele barve.

Za sintezo $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ LDH (Ca₂Al- NO_3) smo pripravili dve raztopini (41). Za prvo smo zmešali 17 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in 11,7 g $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ v 80 mL deionizirane vode. Druga raztopina pa je vsebovala 6,3 g NaOH in 9,1 g NaNO_3 v 44 mL deionizirane vode. Nato smo prvo raztopino med mešanjem po kapljah dodajali drugi. Nastalo reakcijo mešanico smo mešali 24 ur na oljni kopeli pri 80 °C. Po 24 urah smo reakcijsko mešanico odstranili iz oljne kopeli in vakuumsko prefiltrirali.

3.2.2. Interkalacija

Za interkalacijo smo uporabili tri različne dikarboksilne kisline s štirimi ogljikovimi atomi – jantarno (butandiojsko, ang. succinic acid), jabolčno (2-hidroksibutandiojsko, ang. malic acid) in fumarno (*trans*-butendiojsko, ang. fumaric acid) kislino. Vse tri v ionski obliki sodelujejo v Krebsovem ciklu, ki je del metabolne poti, preko katere aerobni organizmi pretvarjajo ogljikove hidrate, maščobe in beljakovine v ogljikov dioksid, vodo in ATP.



Slika 3: Jantarna, jabolčna in fumarna kislina (od leve proti desni).

Interkalacijo smo izvedli z metodo ionske izmenjave, po postopkih opisanih v literaturi. 5-kratni molarni presežek posamezne kisline smo raztopili v deionizirani vodi in pH uravnali na pH 8 s pomočjo 1 M raztopine NaOH in pH elektrode. 0,2 mmol posameznega HDS oz. LDH smo nato zmešali z 10 mL te raztopine.

Postopek interkalacije pri jantarni kislini smo poskušali optimizirati z mešanjem pri različnih temperaturah in spreminjanjem časa mešanja. Vse kombinacije teh pogojev so bile naslednje:

- sobna temperatura in 5 dni
- 50 °C in 2 dni
- 50 °C in 3 dni
- 60 °C in 3 dni
- 70 °C in 5 dni
- 90 °C in 4 dni

Nato smo surov produkt očistili s pomočjo vakuumске filtracije in ga sprali z vodo ter manjšim volumnom acetona ter 24 ur sušili v peči pri 30 °C.

3.2.3. Metode karakterizacije

3.2.3.1. Rentgenska difrakcija (XRD)

Rentgenska difrakcija je hitra, nedestruktivna analizna metoda, ki se uporablja za karakterizacijo trdnih kristaliničnih vzorcev. S to metodo dobimo podatek o dimenzijah osnovne celice. Temelji na konstruktivni interakciji med monokromatskimi rentgenskimi žarki in vzorcem kristala.

Meritve rentgenske difrakcije so bile izvedene na School of Pharmacy, University of London. Uporabili smo difraktometer MiniFlex 600 (Rigaku). Območje snemanja je bilo $3^{\circ} - 40^{\circ}$, 2θ . Korak je znašal $0,01^{\circ}$, hitrost pa $3^{\circ}/\text{minuto}$.

3.2.3.2. Infrardeča spektroskopija (IR)

Infrardeča spektroskopija je hitra metoda, ki nam omogoča identifikacijo funkcionalnih skupin v vzorcu in s tem olajša identifikacijo in karakterizacijo vzorca. Temelji na presvetlitvi vzorca z infrardečim spektrom elektromagnetnega valovanja ter merjenjem absorbance pri različnih frekvencah. Iz pridobljenega spektra lahko razberemo, katere funkcionalne skupine so prisotne v vzorcu.

Meritve infrardeče spektroskopije so bile izvedene na School of Pharmacy, University of London. Uporabili smo spektrometer Spectrum 100 FT-IR (PerkinElmer) pri temperaturi 25°C .

3.2.3.3. Termogravimetrična analiza (TGA)

Termogravimetrična analiza temelji na merjenju spremembe mase vzorca pri segrevanju v določenem času. Do sprememb v masi pride zaradi razgradnje, hlapenja komponent in reakcij z atmosfero. Uporabna je predvsem za določanje deleža vode v vzorcu.

Meritve infrardeče spektroskopije so bile izvedene na School of Pharmacy, University of London. Uporabili smo instrument Discovery TGA (TA Instruments). Uporabili smo aluminijeve posodice, hitrost segrevanja je bila $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, maksimalna dosežena temperatura pa 400°C . Meritve so bile izvedene v dušikovi atmosferi.

3.2.3.4. Vrstični elektronski mikroskop (SEM)

Vzorci so bili analizirani s Quanta 200 FEG SEM (FEI) na School of Pharmacy, University of London.

3.2.3.5. Velikost delcev in polidisperzni indeks (PDI)

Velikost delcev in polidisperzni indeks smo določali na principu fotonske korelacijske spektroskopije, z napravo ZetaSizer NanoZS (Malvern) na School of Pharmacy, University of London. Meritve smo izvajali pri temperaturi 25°C , disperzni medij je bil absolutni etanol (viskoznost: $1,074\text{ mPas}$, lomilni količnik: $1,361$).

3.2.4. Gojenje celic

3.2.4.1. Priprava gojišč

Preglednica I: Sestava gojišča za posamezno celično kulturo.

Celična linija	Sestava hranilnega gojišča	Priprava in shranjevanje
THP-1	500 mL RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX 50 mL FBS 5 mL penicilin/streptomicin	Gojišča smo pripravili po načelih tehnike aseptičnega dela v komori z laminarnim pretokom zraka. Shranjevali smo jih v hladilniku v celičnem laboratoriju pri temperaturi 2-8 °C.
RAW264.7	500 mL DMEM (1X) + 4.5 g/L D-glukoza + L-glutamin + piruvat 50 mL FBS 5 mL penicilin/streptomicin	

3.2.4.2. THP-1

THP-1 so humane monocitne celice, ki izvirajo iz človeka z akutno monocitno levkemijo. So suspenzijske celice. Celice THP-1 smo gojili v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in v atmosferi s 5 % vsebnostjo ogljikovega dioksida. Rast celic smo pozorno spremljali in jih subkultivirali vsake 2-3 dni. Pri postopku subkultivacije smo suspenzijo celic najprej zbrali v 50 mL centrifugirki. Le-to smo centrifugirali pri sobni temperaturi in 1200 rpm, 10 minut. Nato smo supernatant zavrgli in celice ponovno suspendirali v gojišču (5 ali 10 mL, odvisno od količine celic) ter jih tako pripravili na štetje. Alikvot celic smo v razmerju 1:1 združili z barvilom Trypan Blue. To smo nato nanegli na komoro za štetje in pod svetlobnim mikroskopom prešteli žive celice v vseh štirih kvadrantih. Število živih celic smo delili s 4, pomnožili s faktorjem redčenja 2, volumnom celične suspenzije (5 ali 10 mL) in konstanto 10^4 . Tako smo dobili celotno število celic v suspenziji. Celice smo nato suspendirali v svežem gojišču (segretem na temperaturo 37 °C) pri gostoti 5×10^5 celic/mL in jih inkubirali.

Celice so pred prvo subkultivacijo bile zamrznjene v tekočem dušiku, zato smo jih morali odmrzniti. Kriovialo s celicami smo prenesli na ogreto kopel (cca. 37 °C) za 2 minuti oz.

dokler se celična suspenzija ni odtalila. Nato smo kriovialo obrisali s 70% etanolom. Celično suspenzijo smo premešali z nežnim pipetiranjem in jo prenesli v 15 mL ali 50 mL centrifugirko. V kriovialo smo dodali 1 mL optimiziranega RPMI in tudi to nato prenesli v centrifugirko – s tem smo pobrali še preostanek celic.

V centrifugirko smo nato počasi in po kapljicah dodajali optimiziran RPMI s sterilno plastično pipeto za enkratno uporabo. Skupaj smo dodali 9-10 mL, centrifugirko smo nežno obrnili na glavo, da bi dosegli lepšo disperzijo. Nato smo centrifugirali pri sobni temperaturi in 1000 rpm, 6-7 minut. Supernatant smo zavrgli in celice suspendirali za štetje s Trypan Blue barvilom, ki je potekalo po postopku opisanem zgoraj. Celice smo nato suspendirali v svežem gojišču (segretem na temperaturo 37 °C) pri gostoti 5×10^5 celic/mL in jih inkubirali.

3.2.4.3. RAW264.7

RAW264.7 je celična linija adhezivnih mišjih makrofagov. Celice RAW264.7 smo prav tako gojili v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in v atmosferi s 5% vsebnostjo ogljikovega dioksida. Rast celic smo pozorno spremljali in jih subkultivirali vsaka 2 dni. Pri postopku subkultivacije smo suspenzijo celic najprej zbrali v 50 mL centrifugirki. RAW264.7 je adhezivna celična linija, zato smo celice v gojilni posodi sprali z 5-10 mL PBS (brez Ca/Mg) in tudi tega zbrali v centrifugirki. V gojilno posodo smo nato dodali encim tripsin, ki pritrjene celice odcepi od dna. Dodali smo ga približno 8 mL oz. dovolj, da je prekril dno posode. Gojišče smo nato dali v inkubator za 10 minut. Nato smo pod invertnim fluorescenčnim mikroskopom preverili, ali so se celice uspešno odlepile od dna. Če se še niso, smo celice še nekoliko dalj pustili v inkubatorju s tripsinom, vendar ne več kot 30 minut.

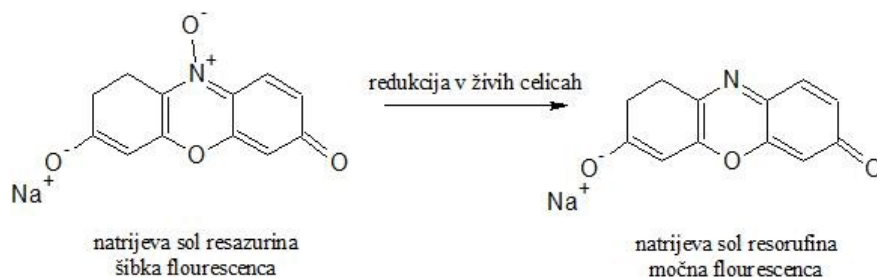
Ko smo dosegli želeno število celic v suspenziji, smo s sterilnim celičnim strgalom postrgali dno. Nato smo tripsin deaktivirali s 16 mL optimiziranega DMEM medija (oz. dvakratnim volumnom tripsina) in suspenzijo zbrali v isti centrifugirki. Centrifugirali smo pri sobni temperaturi in 1200 rpm, 10 minut, odlili supernatant in celice suspendirali v optimiziranem DMEM mediju ter jih tako pripravili na štetje. Le-to je potekalo s pomočjo barvila Trypan Blue, po postopku opisanem pri celicah THP-1.

Celice smo nato suspendirali v svežem gojišču pri gostoti 5×10^5 celic/mL in jih inkubirali.

Tudi te celice so bile pred prvo subkultivacijo zamrznjene v tekočem dušiku. Odtajanje je potekalo po enakem postopku, kot je opisan pri THP-1 celicah.

3.2.5. Test Alamar Blue

Alamar Blue oz. alamar modro je barvilo, ki se uporablja za oceno citotoksičnosti in celične proliferacije. Aktivna sestavina reagenta je resazurin, ki je netoksična, celično permeabilna spojina modre barve, ki praktično ne fluorescira. Ob vstopu v živo celico se resazurin pretvori v resorufin, ki povzroča zelo močno rdečo fluorescenco. Žive celice kontinuirano pretvarjajo resazurin v resorufin in tako omogočajo kvantitativno meritev citotoksičnosti. Količina izmerjene fluorescence ali absorbance je sorazmerna s številom še živih celic in z metabolizmom le-teh. Poškodovane in mrtve celice imajo nižji metabolizem in s tem proizvajajo šibkejši signal kot zdrave celice.



Slika 4: Pretvorba resazurina v resorufin poteče v celicah, ki so metabolno aktivne.

Za pripravo testa Alamar Blue smo uporabili mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami z ravnim dnom. Robne vdolbinice smo pustili prazne, saj iz njih pogosto pride do izhlapevanja. V ostale smo napipetirali po 200 μL celične suspenzije pri koncentraciji 5×10^5 celic/mL. Za pozitivno kontrolo smo imeli samo celice, za negativno pa smo celicam dodali lipopolisaharid (LPS) v koncentraciji 100 ng/mL. V ostale vdolbinice smo dodali 10 μL prej pripravljene raztopine posameznega vzorca v PBS pri masni koncentraciji 10 mg/mL. Pokrito ploščo smo nato pustili 24 ur v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in v atmosferi s 5% vsebnostjo ogljikovega dioksida.

Celice THP-1 smo nato prenesli na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami z ukrivljenim dnom. Celice RAW264.7 smo pustili na plošči z ravnim dnom. Posamezno mikrotitrsko ploščo smo 2 minuti centrifugirali pri 4 °C pri 1500 rpm. Nato smo v dve sterilni plošči z ukrivljenim dnom prenesli v vsako po 75 μL supernatanta. Ti dve plošči smo zamrznili za

kasnejše izvajanje testa ELISA. V našo prvotno ploščo pa smo nato v vsako vdolbinico dodali po 150 μL optimiziranega gojišča (RPMI za THP-1 in DMEM za RAW264.7) in 20 μL barvila Alamar Blue. Tudi v eno od praznih vdolbinic smo dodali 200 μL gojišča in 20 μL barvila – ta nam je služila kot slepa meritev. Ploščo smo inkubirali 2 uri in nato izmerili fluorescenco ($\lambda_{\text{ex}} = 570 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 585 \text{ nm}$).

3.2.6. Encimskoimunski testi (ELISA)

Z uporabo kompleta za določanje citokinov proizvajalca Insight Biotechnology Limited smo po protokolu proizvajalca določili citokina $\text{TNF-}\alpha$ in IL-6. Uporabili smo tako komplet za določanje humanih citokinov kot tudi mišjih, saj smo uporabljali humano in mišjo celično linijo. Po navodilu proizvajalca smo pripravili pufre, ki jih opisuje Preglednica II.

Preglednica II: Sestava pufrov za ELISO.

Pufer/raztopina	Sestava	Priprava in shranjevanje
PBS	9,6 g DPBS prečiščena voda do 1000 mL	Raztopimo v 1 litru destilirane vode.
Pufer za spiranje	9,6 g DPBS 0,5 mL Tween-20 prečiščena voda do 1000 mL	Shranjujemo pri sobni temperaturi.
Blokirni pufer	0,96 g DPBS 1 g BSA prečiščena voda do 100 mL	Raztopimo v 100 mL destilirane vode in prefiltriramo.
Diluent	0,96 g DPBS 0,1 g BSA 0,5 mL Tween-20 prečiščena voda do 100 mL	Shranjujemo v hladilniku pri 4 °C.

Iz standarda, ki smo ga v osnovi pripravili pri masni koncentraciji 1,0 $\mu\text{g/mL}$, smo s kontinuiranim redčenjem v diluentu pripravili koncentracije 2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,25 pg/mL in 15,625 pg/mL.

V mikrotitrski plošče, posebej namenjene izvajanju testa ELISA, smo dodali raztopino primarnega protitelesa ter plošče čez noč inkubirali. Zjutraj smo jih štirikrat sprali s pufrom za spiranje in v vdolbinice dodali blokirni pufer. Inkubirali smo 1 uro pri sobni temperaturi, nato smo štirikrat sprali.

Za ELISO smo uporabili vsebino plošč s 75 μ L zamrznjenega supernatanta. Plošče smo odmrznili in v vsako vdolbinico dodali 30 μ L PBS. Nato smo vsebino vdolbinic prestavili v prej pripravljene ELISA plošče. V proste vdolbinice smo dodali še posamezne raztopine standarda in čisti PBS za slepo meritev.

Ploščo smo 2 uri inkubirali, nato smo jo štirikrat sprali in dodali biotinilirano detekcijsko protitelo. Nato smo znova 2 uri inkubirali, ponovno štirikrat sprali in dodali konjugat avidina s peroksidazo. Sledilo je 30 minut inkubacije z omenjenim encimom in spiranje. Nato smo v vdolbinice dodali substrat ABTS ali TMB in pustili 30 minut, da se je razvilo obarvanje.

