

In vitro ispitivanje toksičnosti kationiziranih i antimikrobno obrađenih tekstilija

Prlok, Doroteja

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:109456>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Doroteja Prlok

1199/N

***IN VITRO* ISPITIVANJE
TOKSIČNOSTI KATIONIZIRANIH
I ANTIMIKROBNO OBRAĐENIH
TEKSTILIJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za toksikologiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Teute Murati te uz pomoć izv. prof. dr. sc. Ivane Kmetič i Marine Miletić, mag. ing.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Teuti Murati, izv. prof. dr. sc. Ivani Kmetič i asistentici mag. ing. Marini Miletić na stručnoj pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog rada.



*Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2017-05-8780
Bolničke zaštitne tekstilije.*

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za toksikologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

IN VITRO ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI KATIONIZIRANIH I ANTIMIKROBNO OBRAĐENIH TEKSTILJA

Doroteja Prlok, 1199/N

Sažetak: Prisutnost određenih mikroorganizama na tekstilijama može imati brojne negativne posljedice za čovjeka i tekstilne proizvode. Zbog sve veće svijesti o patogenim učincima i pridruženim zdravstvenim rizicima, u posljednjih nekoliko godina provode se istraživanja kako bi se smanjio rast mikroorganizama na tekstilijama. Stoga se, u svrhu kontrole razvoja i razmnožavanja mikroorganizama, provode antimikrobne obrade tekstilija. Antimikrobna obrada tekstilija mora biti djelotvorna na široki spektar različitih vrsta gljiva i bakterija uz istovremenu neškodljivost za ljudsko zdravlje i okoliš. U ovom radu je ispitana potencijalna toksičnost tvari kojima su impregnirane tekstilije namijenjene upotrebi u bolnicama na staničnoj liniji humanih keratinocita, HaCaT. Za praćenje stanične proliferacije i vijabilnosti korištena je *MTT* metoda nakon 48 h i 72 h. Primijećeno je smanjenje stanične vijabilnosti i proliferacije kod svih ispitanih uzoraka tretiranih različitim razrijeđenjima ishodne otopine dobivene ekstrakcijom pamuk i pamuk/poliester tekstilija.

Glavne riječi: antimikrobna svojstva tekstilija, HaCaT, kitozan, *MTT* metoda, vijabilnost

Rad sadrži: 46 stranica, 14 slika, 5 tablica, 44 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Teuta Murati

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič

Marina Miletić, mag. ing., asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič
2. doc. dr. sc. Teuta Murati
3. izv. prof. dr. sc. Sandra Flinčec Grgac, Tekstilno-tehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
4. izv. prof. dr. sc. Igor Slivac (zamjena)

Datum obrane: 17. srpnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Toxicology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

IN VITRO TOXICITY ASSESSMENT OF CATIONIZED AND ANTIMICROBIC TREATED TEXTILES

Doroteja Prlok, 1199/N

Abstract: The growth of certain microorganisms on textiles can have a number of negative consequences for humans and textile itself. Due to the growing awareness of the pathogenic effects and associated health risks, over the last few years, intensive research has been conducted in order to reduce the growth of microorganisms on textiles. Therefore, in order to control the development and reproduction of microorganisms, antimicrobial textile treatments are carried out. Antimicrobial treatment of textiles should be effective against a broad spectrum of fungal and bacterial species but at the same time harmless to human health and the environment. In this study, the potential toxicity of textile impregnated substances for use in hospitals has been investigated using human keratinocyte cell line HaCaT. The *MTT* method after 48 h and 72 h was used to determine cell proliferation and viability. A decrease in cell viability and proliferation was observed in all tested samples treated with different dilutions of solution obtained by extraction of cotton and cotton/polyester textiles.