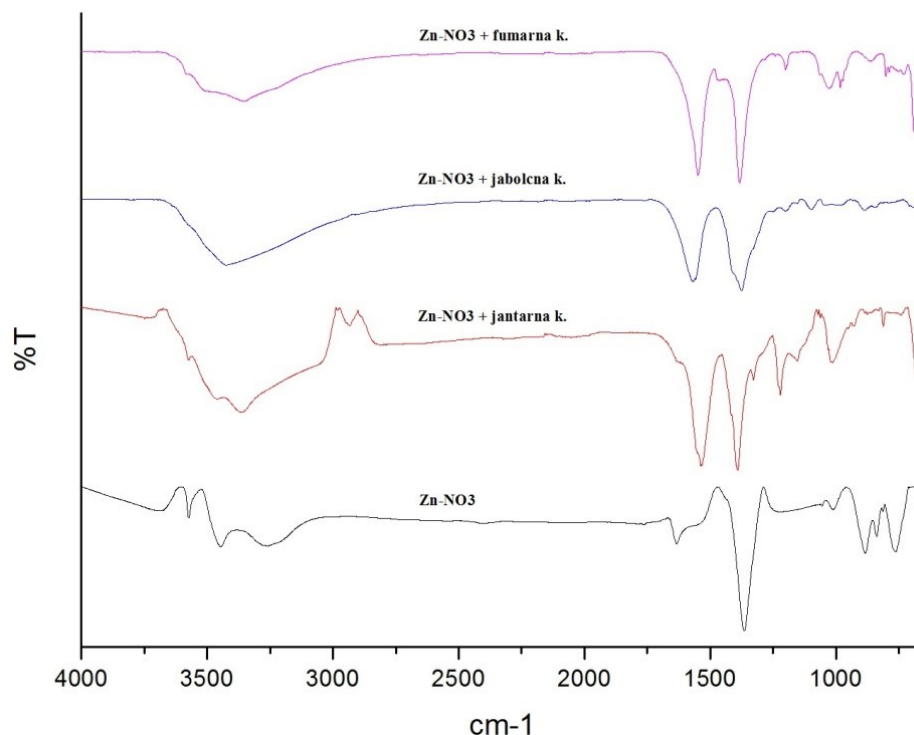
Absorbanco smo izmerili pri 405 nm s popravkom nastavljenim na 650 nm, ko smo uporabili ABTS oz. pri 370 nm, ko smo uporabili TMB.

Iz izmerjenih absorbanc za pripravljene standarde smo izdelali umeritveno premico in tako iz absorbanc izračunali koncentracije posameznega citokina ob dodatku raztopin vzorcev.

4 Rezultati in razprava

4.1 Karakterizacija spojin

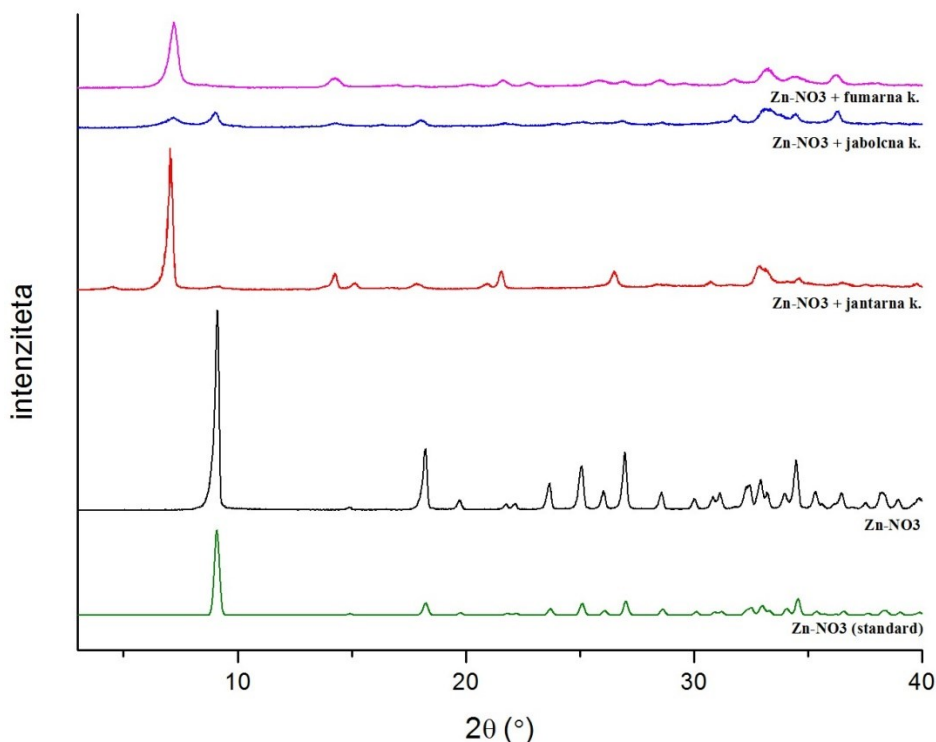
4.1.1. Karakterizacija $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov



Slika 5: FTIR-spektri $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov.

Spodnji graf na Slika 5 prikazuje FTIR-spekter $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$. Najbolj razviden je vrh pri 1360 cm^{-1} , ki nakazuje na asimetrično raztezanje vezi N-O. Prav tako lahko opazimo več vrhov pri 1000 cm^{-1} , ki so značilni za vibracije Zn-O. Med 3600 cm^{-1} in 2900 cm^{-1} najdemo vrhove, ki so posledica OH raztezanja vezi hidroksilnih skupin v plasteh in v molekulah vode – na zgornji meji so proste OH skupine, na spodnji pa OH skupine, ki tvorijo vodikove vezi. Trije vrhovi v tem predelu so povezani s tremi tipi hidroksilnih skupin. Oster vrh pri 3570 cm^{-1} lahko pripišemo raztezanju OH skupin, ki ne tvorijo vodikovih vezi, vrh pri 3400 cm^{-1} lahko pripišemo vibracijam OH skupin, ki tvorijo vodikove vezi z nitratnimi skupinami, širok vrh pri 3250 cm^{-1} pa pripišemo raztezanju OH skupin vodnih molekul. Vrh pri 1630 cm^{-1} pa je značilen za raztezanje H-O-H in upogibanje OH v vodnih molekulah med plastmi (42).

Na spektrih interkalatov, ki so si pričakovano precej podobni, saj so si tudi kisline med seboj zelo podobne, opazimo nekaj sprememb. Še vedno vidimo širši vrh pri 3400 cm^{-1} , ki ga lahko pripišemo raztezanju O-H. Pri 1540 cm^{-1} in 1400 cm^{-1} pa opazimo vrhova, ki ju lahko pripišemo vibracijam karboksilne kisline.



Slika 6: Praškovni difraktogrami $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, standarda in interkalatov.

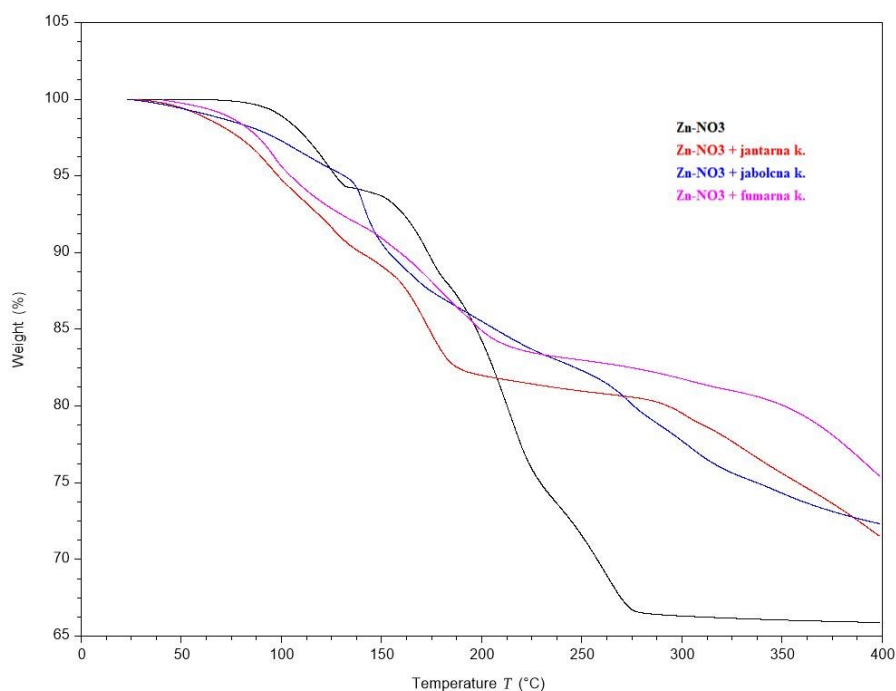
Slika 6 prikazuje praškovne difraktograme našega $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, njegovih interkalatov in spekter $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, ki smo ga pridobili iz baze anorganskih kristalnih struktur (ICSD). Opazimo lahko, da se vrhovi našega Zn-NO₃ lepo ujemajo s standardom.

Po Scherrerjevi enačbi lahko tudi izračunamo velikost delcev za osnovno spojino:

$$L = \frac{K \cdot \lambda}{B \cdot \cos \Theta}$$

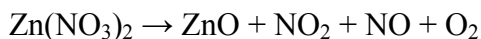
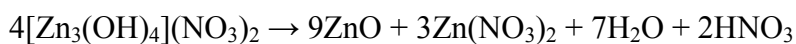
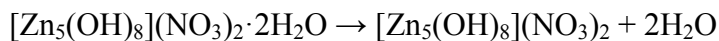
Po izračunu dobimo povprečno velikost delca 41,1 nm in relativno standardno deviacijo 16,0 %.

Spektri interkalatov so si tudi v tem primeru zelo podobni. Opazimo lahko, da je pri vseh pričakovano prišlo do premika nekaterih vrhov v levo.



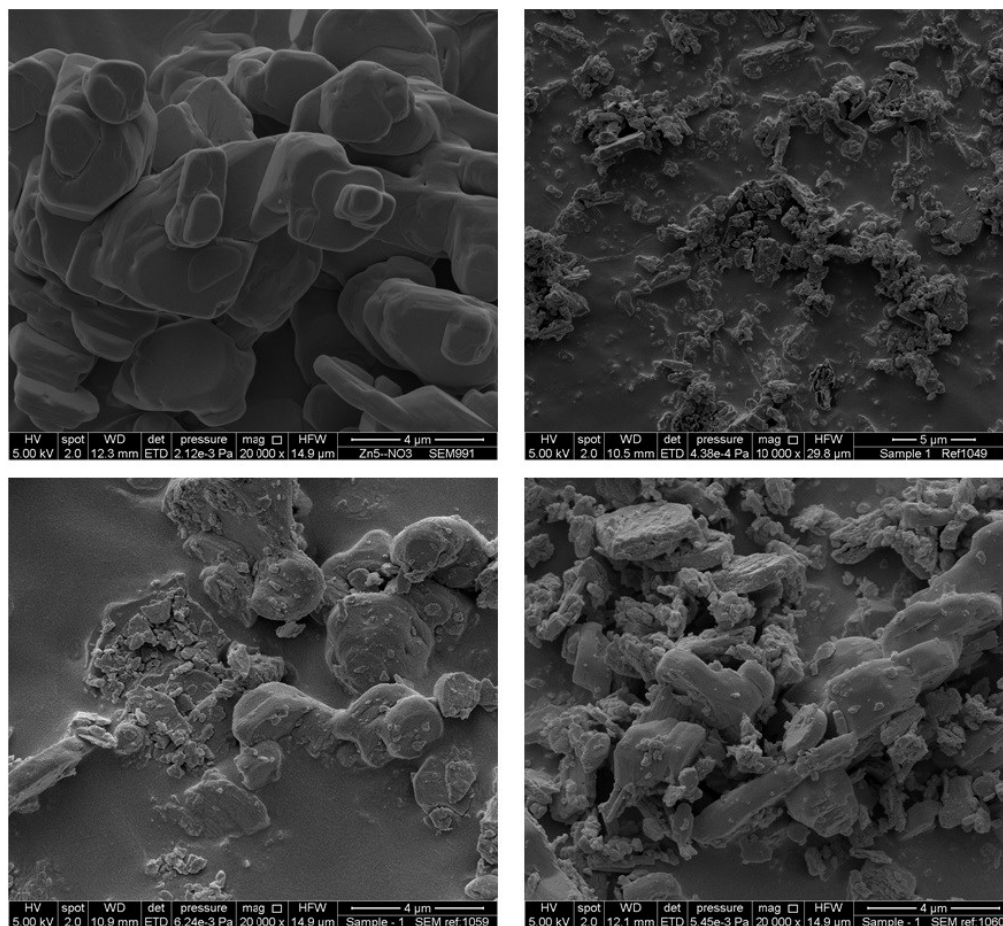
Slika 7: Termogrami $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov.

Slika 7 prikazuje termograme $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov pri segrevanju do 400 °C. Termogram osnovnega Zn-NO_3 se sklada s predlaganim mehanizmom razpada (43):



Tako lahko opazimo štiri korake termičnega razpada. V prvem koraku (100 - 140 °C) je izguba mase 5,6 %, kar sovpada z izgubo dveh molekul vode zaradi dehidracije ($y = 2$). V drugem koraku (140 – 190 °C) sledi 6,2 % izguba mase, kar spet ustreza izgubi dveh molekul vode, v tem primeru zaradi dehidroksilacije. V tretjem koraku (190 – 220 °C) pride do 14,4 % izgube mase, v zadnjem koraku (220 – 270 °C) pa do 7,3 % izgube mase. Vse skupaj vodi do končnega razpadnega produkta, cinkovega oksida.

Termogrami vseh treh interkalatov so si znova precej podobni. Opazimo lahko, da do cca. 200 °C razpad poteka podobno kot pri osnovni spojini.



Slika 8: Slikano s SEM: levo zgoraj Zn-NO₃, desno zgoraj Zn-NO₃ + jantarna k., levo spodaj Zn-NO₃ + jabolčna k., desno spodaj Zn-NO₃ + fumarna k.

Slika 8 pa prikazuje spojino $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot \gamma \text{H}_2\text{O}$ in interkalate, slikane z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Interkalat z jantarno kislino je slikan pri 10.000x povečavi, vse ostale spojine pa pri 20.000x povečavi.

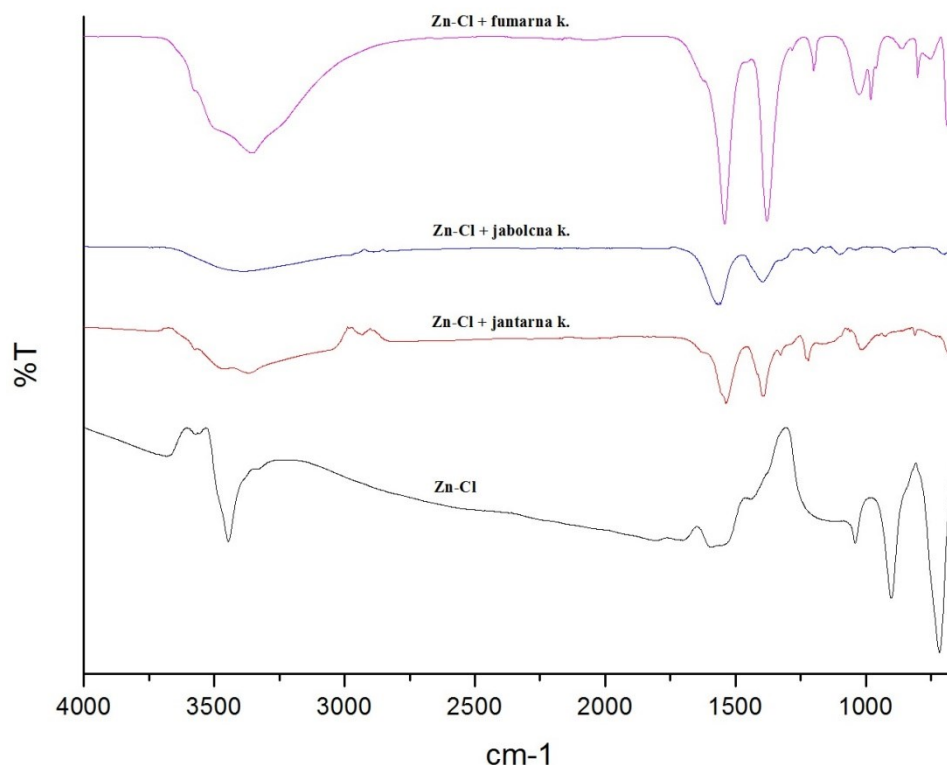
Preglednica III: Velikost delcev, relativna standardna deviacija in polidisperzni indeks $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot \gamma \text{H}_2\text{O}$ in interkalatov izmerjena z ZetaSizer-jem.

	velikost [μm]	relativna st. dev.	PDI
Zn-NO₃	3,33	9,6 %	0,43
Zn-NO₃ + jantarna k.	1,03	10 %	0,27
Zn-NO₃ + jabolčna k.	1,83	26 %	0,37
Zn-NO₃ + fumarna k.	2,34	17 %	0,37

Iz slik osnovne spojine lahko določimo povprečno velikost posameznega delca, ki je znašala 2,76 μm pri relativni standardni deviaciji 31,9 %.

Preglednica III pa prikazuje velikost delcev, relativno standardno deviacijo in polidisperzni indeks $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot \gamma \text{H}_2\text{O}$ in interkalatov izmerjeno z ZetaSizer-jem. Tako pri tem kot tudi pri vseh ostalih HDS ter LDH se je merjenje velikosti z ZetaSizer-jem izkazalo za problematično. Zelo težko je bilo namreč pridobiti zanesljive meritve, saj so delci zelo hitro sedimentirali.

4.1.2. Karakterizacija $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8]\text{Cl}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov

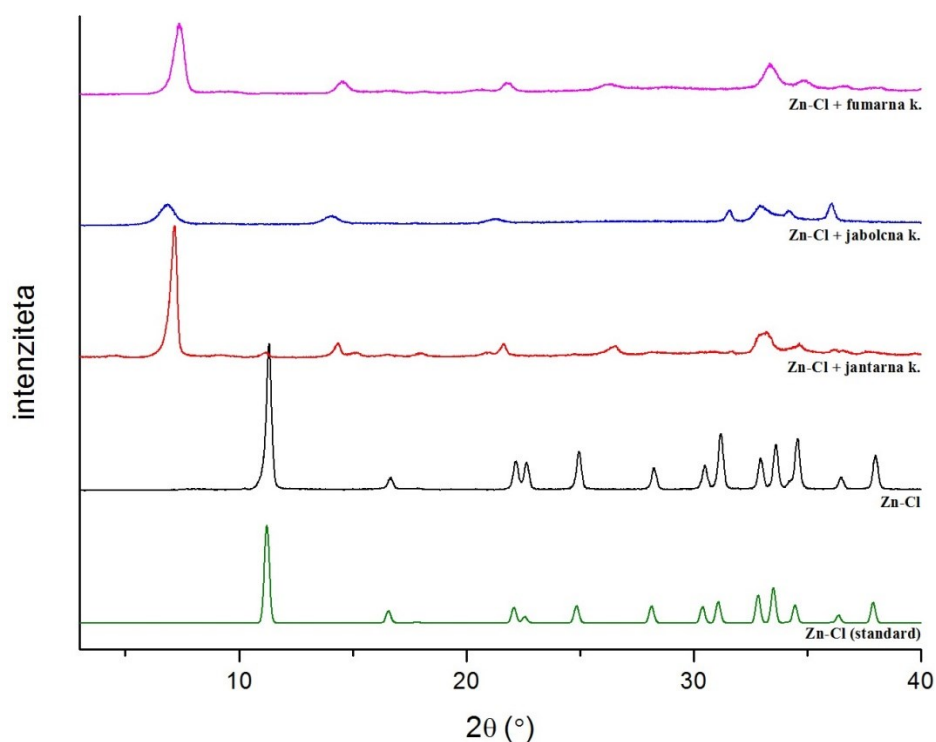


Slika 9: FTIR-spektri $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8]\text{Cl}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov.

Spodnji graf na Slika 9 prikazuje FTIR-spekter $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8]\text{Cl}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$. Če ga primerjamo s spektrom $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, je najbolj očitna razlika odsotnost močnega vrha pri 1360 cm^{-1} , saj v tej spojini ni prisotne vezi N-O, ki je za ta vrh odgovorna. Tudi v tem spektru pa opazimo več vrhov pri 1000 cm^{-1} , ki indicirajo Zn-O vibracije. Prav tako vidimo vrh pri 1540 cm^{-1} , ki je značilen za raztezanje H-O-H in upogibanje OH v vodnih molekulah med plastmi in pa vrh pri 3570 cm^{-1} , ki ga lahko pripišemo raztezanju OH skupin, ki ne tvorijo vodikovih vezi.

Podobno kot pri Zn-NO_3 , na spektrih interkalatov, opazimo nekaj sprememb. Tako tudi tu še vedno vidimo širši vrh pri 3400 cm^{-1} , ki ga lahko pripišemo raztezanju O-H. Pri 1540 cm^{-1} in 1400 cm^{-1} pa opazimo vrhova, ki ju lahko pripišemo vibracijam karboksilne kisline.

Slika 10 prikazuje praškovne difraktograme našega $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8]\text{Cl}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, njegovih interkalatov in spekter $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8]\text{Cl}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, ki smo ga pridobili iz ICSD. Opazimo lahko, da se vrhovi našega Zn-Cl lepo ujemajo s standardom.



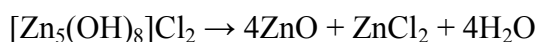
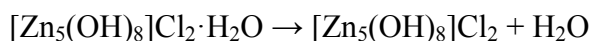
Slika 10: Praškovni difraktogrami $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8]\text{Cl}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, standarda in interkalatov.

Po Scherrerjevi enačbi za izračun delcev v tem primeru dobimo velikost delca 36,7 nm in relativno standardno deviacijo 5,2 %.

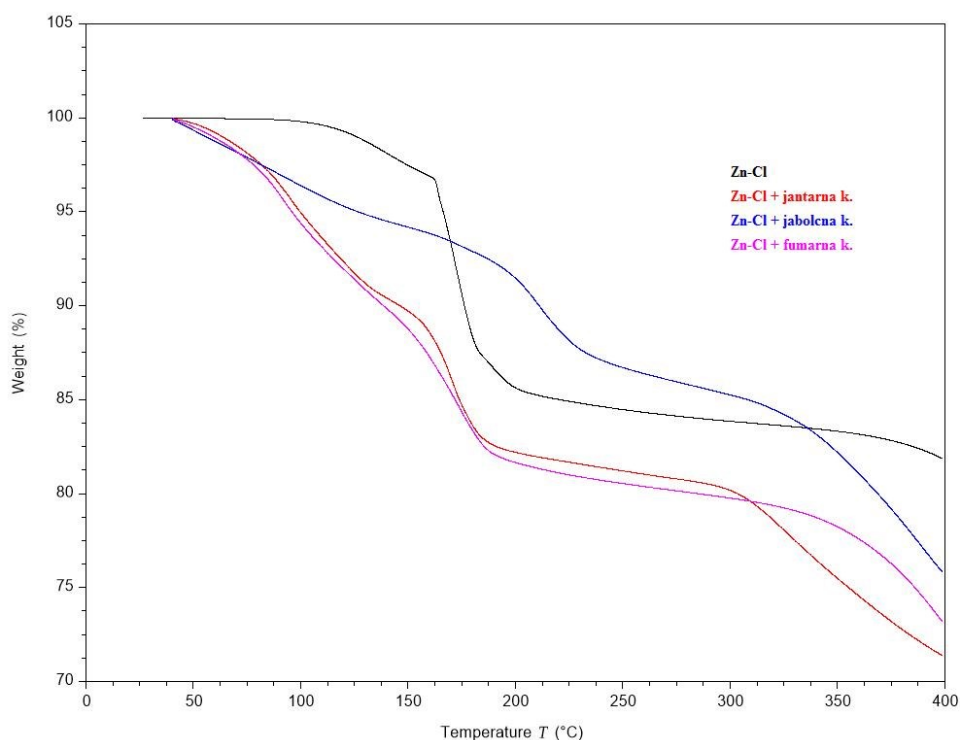
Spektri interkalatov so si znova precej podobni. Pričakovano smo opazili premik nekaterih vrhov v levo.

Slika 11 prikazuje termogram $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8]\text{Cl}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov. Kot vidimo, termični razpad osnovne spojine poteka v dveh korakih. V prvem koraku (100 – 162 °C) je izguba mase 3,3 %, kar se povsem sklada z izračunano izgubo pri dehidraciji ene molekule vode ($y = 1$). V drugem koraku (162 – 300 °C), pa je izguba mase 12,8 %, kar je blizu izračunani vrednosti 13,3 % za izgubo štirih molekul vode.

Mehanizem razpada se torej sklada s predlaganim (44):



Vzorec tudi nad temperaturo 400 °C še izgublja maso zaradi izhlapevanja ZnCl_2 , ki popolnoma izhlapi šele pri višjih temperaturah.



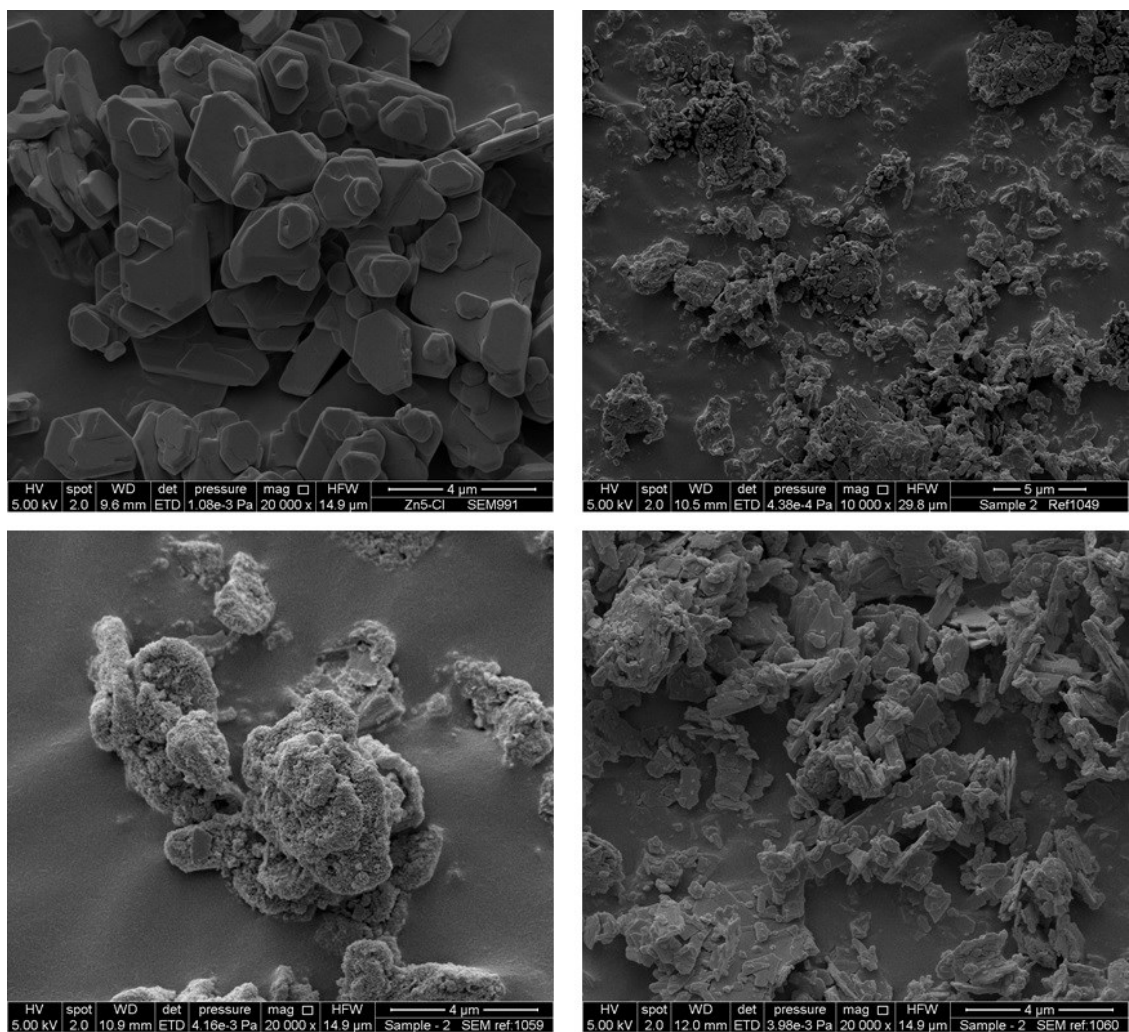
Slika 11: Termogrami $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8]\text{Cl}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov.

Potek termičnega razpada pri interkalatih Zn-Cl z jantarno in fumarno kislino je skoraj povsem enak, medtem ko interkalat z jabolčno kislino razpada nekoliko počasneje.

Slika 12 pa prikazuje spojino $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8]\text{Cl}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalate slikane z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Interkalat z jantarno kislino je slikan pri 10.000x povečavi, vse ostale spojine pa pri 20.000x povečavi.

Iz slik lahko določimo povprečno velikost posameznega delca osnovne spojine, ki je znašala $1,38 \mu\text{m}$ pri relativni standardni deviaciji 36,5 %.

Preglednica IV pa prikazuje velikost delcev, relativno standardno deviacijo in polidisperzni indeks $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8]\text{Cl}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov izmerjeno z ZetaSizer-jem.

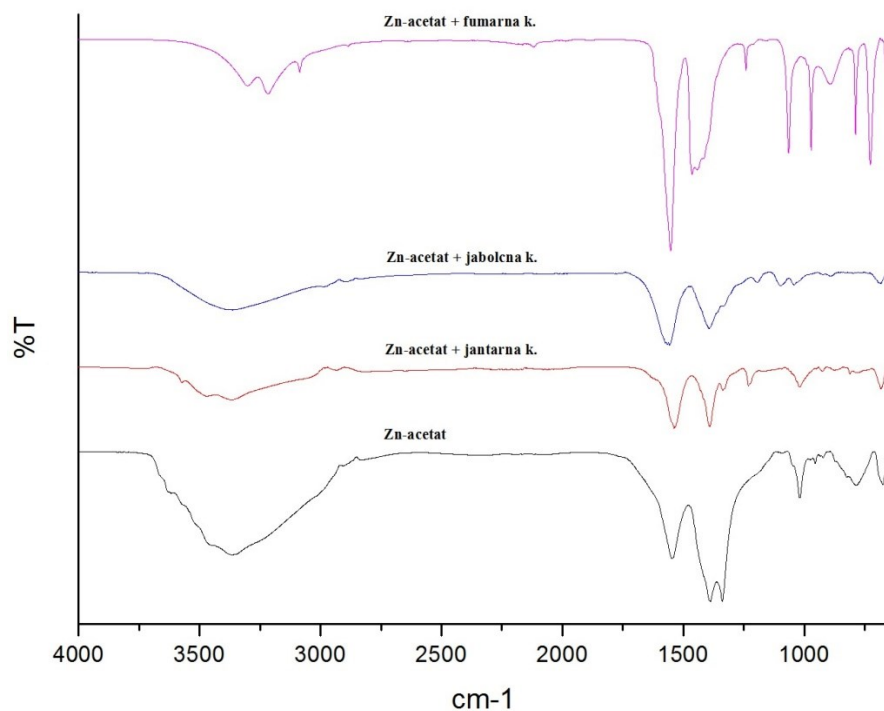


Slika 12: Slikano s SEM: levo zgoraj Zn-Cl, desno zgoraj Zn-Cl + jantarna k., levo spodaj Zn-Cl + jabolčna k., desno spodaj Zn-Cl + fumarna k.

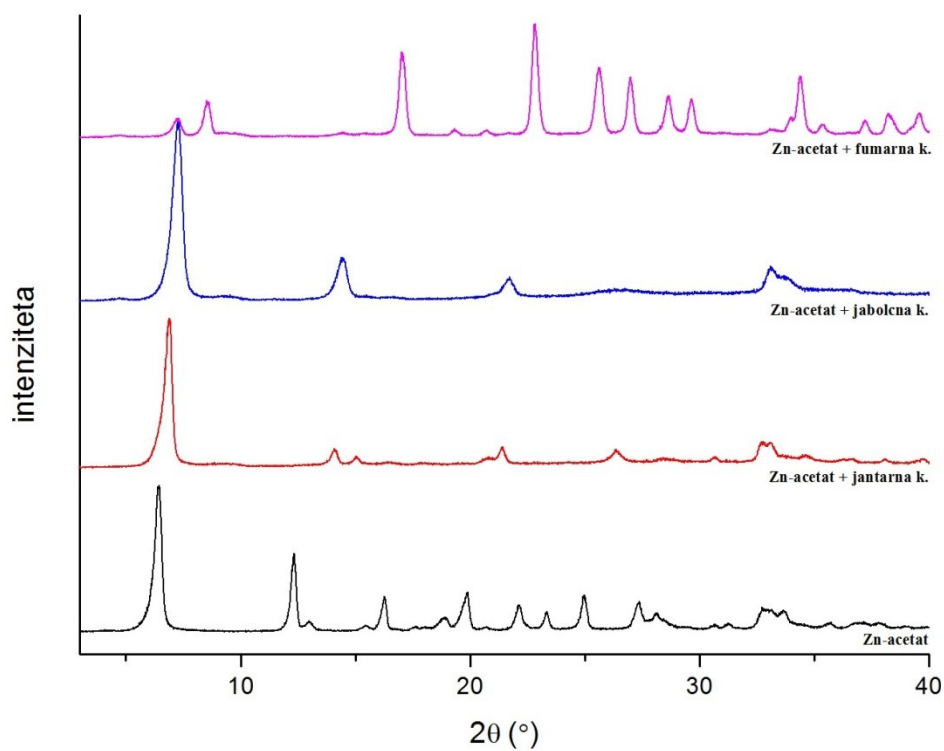
Preglednica IV: Velikost delcev, relativna standardna deviacija in polidisperzni indeks $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8]\text{Cl}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov izmerjena z ZetaSizer-jem.

	velikost [μm]	relativna st. dev.	PDI
Zn-Cl	2,27	6,0 %	0,31
Zn-Cl + jantarna k.	1,20	28 %	0,38
Zn-Cl + jabolčna k.	2,22	42 %	0,73
Zn-Cl + fumarna k.	1,16	21 %	0,29

4.1.3. Karakterizacija $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov



Slika 13: FTIR-spektri $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov.