Keywords: antimicrobial properties of textiles, HaCaT, chitosan, *MTT* method, viability

Thesis contains: 46 pages, 14 figures, 5 tables, 44 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Teuta Murati, Assistant Professor

Technical support and assistance: PhD. Ivana Kmetič, Associate Professor
Marina Miletić, MSc., Scientific Assistant

Reviewers:

1. PhD. Ivana Kmetič, Associate professor
2. PhD. Teuta Murati, Assistant professor
3. PhD. Sandra Flinčec Grgac, Associate professor, Faculty of Textile Technology University of Zagreb
4. PhD. Igor Slivac, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 17th July 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. STANIČNE KULTURE	2
2.1.1. Primarne stanične kulture	3
2.1.2. Stanične linije	4
2.1.2.1. Kulture u monosloju i suspenziji	5
2.1.2.2. HaCaT stanična linija	6
2.1.3. Uzgoj staničnih linija	6
2.1.4. Primjena staničnih linija	8
2.2. <i>IN VITRO</i> TESTOVI TOKSIČNOSTI	9
2.3. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA TEKSTILIJA	10
2.3.1. Antimikrobni agensi	12
2.3.1.1. Kitozan	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Biološki materijali	16
3.1.2. Kemikalije	16
3.1.3. Otopine i puferi	16
3.1.4. Oprema i uređaji	18
3.2. METODE RADA	18
3.2.1. Uzgoj monoslojne HaCaT stanične linije	18
3.2.1.1. Trypan blue metoda	19
3.2.2. Priprema tekstilija	20
3.2.3. Priprema tekućih ekstrakata tekstilija	22
3.2.4. Određivanje citotoksičnosti antimikrobnih tvari kojima su impregnirane tekstilije <i>MTT</i> metodom ..	22
3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. UČINAK EKSTRAKATA IZOLIRANIH IZ POLIESTER/PAMUK TEKSTILIJA KOJE SU TRETIRANE ANTIMIKROBNIM AGENSOM NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU HaCaT STANIČNE LINIJE ODREĐEN <i>MTT</i> METODOM	25
4.2. UČINAK EKSTRAKATA IZOLIRANIH IZ PAMUČNIH TEKSTILIJA KOJE SU TRETIRANE ANTIMIKROBNIM AGENSOM NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU HaCaT STANIČNE LINIJE ODREĐEN <i>MTT</i> METODOM	31
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	42

1. UVOD

Tekstilni materijali idealna su podloga za rast i razvoj mikroorganizama kao što su bakterije i gljive koje uzrokuju niz nepoželjnih učinaka ne samo na tekstilijama već i na njegovom korisniku (Morais i sur., 2016). Kontaminacija mikroorganizmima predstavlja problem, posebno za tekstilije koje se upotrebljavaju u bolnicama za zdravstvenu i higijensku njegu (Periolatto i sur., 2017). U posljednjih nekoliko godina raste interes za antimikrobnim tretmanom tekstilija radi postizanja higijene i zaštite od mikroorganizama te sprječavanja infekcija uzrokovanih njihovim prekomjernim rastom (Morais i sur., 2016). U tu svrhu tekstilije se impregniraju različitim antimikrobnim agensima koji mogu djelovati biostatski, tj. inhibirati rast mikroorganizama ili djeluju kao biocidi, tj. ubijaju mikroorganizme. Antimikrobne agense možemo podijeliti prema porijeklu na dobivene iz prirodnih izvora i sintetske spojeve (Periolatto i sur., 2017). Iako su sintetski antimikrobni agensi učinkoviti protiv širokog spektra mikroorganizama i daju trajan učinak tekstilijama, postoji zabrinutost zbog pridruženih negativnih učinaka kao što je djelovanje na nepatogene mikroorganizme i zagađenje okoliša (Joshi i sur., 2009).

Primjer antimikrobnog agensa je kitozan, modificirani biopolimer koji ima vrlo široku primjenu zbog svoje biorazgradivosti, biokompatibilnosti, netoksičnosti i antimikrobne aktivnosti. Antimikrobna aktivnost koja proizlazi iz njegove polikationske prirode čini kitozan visokovrijednim prirodnim polimerom dobivenim iz otpadnih produkata morskih životinja poput egzoskeleta rakova (Lim i Hudson, 2003).