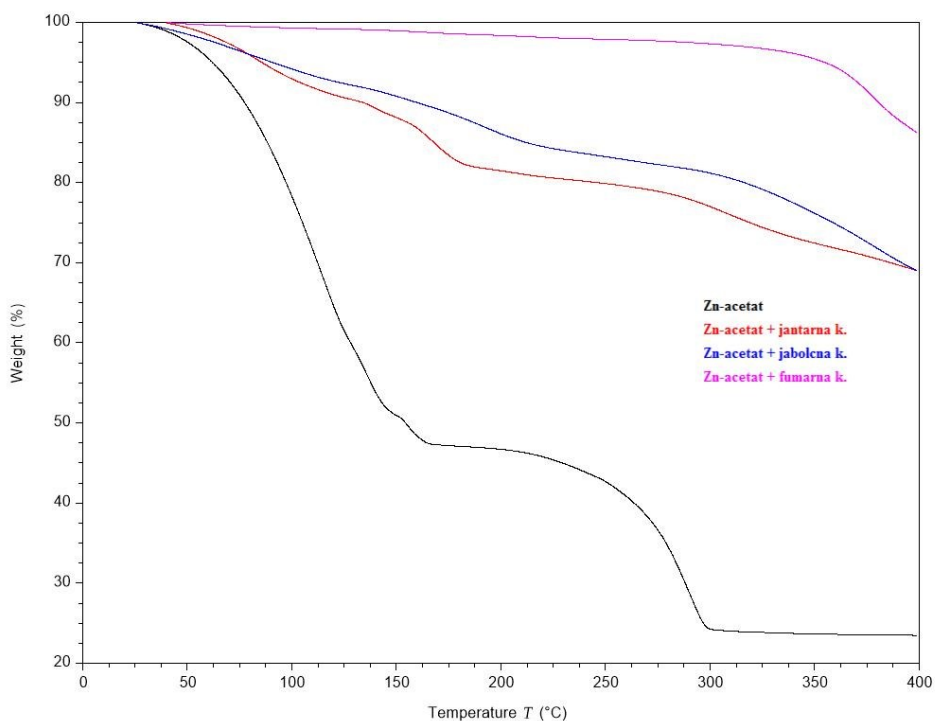


Slika 14: Praškovni difraktogrami $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov.

Slika 13 prikazuje FTIR-spekter $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov. Pri spektru osnovne spojine opazimo med 2900 cm^{-1} in 3600 cm^{-1} širok vrh, ki je posledica raztezanja vezi O-H - tako prostih OH skupin, kot tudi tistih, ki tvorijo vodikove vezi. Pri 2900 cm^{-1} zaznamo zelo šibak signal, ki je posledica simetričnega in asimetričnega raztezanja vezi C-H medplastnega acetatnega aniona. Močan vrh pri 1400 cm^{-1} je lahko posledica asimetričnega in simetričnega raztezanja karboksilatne skupine acetatnega aniona. Vrh pri 1540 cm^{-1} , ki je v prejšnjih spektrih bil značilen za raztezanje H-O-H in upogibanje O-H v vodnih molekulah med plastmi, pa je verjetno prekril močan vrh, ki je posledica asimetričnega raztezanja CO^{2-} . Pri 1000 cm^{-1} pa znova opazimo vibracije vezi Zn-O.

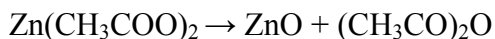
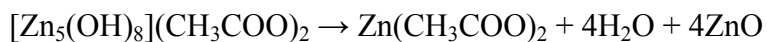
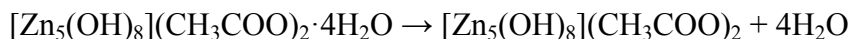
Spektri interkalatov se v tem primeru ne spremenijo kaj dosti. Še vedno opazimo širok vrh med 2900 cm^{-1} in 3600 cm^{-1} , ki ga povzroči raztezanje vezi O-H in pa dva močna vrhova pri 1400 cm^{-1} in 1540 cm^{-1} , ki ju tako pri osnovni spojini, kot tudi pri interkalatih, povzroči simetrično in asimetrično raztezanje karboksilne skupine.

Slika 14 prikazuje praškovni difraktogram $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov. Tudi v tem primeru lahko po Scherrerjevi enačbi izračunamo velikost delcev osnovne spojine. Le-ta znaša $25,4\text{ nm}$ pri relativni standardni deviaciji $46,6\%$.

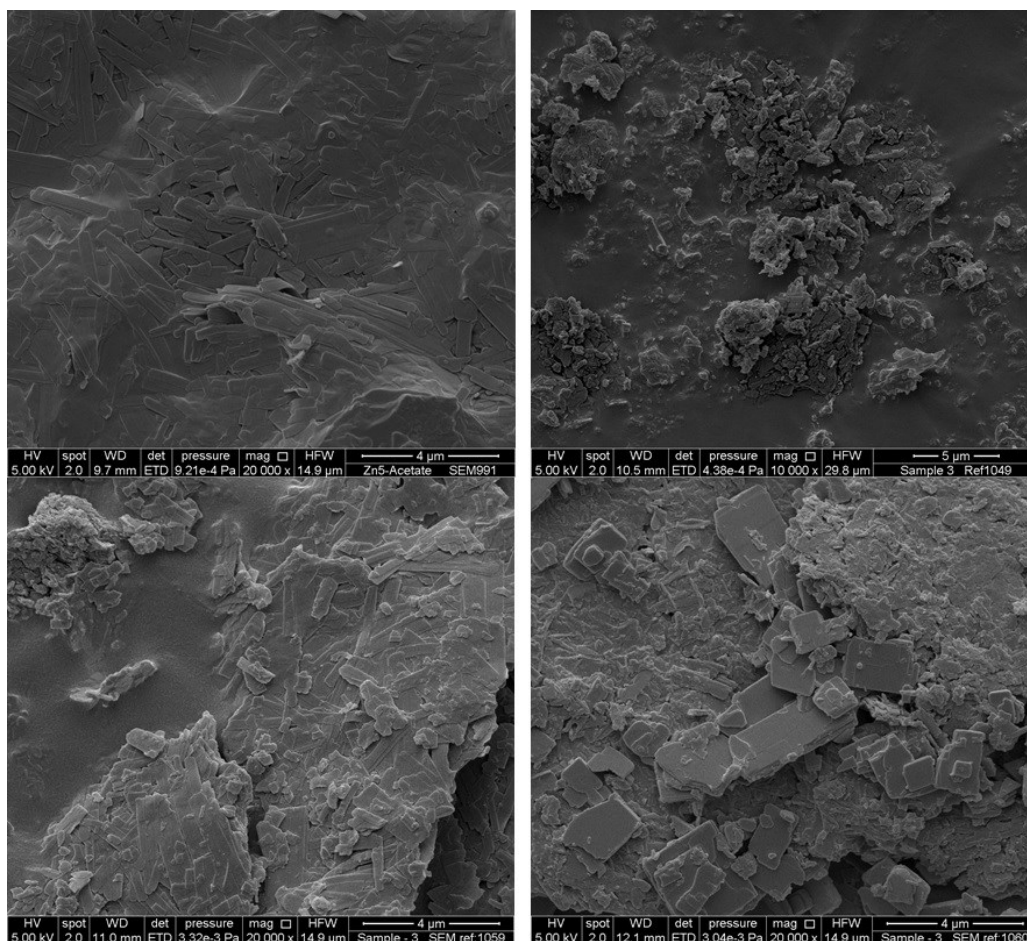


Slika 15: Termogrami $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov.

Slika 15 prikazuje termograme $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov. Predlagan mehanizem termičnega razpada za osnovno spojino ($y = 4$) je sledeč (45):



Pričakovane izgube mase so torej 11,2 % za dehidracijo v prvem koraku, še enkrat 11,2 % za dehidroksilacijo v drugem koraku in 15,8 % za tretji korak. Skupna izguba mase naj bi torej znašala približno 38,2 %. Kot hitro razberemo iz našega termograma, pa je celotna izguba mase ogromna, in sicer znaša kar 75,7 %. Tudi začne se zelo hitro – pri prejšnjih spojinah se je



Slika 16: Slikano s SEM: levo zgoraj Zn-acetat, desno zgoraj Zn-acetat + jantarna k., levo spodaj Zn-acetat + jabolčna k., desno spodaj Zn-acetat + fumarna k.

dehidracija pričela pri 100 °C, medtem ko se pri tej razpad prične že pri 40 °C in je pri 100 °C razpadlo že 22 % vzorca. Tako lahko predvidevamo, da je v našem vzorcu bilo prisotno veliko vlage.

Vzorec smo zato še bolj posušili in šele nato iz njega sintetizirali interkalate. Tudi zato pri termogramih interkalatov pride do dosti manjše izgube mase.

Slika 16 pa prikazuje spojino $[Zn_5(OH)_8](CH_3COO)_2 \cdot yH_2O$ in interkalate, ki so bili slikani z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Interkalat z jantarno kislino je slikan pri 10.000x povečavi, vse ostale spojine pa pri 20.000x povečavi.

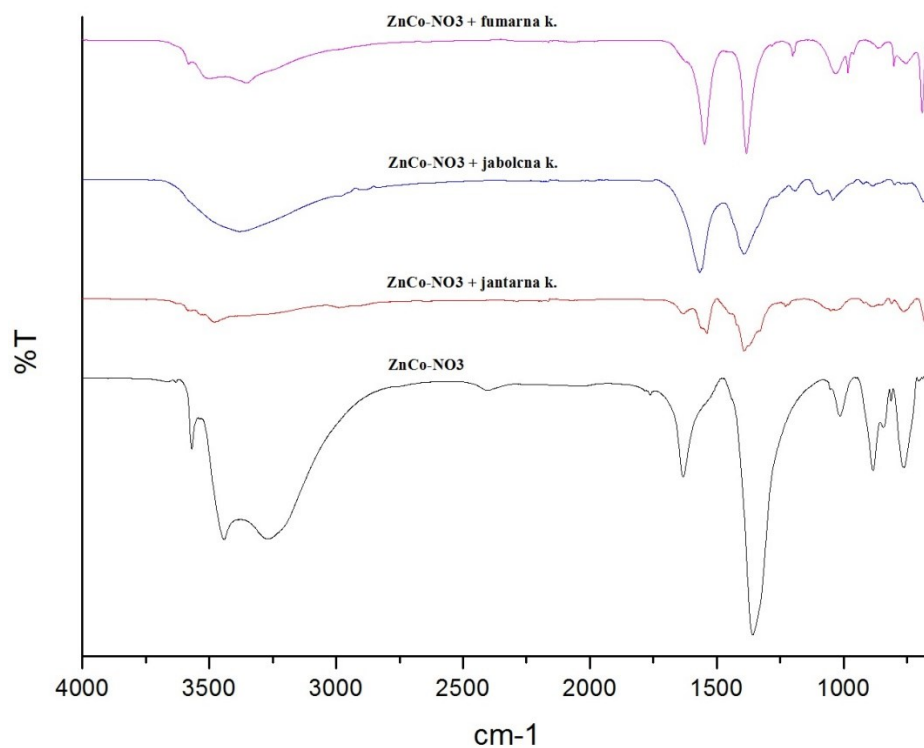
Delci so bili slabo vidni, zato na ta način tej spojini nismo uspeli določiti velikosti delcev.

Preglednica V pa prikazuje velikost delcev, relativno standardno deviacijo in polidisperzni indeks $[Zn_5(OH)_8](CH_3COO)_2 \cdot yH_2O$ in interkalatov izmerjeno z ZetaSizer-jem.

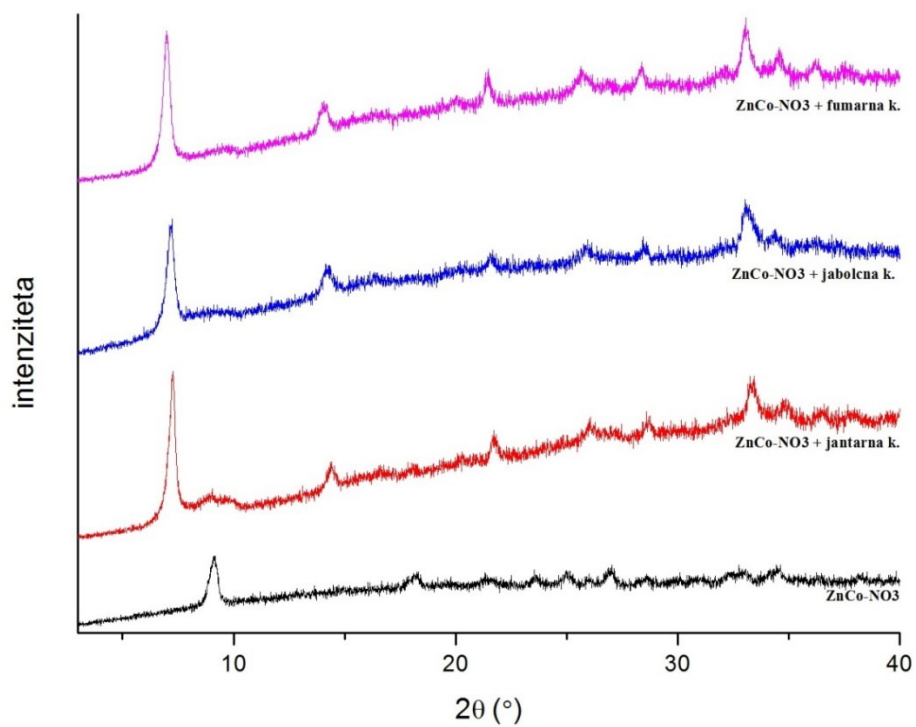
Preglednica V: Velikost delcev, relativna standardna deviacija in polidisperzni indeks $[Zn_5(OH)_8](CH_3COO)_2 \cdot yH_2O$ in interkalatov izmerjena z ZetaSizer-jem.

	velikost [μm]	relativna st. dev.	PDI
Zn-acetat	1,54	11 %	0,46
Zn-acetat + jantarna k.	2,10	3,0 %	0,43
Zn-acetat + jabolčna k.	1,52	35 %	0,35
Zn-acetat + fumarna k.	2,59	81 %	1

4.1.4. Karakterizacija $[\text{Zn}_{3.8}\text{Co}_{1.2}(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov



Slika 17: FTIR-spektri $[\text{Zn}_{3.8}\text{Co}_{1.2}(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov.

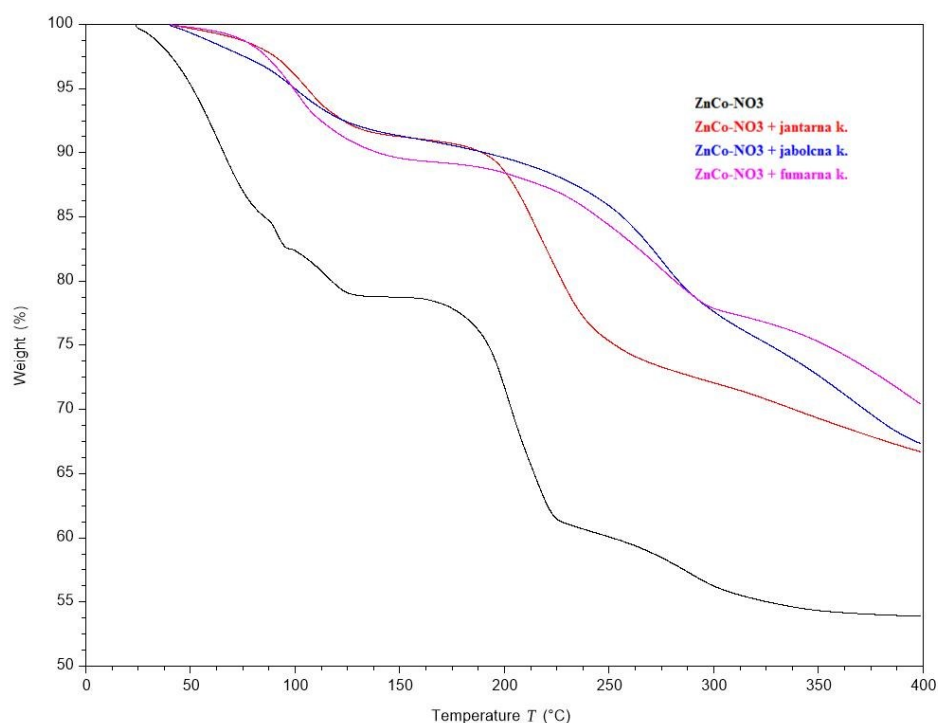


Slika 18: Praškovni difraktogrami $[\text{Zn}_{3.8}\text{Co}_{1.2}(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov.

Spodnji graf na Slika 17 prikazuje FTIR spekter $[\text{Zn}_{3,8}\text{Co}_{1,2}(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, ki je precej podoben spektru $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ (Slika 5). Znova opazimo par vrhov pri 1000 cm^{-1} , ki so posledica vibracij vezi Zn-O. Prav tako je ponovno prisoten močan vrh pri 1360 cm^{-1} , ki je posledica prisotnosti vezi N-O in njihovega raztezanja. Prav tako je znova prisoten vrh pri 1630 cm^{-1} , ki je značilen za raztezanje H-O-H in upogibanje OH v vodnih molekulah med plastmi. Med 3600 cm^{-1} in 2900 cm^{-1} najdemo tri vrhove, ki so tako ali drugače posledica prisotnosti hidroksilnih skupin. Vrh pri 3570 cm^{-1} je posledica raztezanja OH skupin, ki ne tvorijo vodikovih vezi, vrh pri 3440 cm^{-1} je posledica raztezanja Co(O-H), vrh pri 3270 cm^{-1} pa posledica raztezanja OH skupin vodnih molekul.

Spektri interkalatov so si spet precej podobni. Namesto močnega N-O vrha pri 1360 cm^{-1} tu vidimo vrhova pri 1540 cm^{-1} in 1400 cm^{-1} , ki sta posledica vibracij karboksilne skupine posamezne kisline. Prav tako pa je prisoten širok vrh pri 3400 cm^{-1} , zaradi O-H raztezanja.

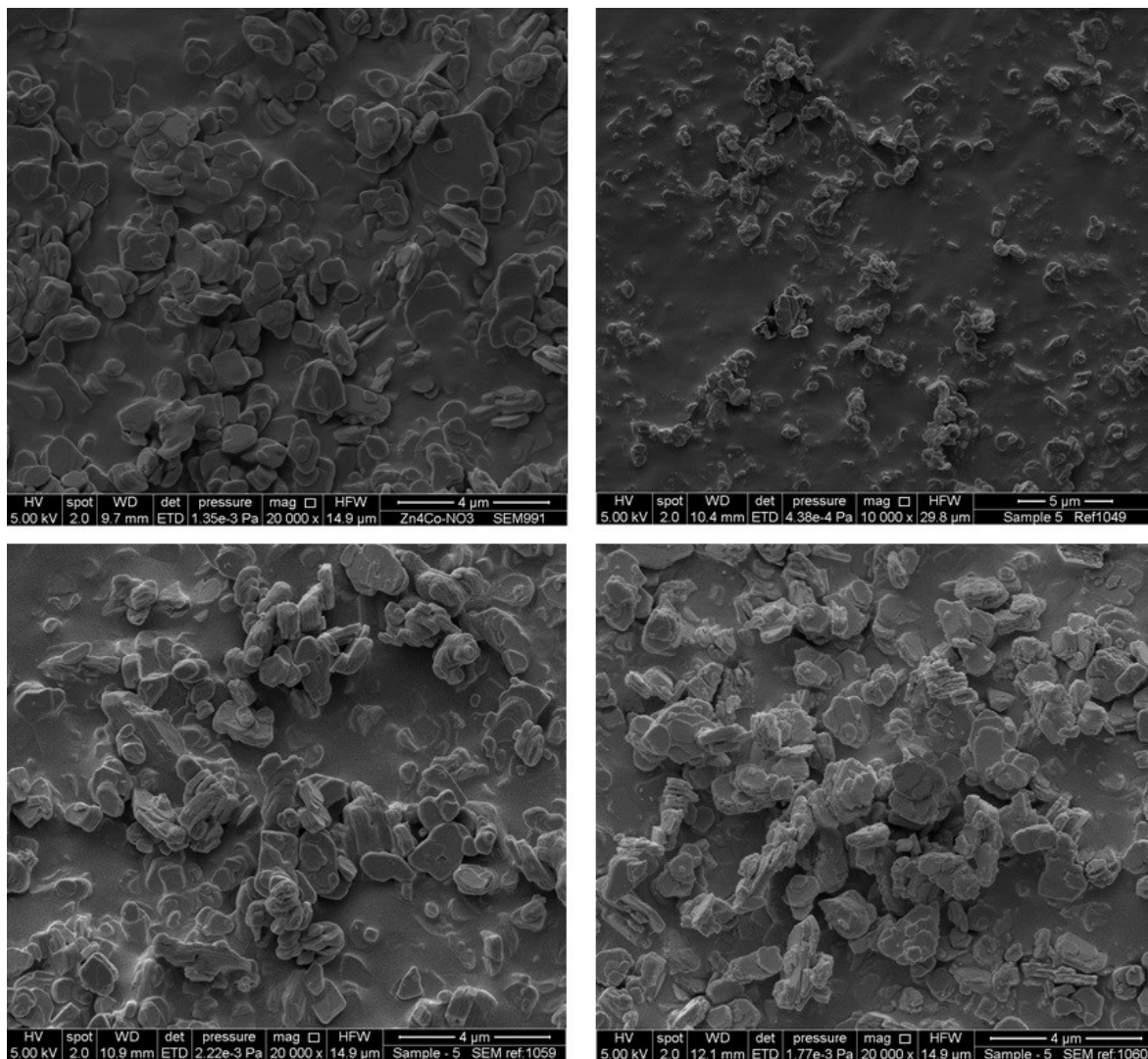
Slika 18 prikazuje praškovne difraktograme $[\text{Zn}_{3,8}\text{Co}_{1,2}(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov. Tudi v tem primeru lahko po Scherrerjevi enačbi izračunamo velikost delcev osnovne spojine. Le-ta znaša $52,7\text{ nm}$ pri relativni standardni deviaciji $141,8\%$. To je seveda ogromna standardna deviacija, ki je verjetno posledica velikega nihanja intenzitete signala.



Slika 19: Termogrami $[\text{Zn}_{3,8}\text{Co}_{1,2}(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov.

Praškovni difraktogrami interkalatov so si precej podobni. Tudi v tem primeru lahko opazimo pričakovan premik nekaterih vrhov v levo. Prav pri vseh opazimo veliko nihanje intenzitete signala.

Slika 19 prikazuje termograme $[\text{Zn}_{3,8}\text{Co}_{1,2}(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov. Pri termogramu osnovne spojine lahko opazimo, da pride do razpada v treh zaznavnih stopnjah. V prvem koraku je izguba mase 21,1 %, v drugem 17,8 %, v tretjem pa 7,2 %. Predvidevamo lahko, da najprej znova pride do dehidracije. Podobno kot pri Zn-acetatu pa se tudi v tem primeru le-ta prične precej hitro. Termogrami interkalatov so si med seboj znova podobni. Opazimo lahko, da je razpad nekoliko počasnejši – spojine so termično stabilnejše.



Slika 20: Slikano s SEM: levo zgoraj ZnCo-NO₃, desno zgoraj ZnCo-NO₃ + jantarna k., levo spodaj ZnCo-NO₃ + jabolčna k., desno spodaj ZnCo-NO₃ + fumarna k.

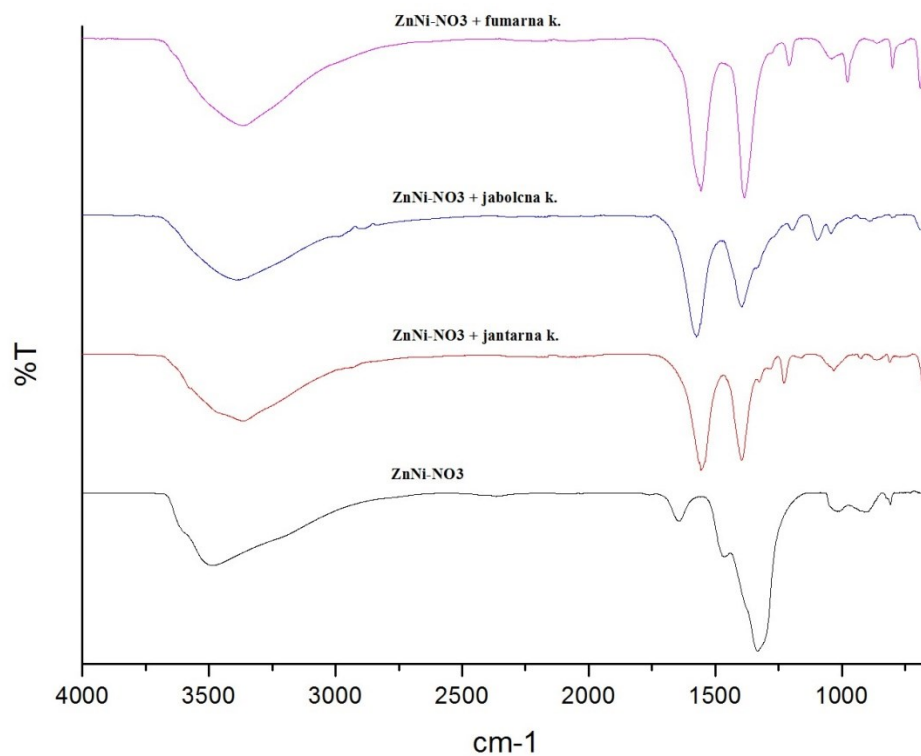
Slika 20 pa prikazuje spojino $[\text{Zn}_{3,8}\text{Co}_{1,2}(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalate, slikane z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Interkalat z jantarno kislino je slikan pri 10.000x povečavi, vse ostale spojine pa pri 20.000x povečavi. Iz slik lahko določimo povprečno velikost posameznega delca osnovne spojine, ki je znašala 0,68 μm pri relativni standardni deviaciji 27,7 %.

Preglednica VI pa prikazuje velikost delcev, relativno standardno deviacijo in polidisperzni indeks $[\text{Zn}_{3,8}\text{Co}_{1,2}(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov izmerjeno z ZetaSizer-jem.

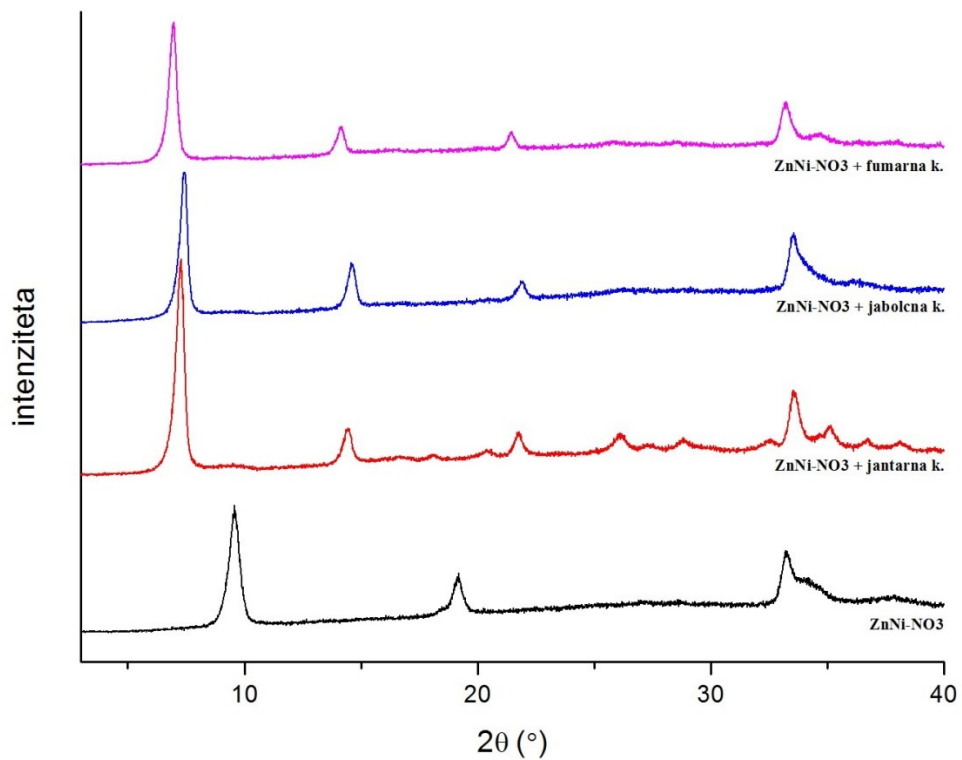
Preglednica VI: Velikost delcev, relativna standardna deviacija in polidisperzni indeks $[\text{Zn}_{3,8}\text{Co}_{1,2}(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov izmerjena z ZetaSizer-jem.

	velikost [μm]	relativna st. dev.	PDI
ZnCo-NO₃	1,59	13 %	0,19
ZnCo-NO₃ + jantarna k.	0,86	26 %	0,51
ZnCo-NO₃ + jabolčna k.	1,10	11 %	0,06
ZnCo-NO₃ + fumarna k.	1,22	7,0 %	0,17

4.1.5. Karakterizacija $[\text{Zn}_3\text{Ni}_2(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov



Slika 21: FTIR-spektri $[\text{Zn}_3\text{Ni}_2(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov.

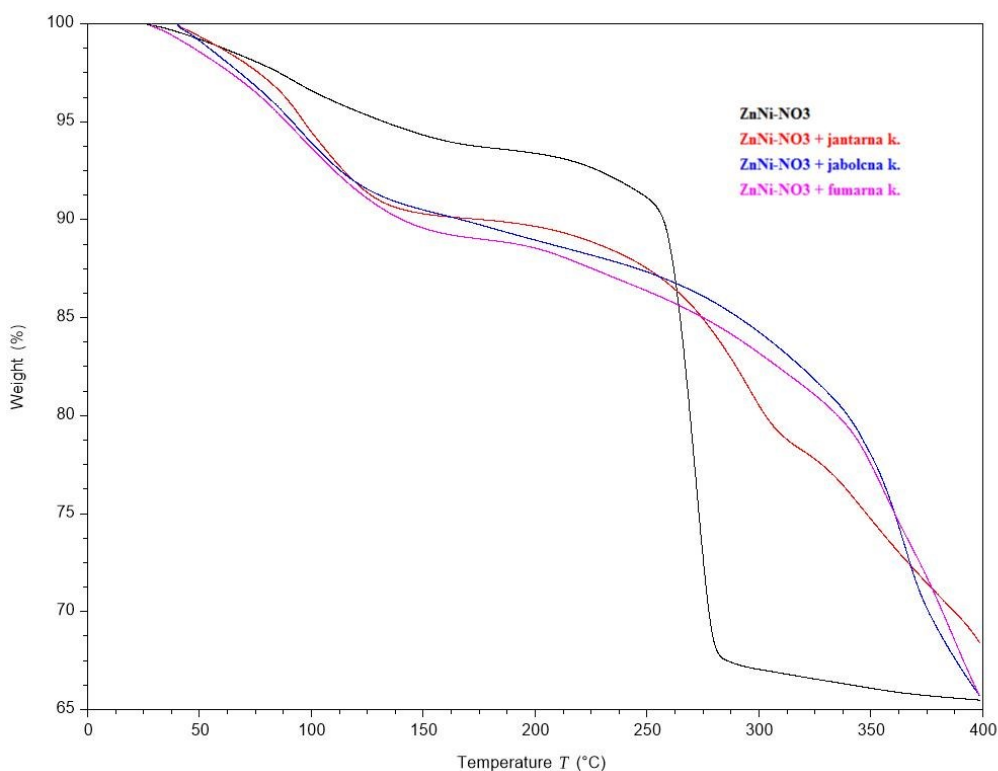


Slika 22: Praškovni difraktogrami $[\text{Zn}_3\text{Ni}_2(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov.

Slika 21 prikazuje FTIR spektre $[\text{Zn}_3\text{Ni}_2(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov. Znova se pri osnovni spojini srečujemo z že poznanimi vrhovi – pri 1000 cm^{-1} vrhovi, ki so posledica vibracij vezi Zn-O, pri 1330 cm^{-1} močan vrh, ki je posledica prisotnosti vezi N-O, pri 1640 cm^{-1} , manjši vrh, ki je značilen za raztezanje H-O-H in upogibanje OH v vodnih molekulah med plastmi, pri 3480 cm^{-1} pa širši vrh, ki je posledica prisotnosti hidroksilnih skupin tako v plasteh, kot tudi v vodnih molekulah.

Podobno kot pri ostalih HDS, na spektrih interkalatov opazimo nekaj sprememb. Tako tudi tu še vedno vidimo širši vrh pri 3400 cm^{-1} , ki ga lahko pripišemo raztezanju vezi O-H. Pri 1540 cm^{-1} in 1400 cm^{-1} pa opazimo vrhova, ki ju lahko pripišemo vibracijam karboksilne kisline.

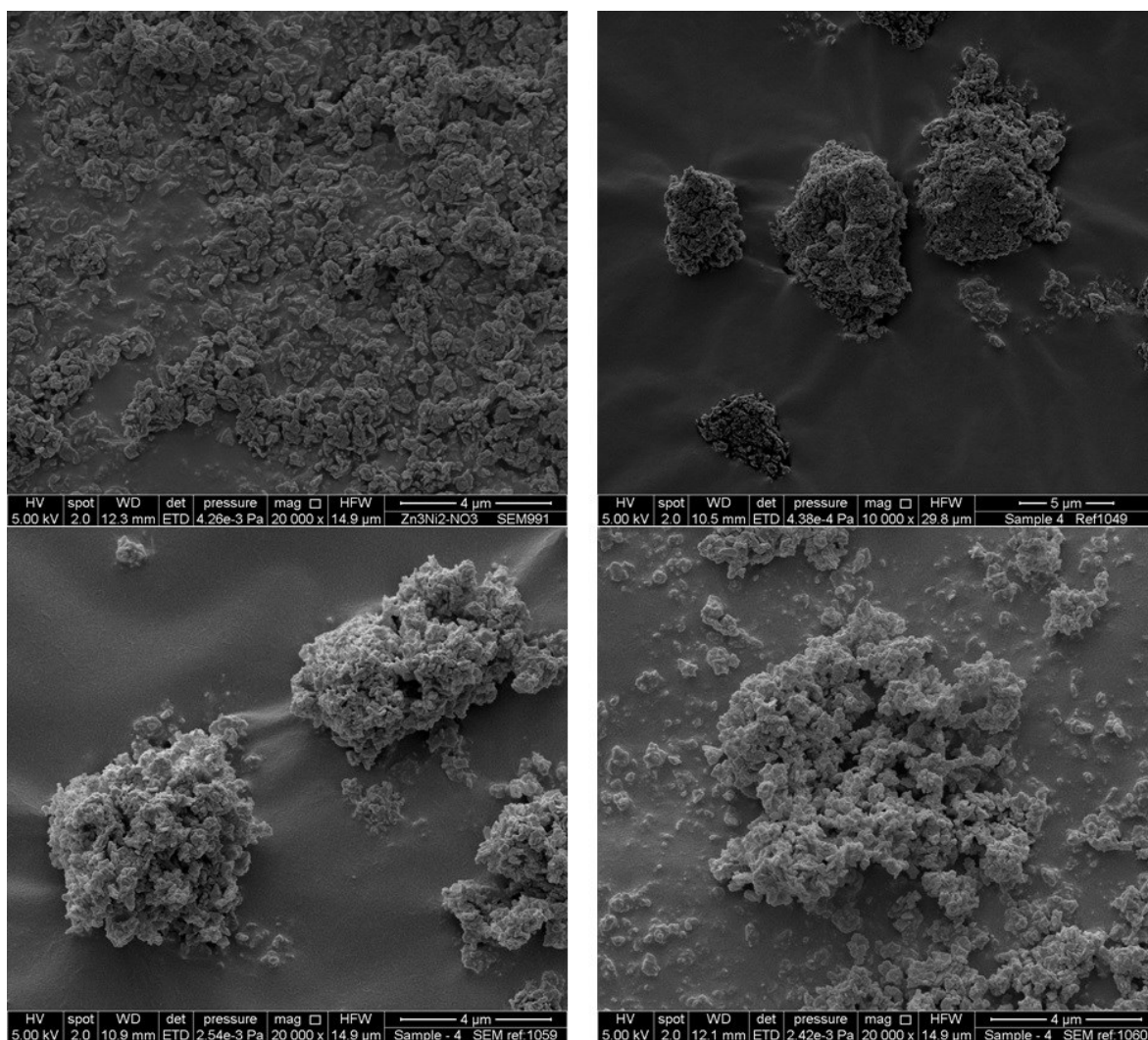
Slika 22 prikazuje praškovne difraktograme $[\text{Zn}_3\text{Ni}_2(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov. Spet pri interkalatih opazimo pričakovan premik nekaterih vrhov v levo. Tudi v tem primeru lahko po Scherrerjevi enačbi izračunamo velikost delcev osnovne spojine. Le-ta znaša $16,3\text{ nm}$ pri relativni standardni deviaciji $16,9\%$.