Upotreba *in vitro* sustava (staničnih linija, primarnih staničnih kultura, kultura organa, dijelova tkiva itd.) ima široku primjenu u toksikološkim istraživanjima. *In vitro* sustavi idealni su za ispitivanje molekularnih, staničnih i fizioloških mehanizama toksičnosti izazvanih kemikalijama (Kniewald i sur., 2005).

Cilj ovog rada je ispitati potencijalnu toksičnost kationiziranih i antimikrobno obrađenih pamučnih i poliestar/pamuk tekstilija koje se razlikuju prema načinu kemijske obrade. Impregnacija tekstilija provedena je na Tekstilno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Kao alternativni test sustav koristiti će se HaCaT stanična linija, tj. stanična linija humanih keratinocita, a učinak antimikrobno obrađenih tekstilija na staničnu vijabilnost i proliferaciju odrediti će se *MTT* metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. STANIČNE KULTURE

Tehnika uzgoja staničnih kultura prvi put je razvijena početkom 20-tog stoljeća kao metoda proučavanja ponašanja životinjskih stanica *in vitro*. Princip uspostave i uzgoja stanične kulture uspostavljen je kada je embriolog Roux koristio toplu fiziološku otopinu za održavanje pilećeg embrija, čime je došao do osnovnih načela ovog principa (Hudu i sur., 2016).

Uspostava stanične kulture je proces izolacije stanica iz organizma (*in vivo*) i naknadni rast stanica u kontroliranim uvjetima (*in vitro*). Stanična kultura jedan je od glavnih alata koji se koristi u staničnoj i molekularnoj biologiji te je izvrstan model za proučavanje normalne fiziologije i biokemije stanica (npr. metaboličke studije, starenje), utjecaja lijekova i toksičnih spojeva na stanice, mutageneze i kancerogeneze. Također se koristi u razvoju i ispitivanju lijekova te širokoj proizvodnji bioloških spojeva (npr. cjepiva, terapijskih proteina) (Invitrogen, 2020). Danas je napredak u istraživanju staničnih kultura doveo do razvoja koncepta regenerativne medicine (Uysal i sur., 2018).

Glavna prednost korištenja stanične kulture za bilo koju od ovih primjena je konzistentnost i reproducibilnost rezultata. Međutim, ovi sustavi donose i brojna ograničenja kao što su posebni (sterilni) uvjeti rada, posebna oprema, visokoobrazovana radna snaga itd. Također, što je najvažnije, nijedno *in vitro* stanje nije dovoljno za oponašanje složenih mehanizama u organizmu. Jedan od najčešćih problema u korištenju staničnih kultura je kontaminacija te je važno ukloniti standardne čimbenike kontaminacije, a laboratorij u kojem uspostavljamo staničnu kulturu mora biti sterilan. Umjetno okruženje u kojem se stanice uzgajaju sastoji se od odgovarajuće posude koja sadrži medij koji opskrbljuje stanice hranjivim tvarima (aminokiseline, ugljikohidrati, vitamini, minerali), faktorima rasta, hormonima i plinovima (O₂, CO₂) i regulira fizikalno-kemijsko okruženje (pH, osmotski tlak, temperatura) (Invitrogen, 2020).

Dva su značajna čimbenika koja ograničavaju diobu stanica u kulturi. Jedan je slobodni prostor u posudi za uzgoj, a drugi je smanjenje hranjivih tvari u mediju za uzgoj. U tom je stanju potrebno subkultiviranje, tj. pasažiranje stanica. Da bismo procijenili potrebu za pasažiranjem, potrebno je odrediti koncentraciju stanica, pH okoline te razdoblje koje je prošlo od posljednjeg pasažiranja. Iako se stanice nastavljaju dijeliti u kulturi, na kraju određenog vremena gube sposobnost proliferacije i preživljavanja kao rezultat fizioloških i

patoloških promjena. U osnovi je ovaj proces sličan događajima u organizmu poput staničnog starenja i apoptoze (Uysal i sur., 2018).