Slika 23: Termogrami $[\text{Zn}_3\text{Ni}_2(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov.

Slika 23 prikazuje termograme $[\text{Zn}_3\text{Ni}_2(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov. Iz termograma osnovne spojine lahko razberemo, da pride do termičnega razpada v dveh korakih. V prvem je izguba mase 8,8 %, tako da lahko sklepamo, da gre za dehidracijo oz. izgubo treh molekul vode ($y = 3$). V drugem koraku je izguba mase 25,5 %. Predvidevamo lahko, da pride do dehidroksilacije in razpada nitratnega iona, končna produkta sta verjetno cinkov in nikljev oksid. Izračunana sprememba mase za ta korak je 28,8 %.

Termogrami interkalatov so si precej podobni. Opazimo lahko, da pride najprej do nekoliko hitrejšega, nato pa nekoliko počasnejšega razpada.



Slika 24: Slikano s SEM: levo zgoraj ZnNi-NO_3 , desno zgoraj ZnNi-NO_3 + jantarna k., levo spodaj ZnNi-NO_3 + jabolčna k., desno spodaj ZnNi-NO_3 + fumarna k.

Slika 24 pa prikazuje spojino $[\text{Zn}_3\text{Ni}_2(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalate slikane z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Interkalat z jantarno kislino je slikan pri 10.000x povečavi,

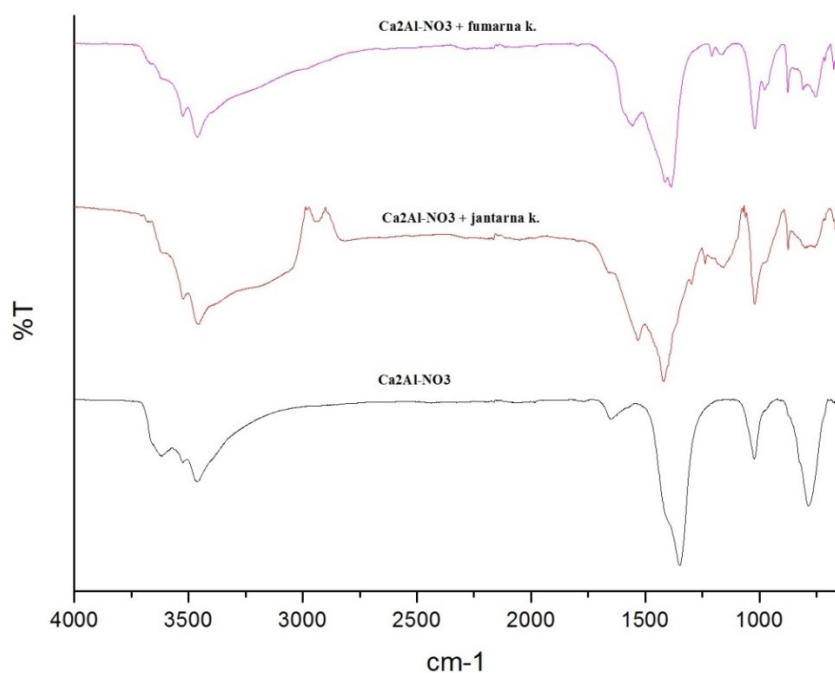
vse ostale spojine pa pri 20.000x povečavi. Iz slik lahko določimo povprečno velikost posameznega delca osnovne spojine, ki je znašala 0,11 μm pri relativni standardni deviaciji 22,8 %.

Preglednica VII pa prikazuje velikost delcev, relativno standardno deviacijo in polidisperzni indeks $[\text{Zn}_3\text{Ni}_2(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov izmerjeno z ZetaSizer-jem.

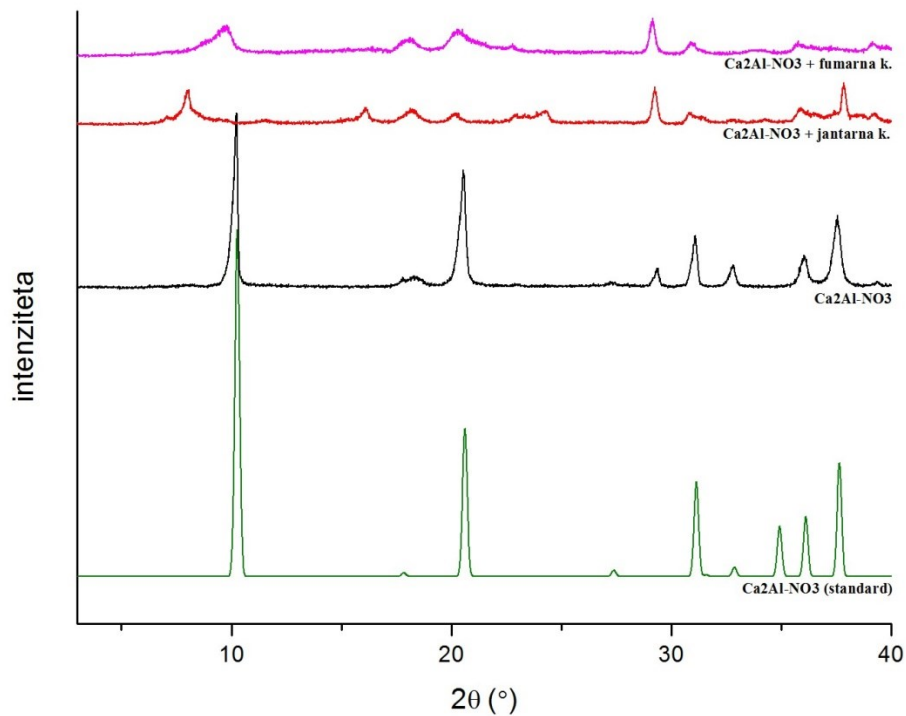
Preglednica VII: Velikost delcev, relativna standardna deviacija in polidisperzni indeks $[\text{Zn}_3\text{Ni}_2(\text{OH})_8](\text{NO}_3)_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov izmerjena z ZetaSizer-jem.

	velikost [μm]	relativna st. dev.	PDI
ZnNi-NO₃	1,83	11 %	0,09
ZnNi-NO₃ + jantarna k.	1,99	46 %	0,97
ZnNi-NO₃ + jabolčna k.	1,63	7,0 %	0,47
ZnNi-NO₃ + fumarna k.	0,82	6,0 %	0,30

4.1.6. Karakterizacija $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov



Slika 25: FTIR-spektri $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov z jantarno in fumarno kislino.

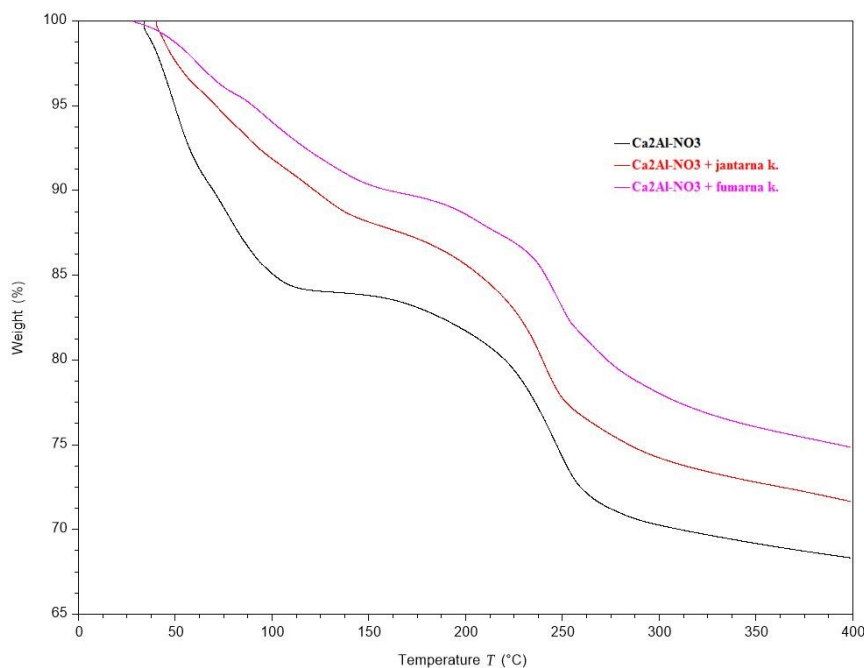


Slika 26: Praškovni difraktogrami $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, standarda in interkalatov z jantarno in fumarno kislino.

Slika 25 prikazuje FTIR-spektre $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, torej našega predstavnika LDH, in interkalatov z jantarno in fumarno kislino. Tudi v tem spektru osnovne spojine je najbolj viden močan signal pri 1360 cm^{-1} , ki je posledica raztezanja vezi N-O. Prav tako pa spet opazimo širši vrh pri 3500 cm^{-1} , ki je posledica raztezanja vezi O-H. Vidimo pa tudi manjši vrh pri 1650 cm^{-1} , ki je posledica upogibanja vezi v molekulah vode med plastmi.

Pri spektrih interkalatov še vedno vidimo širok vrh pri 3400 cm^{-1} , ki ga lahko pripišemo raztezanju vezi O-H. Za razliko od HDS-ov, pa v tem primeru vrha zaradi vibracij karboksilne skupine nista tako izrazito definirana.

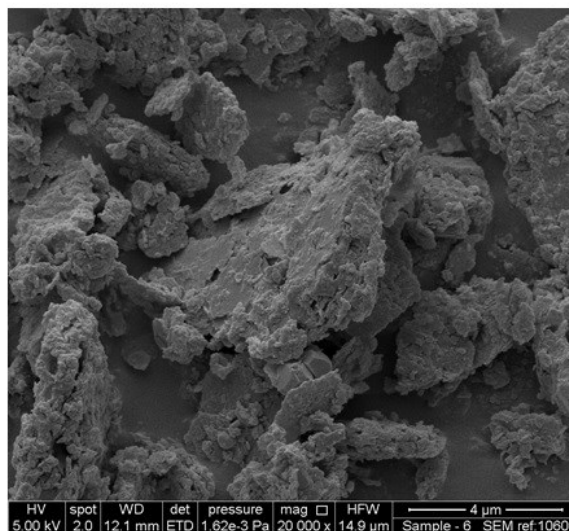
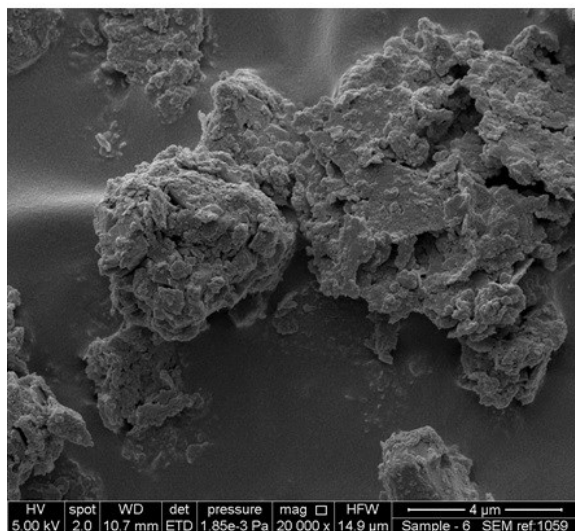
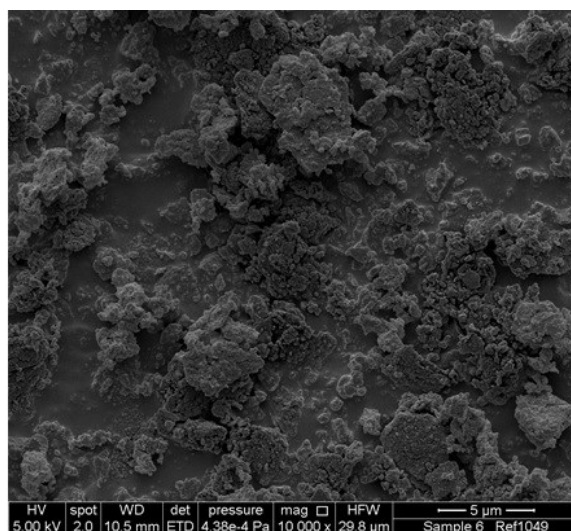
Slika 26 prikazuje praškovne difraktograme našega $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, njegovih interkalatov z jantarno in fumarno kislino in spekter $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, ki smo ga pridobili iz ICSD. Opazimo lahko, da se vrhovi našega $\text{Ca}_2\text{Al-NO}_3$ lepo ujemajo s standardom. Pri interkalatih tudi v tem primeru opazimo pričakovan premik nekaterih vrhov v levo. Povprečna velikost delcev osnovne spojine izračunana po Scherrerjevi enačbi je $118,2\text{ nm}$ pri relativni standardni deviaciji 313% .



Slika 27: Termogrami $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov z jantarno in fumarno kislino.

Slika 27 prikazuje termograme $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov z jantarno in fumarno kislino. Pri osnovni spojini lahko opazimo dva koraka razpada – v prvem koraku ($50 - 120\text{ }^\circ\text{C}$) je izguba mase 16 %, v drugem koraku ($120 - 300\text{ }^\circ\text{C}$) pa 13,8 %. Tudi tukaj najprej verjetno pride do dehidracije molekul vode na površini in med plastmi, nato pa še do dehidroksilacije.

Termograma interkalatov sta si precej podobna, opazimo lahko, da pride do nekoliko počasnejšega razpada, kot pri osnovni spojini.



Slika 28: Slikano s SEM: zgoraj $\text{Ca}_2\text{Al-NO}_3$, levo spodaj $\text{Ca}_2\text{Al-NO}_3$ + jantarna k., desno spodaj $\text{Ca}_2\text{Al-NO}_3$ + fumarna k.

Slika 28 pa prikazuje spojino $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalate slikane z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Interkalat z jantarno kislino je slikan pri 10.000x povečavi, obe ostali spojine pa pri 20.000x povečavi.

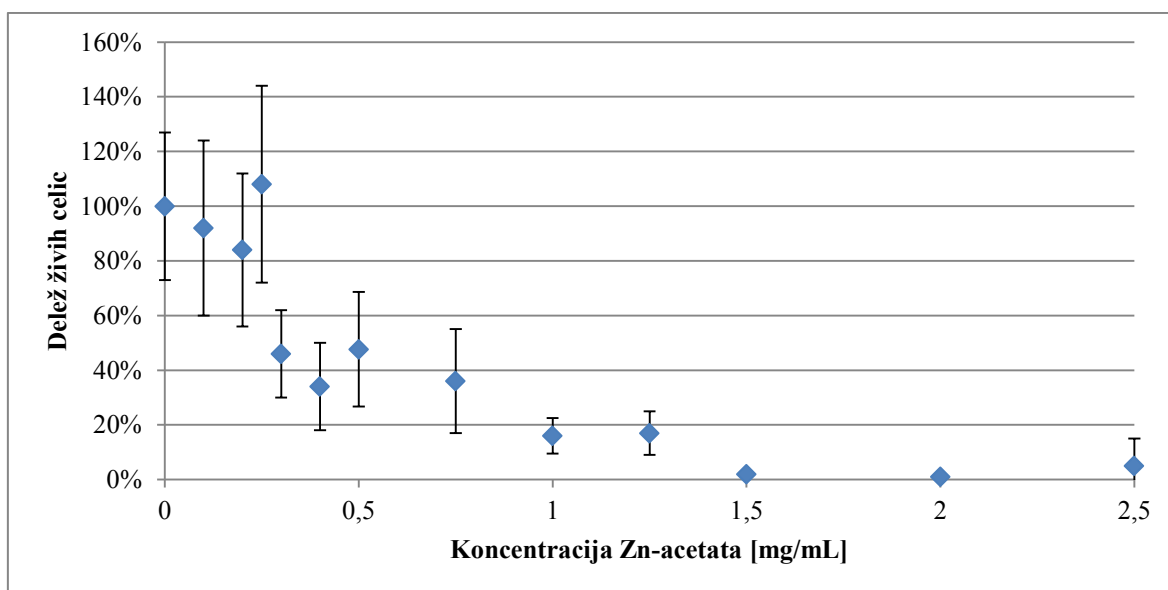
Preglednica VIII pa prikazuje velikost delcev, relativno standardno deviacijo in polidisperzni indeks $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov izmerjeno z ZetaSizer-jem.

Preglednica VIII: Velikost delcev, relativna standardna deviacija in polidisperzni indeks $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ in interkalatov izmerjena z ZetaSizer-jem.

	velikost [μm]	relativna st. dev.	PDI
$\text{Ca}_2\text{Al-NO}_3$	1,24	14 %	0,50
$\text{Ca}_2\text{Al-NO}_3$ + jantarna k.	2,52	13 %	0,68
$\text{Ca}_2\text{Al-NO}_3$ + jabolčna k.	1,37	41 %	0,10
$\text{Ca}_2\text{Al-NO}_3$ + fumarna k.	2,33	29 %	1

4.2 Testiranje na celicah

4.2.1. Vpliv koncentracije vzorca na citotoksičnost



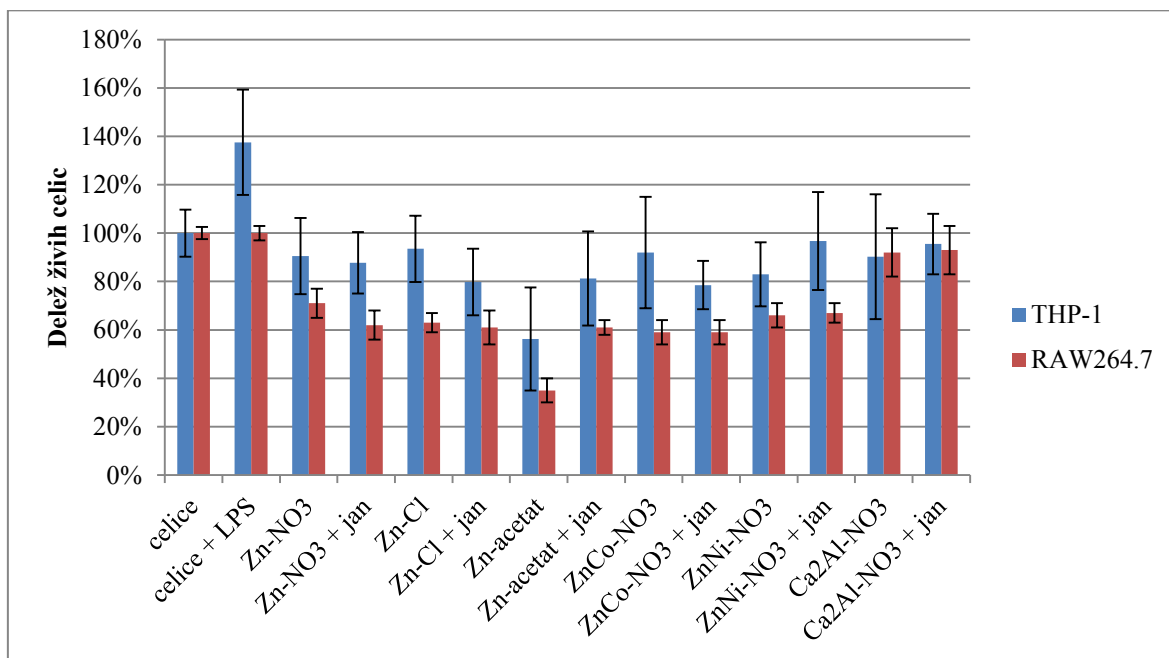
Slika 29: Delež živih celic THP-1 pri različnih koncentracijah Zn-acetata glede na celice brez dodanega vzorca.

Pripravili smo tri raztopine $[\text{Zn}_5(\text{OH})_8](\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ v PBS s tremi različnimi masnimi koncentracijami (10 mg/mL, 5 mg/mL in 2 mg/mL). V vdolbinice mikrotitrne plošče smo k celicam THP-1 nato dodajali različne volumne teh raztopin (od 10 μL do 50 μL). Slika 29 prikazuje graf citotoksičnosti pri končni koncentraciji Zn-acetata na celični kulturi. Rezultati so prikazani v odstotkih, glede na delež preživelih celic pri pozitivni kontroli tj. vzorcu, ki mu nismo dodali nobene raztopine. Iz grafa lepo razberemo, da je pri višji koncentraciji tudi stopnja citotoksičnosti višja. Opazimo lahko, da delež živih celic z večanjem koncentracije Zn-acetata eksponentno pada.

Kljub temu pa smo se v nadaljevanju odločili za uporabo raztopin z masno koncentracijo 10 mg/mL pri volumnu 10 μL in s tem za doseženo končno koncentracijo 0,5 mg/mL na celični kulturi, saj je med vsemi vzorci Zn-acetat izkazoval daleč najvišjo stopnjo citotoksičnosti. Hkrati pa ob morebitni uporabi raztopin z nižjo koncentracijo verjetno ne bi videli sploh nikakršnega imunskega odziva pri ELISA testiranju.

4.2.2. Citotoksičnost

Celice celičnih linij THP-1 in RAW264.7 smo dodajali raztopine posameznih HDS in LDH ter njihovih interkalatov z vsemi tremi kislinami po postopku, opisanem v podpoglavju 3.2.5.

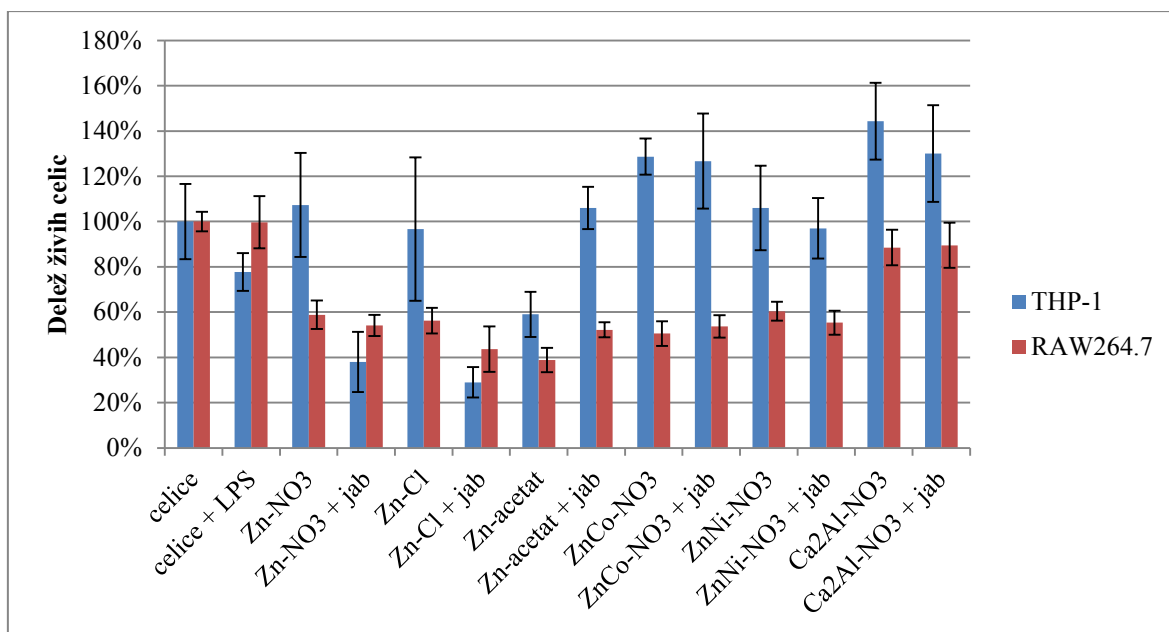


Slika 30: Delež živih celic THP-1 in RAW264.7 glede na celice brez dodanega vzorca, po dodatku raztopine HDS oz. LDH in interkalatov z jantarno kislino.

Slika 30 prikazuje graf citotoksičnosti po dodatku interkalatov z jantarno kislino (podatke smo pridobili z izvajanjem testa Alamar Blue). Rezultati so prikazani v odstotkih, glede na delež preživelih celic pri pozitivni kontroli tj. vzorcu, ki mu nismo dodali nobene raztopine. Kot negativno kontrolo smo uporabili celice, ki smo jim dodali LPS. Pričakovali smo, da bo delež živih celic v tem primeru zanemarljiv, opazimo pa, da je delež živih celic celo večji kot pri pozitivni kontroli. LPS, ki smo ga uporabljali, namreč ni bil učinkovit, zato je do takega rezultata prišlo pri vseh izvedenih meritvah.

Kot vidimo iz grafa, je pri obeh celičnih linijah, delež živih celic ob dodatku raztopine kateregakoli vzorca, manjši kot pri pozitivni kontroli. Toksičnost je pri humani celični liniji THP-1 v splošnem nekoliko manjša kot pri mišjih celicah RAW264.7, vendar je pri THP-1 standardna deviacija veliko večja, zato so rezultati manj zanesljivi. Iz eksperimentov na celicah RAW264.7 smo dobili veliko bolj poenotene rezultate.

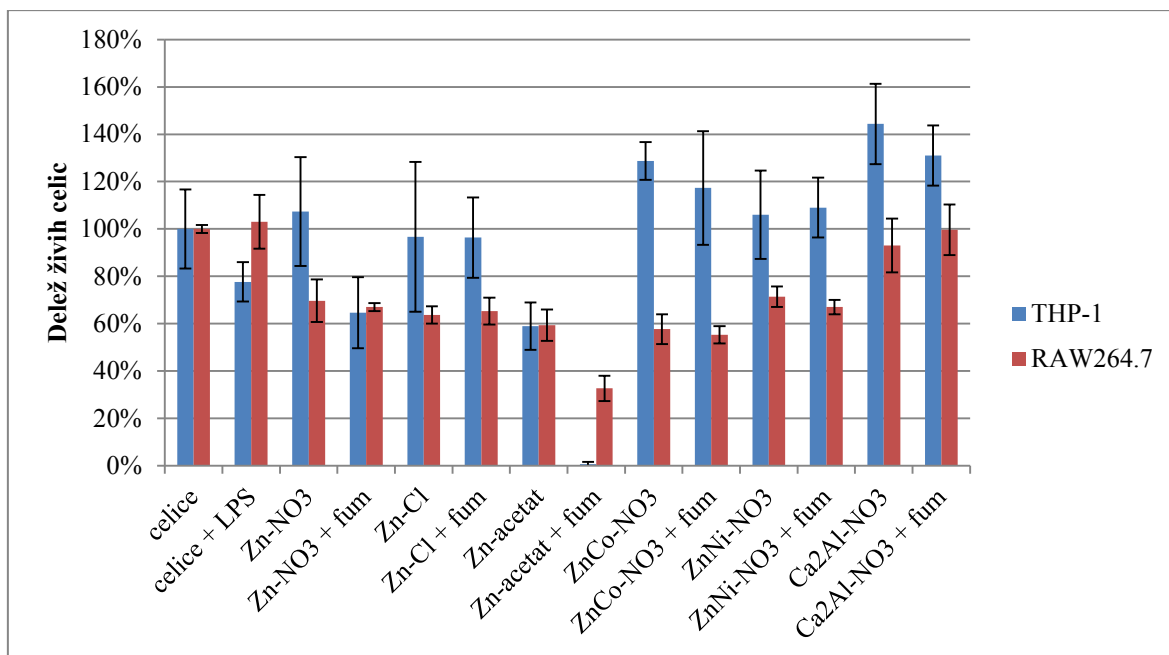
Opazimo lahko tudi, da večjih razlik med izvirnimi spojinami in njihovimi interkalati ni videti. Še največja razlika je med Zn-acetatom in njegovim interkalatom, v tem primeru je sam Zn-acetat dosti bolj toksičen. Zn-acetat je tudi v splošnem med vsemi spojinami najbolj toksičen. Najmanj toksična pa sta v tem primeru LDH $\text{Ca}_2\text{Al-NO}_3$ in tudi njegov interkalat z jantarno kislino – pri obeh celičnih linijah so ob dodatku teh dveh spojin preživele skoraj vse celice.



Slika 31: Delež živih celic THP-1 in RAW264.7 glede na celice brez dodanega vzorca, po dodatku raztopine HDS oz. LDH in interkalatov z jabolčno kislino.

Slika 31 prikazuje graf citotoksičnosti po dodatku interkalatov z jabolčno kislino. Opazimo lahko, da so razlike med celičnima linijama v tem primeru dosti večje, kot pri jabolčni kislini. Spet pa je pri THP-1 prisotna dosti večja standardna deviacija. Posledično so tudi rezultati pri THP-1 precej raznoliki. Toksičnost je pri THP-1 zelo velika pri Zn-acetatu in pri interkalatih Zn-NO₃ in Zn-Cl z jabolčno kislino. Pri vse ostalih spojinah pa je toksičnost zanemarljiva.

Nasprotno pa je pri RAW264.7 celicah toksičnost vseh HDS in njihovih interkalatov velika, v vseh primerih je delež živih celic manjši od 60 % glede na pozitivno kontrolo. Najbolj toksična sta Zn-acetat in Zn-Cl interkaliran z jabolčno kislino. Podobno kot pri interkalatih z jantarno kislino, pa sta tudi v tem primeru najmanj toksična LDH $\text{Ca}_2\text{Al-NO}_3$ in njegov interkalat.



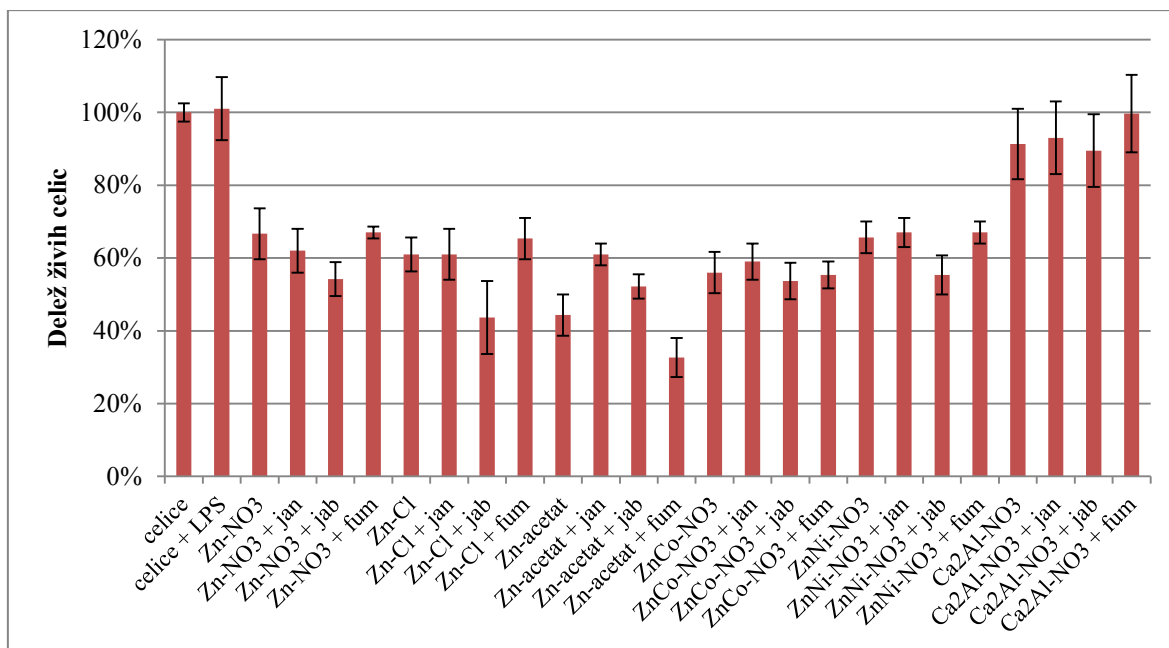
Slika 32: Delež živih celic THP-1 in RAW264.7 glede na celice brez dodanega vzorca, po dodatku raztopine HDS oz. LDH in interkalatov s fumarno kislino.

Slika 32 prikazuje graf citotoksičnosti po dodatku interkalatov s fumarno kislino. Podobno kot pri interkalatih z jabolčno kislino, so tudi v tem primeru razlike med celičnima linijama večje, spet pa je tudi standardna deviacija pri THP-1 celicah večja kot pri RAW264.7 celicah.

Pri THP-1 celicah so se za najbolj toksične izkazali Zn-acetat, kot tudi interkalata Zn-NO₃ in Zn-acetata s fumarno kislino. Pri vseh ostalih je toksičnost zanemarljiva.

Pri RAW264.7 celicah pa je znova toksičnost vseh HDS in njihovih interkalatov precejšnja, daleč najbolj toksičen pa je tudi pri tej celični liniji interkalat Zn-acetata. Najmanj toksična sta spet LDH Ca₂Al-NO₃ in njegov interkalat.

Po vseh izvedenih poskusih lahko ugotovimo, da so THP-1 celice dale dokaj nezanesljive in visoko variabilne rezultate. Bolj zanesljivo delujejo rezultati pridobljeni na celični liniji RAW264.7. Primerjavo toksičnosti vseh HDS in LDH ter njihovih interkalatov z vsemi tremi kislinami pri celični liniji RAW264.7 pa prikazuje Slika 33.