2.1.1. Primarne stanične kulture

Primarna stanična kultura je kultura koja je izolirana iz stanica, tkiva ili organa uzetih izravno iz nekog organizma (Unchern, 1999). Korake u uspostavi primarne stanične kulture čini: a) izolacija tkiva, b) usitnjavanje tkiva (mehaničko) i razgradnja proteolitičkim enzimima, c) uspostavljanje kulture - inkubacija, prihvaćanje i rast stanica i d) odvajanje pojedinačnih stanica od ostataka tkiva. Vrste stanica najčešće uzgajane kao primarne kulture su: epitelne stanice, fibroblasti, keratinociti, melanociti, endotelne stanice, mišićne stanice, hematopoetske i mezenhimske matične stanice (ATCC, 2020). Neke stanice, poput makrofaga i neurona, ne dijele se *in vitro* i mogu se koristiti samo kao primarne kulture (Unchern, 1999).

Uspostavljanje primarne stanične kulture započinje izolacijom tkiva ili organa u aseptičkim uvjetima. Iako su do danas razvijene razne tehnike izolacije, metoda koja će biti izabrana mijenja se ovisno o vrsti tkiva i organizma iz kojeg se dobiva tkivo te njegovoj starosti. Uzevši u obzir ove uvjete, odabir odgovarajućeg medija i enzima koji će se koristiti, njihova količina i razdoblje primjene od velikog su značaja. Bez obzira koja se metoda odabrala, rezultat koji se planira postići je dobivanje funkcionalnih i živih stanica s minimalnim staničnim oštećenjima (Uysal i sur., 2018). Nakon izolacije može se dobiti primarna stanična kultura migracijom stanica iz fragmenata tkiva prihvaćajući se na pogodnu podlogu ili razdvajanjem tkiva mehanički ili enzimski da bi se dobila suspenzija stanica (Freshney, 2010). Stanice se dispergiraju (mehanički i/ili enzimski) u staničnu suspenziju koja se tada može uzgajati kao monosloj na podlozi, ili kao suspenzija u kulturi. Te su kulture izgubile svoju histotipičnu strukturu i često neka biokemijska svojstva povezana s njom (Unchern, 1999).

Različite organizacije tkiva imaju karakteristične izvanstanične i međustanične veze. Na primjer, epitelno tkivo je tkivo u kojem se stanice drže čvrsto jedna do druge s različitim međustaničnim vezama, a u bazalnom dijelu se spoje sa strukturom formiranom vezivnim tkivom. Dezmosomi, koji su jedna od veza među epitelnim stanicama, ovisni su o kalciju i odabiru odgovarajućeg enzima te je za uklanjanje veza potrebno koristiti medij bez kalcija. Cilj je ukloniti veze između stanica i izvanstaničnog matriksa. Enzimi koji se koriste za razgradnju su tripsin, kolagenaza, elastaza, hijaluronidaza, deoksiribonukleaza i pronaza. Različite organizacije tkiva zahtijevaju upotrebu različitih enzima, ali najčešće se koristi kombinacija spomenutih enzima (Uysal i sur., 2018).

Primarnu tehniku uspostave stanične kulture razvili su Harrison (1907. godine) i Carrel (1912. godine) te se ova tehnika u izmijenjenom obliku koristi i danas. Tkivo se fino usitnjava do komadića veličine 1mm^3 i ispire, a kako bi se konačno dobila suspenzija stanica komadići se protiskuju kroz nekoliko sita različitih veličina pora. To je tzv. mehanička disagregacija. Kod enzimske disagregacije, za dobivanje sitnih fragmenata koriste se različite otopine proteolitičkih enzima (hladni tripsin, topli tripsin, kolagenaza) nakon čega slijedi centrifugiranje. Dobiveni talog se resuspendira u odabranom mediju te se eventualni zaostaci tkiva filtriraju kroz mrežicu (Freshney, 2010).

Primarne kulture su obično heterogene i imaju nisku stopu rasta, ali još uvijek imaju prednost pred kontinuiranim staničnim linijama jer predstavljaju reprezentativni uzorak tkiva iz kojeg su izolirane te zadržavaju specifična tkivna svojstva (Sinha i Kumar, 2008).