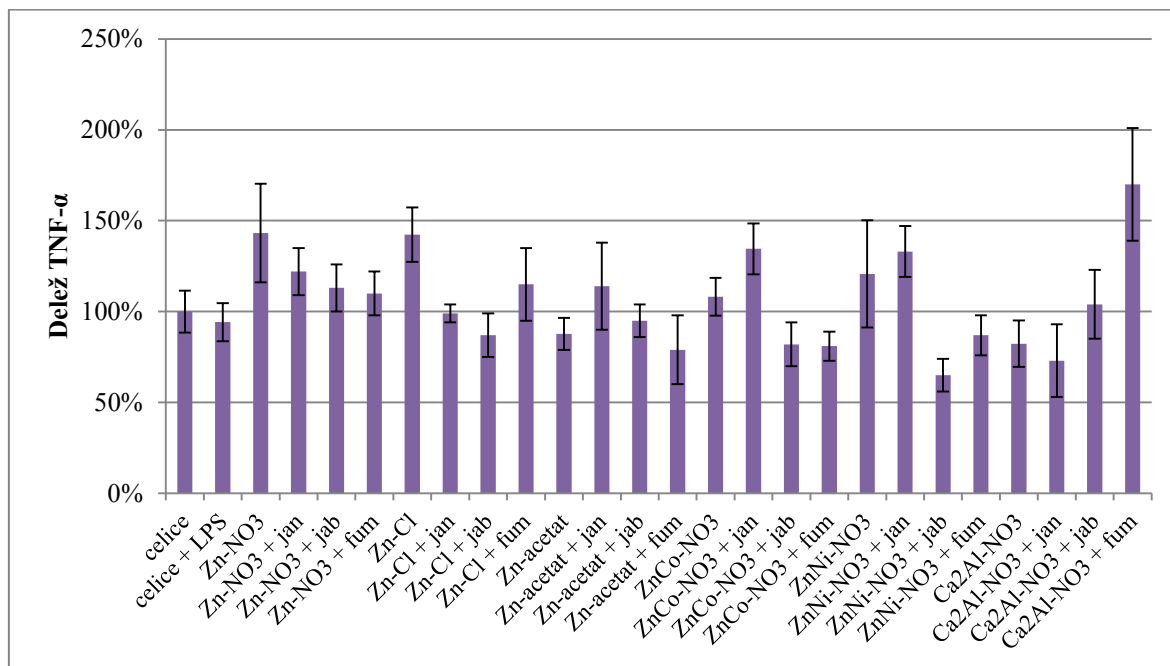


Slika 33: Delež živih celic RAW264.7 glede na celice brez dodanega vzorca, po dodatku raztopine HDS oz. LDH in interkalatov z jantarno, jabolčno ter fumarno kislino.

V splošnem lahko torej ugotovimo, da so prav vsi HDS kot tudi njihovi interkalati visoko toksični. Najbolj toksični so Zn-acetat in njegov interkalat s fumarno kislino, ter interkalat Zn-Cl z jabolčno kislino. V nasprotju s HDS pa so LDH in njegovi interkalati dokaj šibko toksični. Predvsem interkalat s fumarno kislino skoraj ni toksičen. Ugotovimo lahko tudi, da interkalacija ne zmanjša toksičnosti spojin, v nekaterih primerih jo celo poveča.

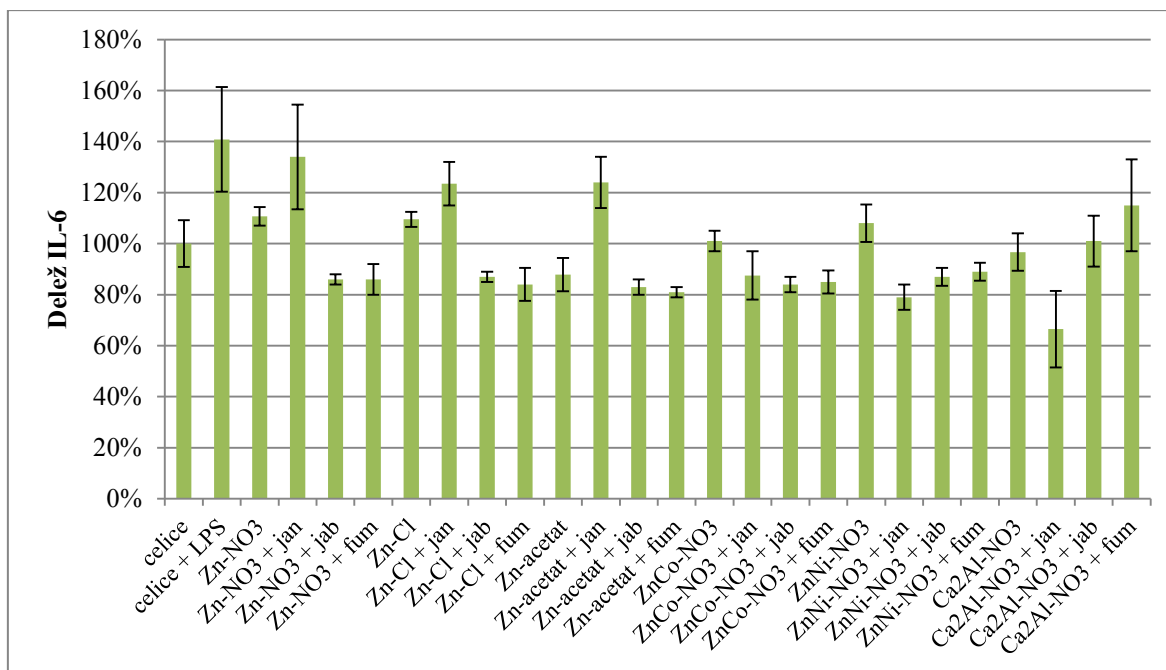
4.2.3. Encimskoimunski testi (ELISA)

Z vsemi vzorci na obeh celičnih linijah smo izvedli tudi imunski test ELISA za preverjanje prisotnosti citokinov IL-6 in TNF- α , po postopku opisanem v podpoglavju 3.2.6. Pri testu ELISA na celicah THP-1 je bila velika večina vrednosti pod mejo detekcije pri obeh citokinih.



Slika 34: Delež koncentracije TNF- α glede na celice brez dodanega vzorca, po dodatku HDS oz. LDH in interkalatov z jantarno, jabolčno ter fumarno kislino pri celični liniji RAW264.7.

Slika 34 prikazuje koncentracijo citokina TNF- α pri celični liniji RAW264.7. Rezultati so normalizirani glede na koncentracijo TNF- α v celicah brez dodanega vzorca, ki predstavlja 100 %. Vidimo lahko, da večina spojin ni značilno povečala koncentracije TNF- α . Za več kot 30 % so koncentracijo TNF- α povečali štirje HDS – Zn-NO₃, Zn-Cl, ZnCo-NO₃ z jantarno kislino in ZnNi-NO₃ z jantarno kislino. Največje povišanje koncentracije (70 %) pa opazimo pri LDH Ca₂Al-NO₃ interkaliranem s fumarno kislino.



Slika 35: Delež koncentracije IL-6 glede na celice brez dodanega vzorca, po dodatku HDS oz. LDH in interkalatov z jantarno, jabolčno ter fumarno kislino pri celični liniji RAW264.7.

Slika 35 prikazuje koncentracijo citokina IL-6 pri celični liniji RAW264.7. Rezultati so tudi v tem primeru normalizirani glede na koncentracijo IL-6 v celicah brez dodanega vzorca, ki predstavlja 100 %. Znova lahko opazimo, da v veliki večini primerov ni prišlo do značilnega povečanja koncentracije IL-6, glede na pozitivno kontrolo. Za več kot 20 % so koncentracijo IL-6 povečali trije HDS – Zn-NO₃, Zn-Cl in Zn-acetat, vsi trije interkalirani z jantarno kislino. LDH Ca₂Al-NO₃ interkaliran s fumarno kislino, ki je najbolj povečal koncentracijo TNF- α , je v tem primeru koncentracijo IL-6 povečal le za 15 %.

Niti en HDS torej ni signifikantno povečal koncentracije obeh citokinov. Najbolj obetavne rezultate smo pridobili pri LDH Ca₂Al-NO₃ interkaliranem s fumarno kislino, ki je tudi pri testiranju citotoksičnosti bil najmanj toksičen.

5 Sklepi

V magistrski nalogi smo preverjali potencial za uporabo različnih večplastnih materialov in njihovih interkalatov kot adjuvansov. V ta namen smo najprej sintetizirali pet različnih HDS in en LDH ter njihove interkalate z jantarno, jabolčno in fumarno kislino. Spojine smo karakterizirali z uporabo več različnih tehnik in izmerili njihovo stopnjo citotoksičnosti ter imunski odziv na dveh celičnih linijah.

Ugotovimo lahko, da so vsi HDS in njihovi interkalati preveč toksični za uporabo na živih organizmih, prav tako niso povzročili signifikantne aktivacije monocitne/makrofagne celične linije.

Predstavnik LDH in njegovi interkalati so izkazali manjšo toksičnost, vendar prav tako niso pretirano spodbudili imunskega odziva. Najbolj obetavne rezultate smo pridobili pri interkalatu $\text{Ca}_2\text{Al-NO}_3$ s fumarno kislino.

6 Literatura

1. Pellegrino P, Clementi E, Radice S. On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives. *Autoimmunity Reviews*. 2015;14(10):880-888.
2. Kraigher A, Ihan A, Avčin T. *Cepljenje in cepiva - dobre prakse varnega cepljenja*. Ljubljana: SZD: Inštitut za varovanje zdravja; 2011.
3. Glenney AT, Barr M. The precipitation of diphtheria toxoid by potash alum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1931;34(2):131-138.
4. Lindblad E. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunology and Cell Biology*. 2004;82(5):497-505.
5. Maughan C, Preston S, Williams G. Particulate inorganic adjuvants: recent developments and future outlook. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2015;67(3):426-449.
6. Kool M, Fierens K, Lambrecht B. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *Journal of Medical Microbiology*. 2012;61(7):927-934.
7. Steed J, Atwood J. *Supramolecular Chemistry, 2nd edition*: John Wiley & Sons; 2009.
8. Atwood J, Steed J. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry, Vol. 1*. New York: CRC Press; 2004.
9. Vaccari A. Preparation and catalytic properties of cationic and anionic clays. *Catalysis Today*. 1998;41(1-3):53-71.
10. Solin SA. Alumino-silicate clays and clay intercalation compounds. *Intercalation in Layered Materials*. New York: Plenum Press; 1986.
11. Braterman PS, Xu ZP, Yarberry F. Layered Double Hydroxides (LDHs). *Handbook of Layered Materials*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2004.
12. Rajamathi M, Thomas G, Kamath P. The many ways of making anionic clays. *Journal*

- of Chemical Sciences*. 2001;113(5-6):671-680.
13. Manasse E. Rocce eritree e di aden della collezione issel. *Atti Soc Toscana Sc Nat Proc Verb*. 1915;24(92).
 14. Feitknecht W. Über die α -Form der Hydroxyde zweiwertiger Metalle. *Helvetica Chim Acta*. 1938;21(1):766-784.
 15. Allmann R. The Crystal Structure of Pyroaurite. *Acta Crystallographica Section B*. 1968;24:972-977.
 16. Taylor H. Crystal structures of some double hydroxide materials. *Mineralogical Magazine*. 1973;39(304):377-389.
 17. Caillere S. New observation of faratsihite. *Comptes Rendus Chimie*. 1944;219:256-258.
 18. Beekman S. Preparation and Properties of New Gastric Antacids. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 1960;49(4):191-200.
 19. Soma I, Wakano H, Takahashi H, Yamaguchi M, Inventors. Flame-Resistant Vinyl Chloride Resin Compositions. Jap. Patent 50,063,047. May 29, 1975.
 20. Miyata S, Kumura T. Synthesis of new hydrotalcite-like compounds and their physico-chemical properties. *Chemistry Letters*. 1973;8(8):843-848.
 21. Bravo-Suarez J. Review of the synthesis of layered double hydroxides: a thermodynamic approach. *Quimica Nova*. 2004;27(4):601-614.
 22. He J, Wei M, Li B, Kang Y, Evans D, Duan X. Preparation of Layered Double Hydroxides. *Layered Double Hydroxides*: Springer Berlin Heidelberg; 2006.
 23. Rabenau A. The role of hydrothermal synthesis in preparative chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*. 1985;24(12):1026-1040.
 24. de Roy A, Forano C, Besse J. Layered Double Hydroxides: Synthesis and post-synthesis modification. *Layered Double Hydroxides: Present and future*: Nova Science

Publishers, Inc.; 2006.

25. Cavani F, Trifiro F, Vaccari A. Hydrotalcite-type anionic clays: preparation, properties and applications. *Catalysis Today*. 1991;11(2):173-301.
26. SE B, Inventor. Nouveaux composes metalliques utilisables comme catalyseurs. FR Patent 2,091,785, 1971.
27. Zhao Y, Li F, Zhang R, Evans D, Duan X. Preparation of Layered Double-Hydroxide Nanomaterials with a Uniform Crystallite Size Using a New Method Involving Separate Nucleation and Aging Steps. *Chemistry of Materials*. 2002;14(10):4286-4291.
28. Costantino U, Marmottini F, Nocchetti M, Vivani R. New Synthetic Routes to Hydrotalcite-Like Compounds - Characterisation and Properties of the Obtained Materials. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 1998;1998(10):1439-1446.
29. Newman S, Jones W. Synthesis, characterization and applications of layered double hydroxides containing organic guests. *New Journal of Chemistry*. 1998;22(2):105-115.
30. Kaassis A, Wei M, Williams G. New biocompatible hydroxy double salts and their drug delivery properties. *Journal of Materials Chemistry B*. 2016;4(35):5789-5798.
31. Bull R, Markland C, Williams G, O'Hare D. Hydroxy double salts as vesatile storage and delivery matrices. *Journal of Materials Chemistry*. 2011;21(6):1822-1828.
32. Markland C, Williams G, O'Hare D. The intercalation of flavouring compounds into layered double hydroxides. *Journal of Materials Chemistry*. 2011;21(44):17896-17903.
33. Williams G, Dunbar T, Beer A, Fogg A, O'Hare D. Intercalation chemistry of the novel layered doouble hydroxides [MAI₄(OH)₁₂](NO₃)₂.yH₂O (M = Zn, Cu, Ni and CO). 1: New organic intercalates and reaction mechanisms. *Journal of Materials Chemistry*. 2006;16(13):1222-120.
34. Khan A, Ragavan A, Fong B, et al. Recent developments in the use of layered double hydroxides as host materials for the storage and triggered release of functional anions. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2009;48(23):10196-10205.

35. Li A, Qin L, Wang W, et al. The use of layered double hydroxides as DNA vaccine delivery vector for enhancement of anti-melanoma immune response. *Biomaterials*. 2011;32(2):469-477.
36. Millange F, Walton R, Lei L, O'Hare D. Efficient separation of terephthalate and phthalate anions by selective ion-exchange intercalation in the layered double hydroxide $\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *Chemistry of Materials*. 2000;12(7):1990-1994.
37. Jin M, Li W, Spillane D, et al. Hydroxy double salts intercalated with Mn(II) complexes as potential contrast agents. *Solid State Sciences*. 2016;53:9-16.
38. Kaassis A, Xu S, Guan S, Evans D, Wei M, Williams G. Hydroxy double salts loaded with bioactive ions: Synthesis, intercalation mechanisms, and functional performance. *Journal of Solid State Chemistry*. 2016;238:129-138.
39. Taj S, Singer R, Nazir T, Williams G. The first hydroxy double salt tablet formulation. *RSC Advances*. 2013;3(2):358-361.
40. Williams G, Crowder J, Burley J, Fogg A. The selective intercalation of organic carboxylates and sulfonates into hydroxy double salts. *Journal of Materials Chemistry*. 2012;22(27):13600-13611.
41. Williams G, O'Hare D. New phosphonate intercalates of $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$. *Solid State Sciences*. 2006;8(8):971-980.
42. Newman S, Jones W. Comparative Study of Some Layered Hydroxide Salts Containing Exchangable Interlayer Anions. *Journal of Solid State Chemistry*. 1999;148(1):26-40.
43. Biswick T, Jones W, Pacula A, Serwicka E, Podobinski J. The role of anhydrous zinc nitrate in the thermal decomposition of the zinc hydroxy nitrates $\text{Zn}_5(\text{OH})_8(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{ZnOHNO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. *Journal of Solid State Chemistry*. 2007;180(4):1171-1179.
44. Srivastava OK, A. SE. Studies on metal hydroxy compounds. I. Thermal analyses of zinc derivatives $\alpha\text{-Zn}(\text{OH})_2$, $\text{Zn}_5(\text{OH})_8\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\beta\text{-ZnOHCl}$, and ZnOHF . *Canadian*

Journal of Chemistry. 1967;45(6):579-583.

45. Biswick T, Jones W, Pacula A, Serwicka E, Podobinski J. Evidence for the formation of anhydrous zinc acetate and acetic anhydride during the thermal degradation of zinc hydroxy acetate $\text{Zn}_5(\text{OH})_8(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ to ZnO . *Solid State Sciences*. 2009;11(2):330-335.