2.1.2. Stanične linije

Nakon prve subkultivacije ili pasažiranja primarna kultura postaje stanična linija te se može razmnožavati i pasažirati više puta. Formiranje stanične linije iz primarne kulture podrazumijeva udvostručenje populacije, tj. porast ukupnog broja stanica te prevladavanje stanica s većim stupnjem proliferacije što rezultira većim brojem uniformiranih stanica (Freshney, 2010).

Stanične linije mogu biti konačne ili kontinuirane. Stanične linije s ograničenim životnim vijekom nazivaju se konačnim staničnim linijama. One imaju ograničeni broj dioba (najčešće između 20 i 80) prije odumiranja koji ovisi o vrsti stanične linije, klonalnim varijacijama i o stanju kulture. Kontinuirane stanične linije imaju neograničeni životni vijek tako da broj generacija, tj. dioba postaje manje važan te je zamijenjen brojem pasažiranja od posljednjeg odmrzavanja stanica. Uspostavljanje kontinuiranih staničnih linija obično podrazumijeva promjenu genotipa ili transformaciju, uz veći stupanj proliferacije i povećanu učinkovitost kloniranja. Sposobnost stanične linije da kontinuirano raste vjerojatno je posljedica genetskih promjena, koje često često uključuju deleciju ili mutaciju p53 gena koji bi zaustavio stanični ciklus ukoliko bi došlo do mutacije DNA (Freshney, 2010). Promjene u kulturi koje dovode do stvaranja kontinuirane stanične linije se nazivaju *in vitro* transformacije te mogu biti spontane ili inducirane kemijskim agensima i virusima. Transformacija podrazumijeva promjene u karakteristikama rasta stanica (gubitak kontaktne inhibicije, gubitak ovisnosti rasta o podlozi) koje su često u korelaciji s povećanom kancerogenosti. Karakteristike kontinuiranih staničnih linija kao što su smanjena potreba za serumom, rast u polukrutom mediju i aneuploidija povezane su s malignim transformacijama (Freshney, 2010).

Stanične linije trebaju održavati funkcionalne značajke primarnih kultura. Budući da se staničnim linijama genetski manipulira, to može promijeniti njihov fenotip, native funkcije i njihovu osjetljivost na podražaje. Pasažiranje staničnih linija može uzrokovati genotipske i fenotipske promjene kroz duže vremensko razdoblje, što također može uzrokovati heterogenost u kulturi. Stoga stanične linije ne predstavljaju primarne stanice i mogu dati različite rezultate. Drugi veliki problemi povezani sa staničnim linijama su kontaminacija drugim staničnim linijama i mikoplazmama (Kaur i Dufour, 2012). George O.Gey je 1951. godine zajedno sa svojim suradnicima uspostavio prvu kontinuiranu humanu staničnu liniju (HeLa) iz stanica raka grlića maternice. Zbog pojave uspostavljenih staničnih linija, uzorkovanje stanica iz tkiva životinja u eksperimentima postalo je nepotrebno, što je omogućilo istraživačima širom svijeta provođenje ispitivanja upotrebom iste homogene populacije stanica (Yao i Asayama, 2017).

2.1.2.1. Kulture u monosloju i suspenziji

Stanice u kulturi mogu rasti u monosloju ili u suspenziji. Većina stanica koje potječu od kralježnjaka, osim hematopoetskih stanica i nekolicine drugih, ovisne su o podlozi i moraju se uzgajati na prikladnoj podlozi koja je posebno tretirana kako bi se omogućila adhezija i širenje, dok neke mogu biti uzgajane u suspenziji (Thermo Fisher Scientific, 2020). Kod adherentnih staničnih kultura broj stanica izravno ovisi o raspoloživosti površine na kojoj stanice mogu rasti, pri čemu treba voditi računa da se kultura održava do potpune prekrivenosti površine stanicama (Unchern, 1999). Uzgoj zahtjeva redovito pasažiranje te je moguća laka vizualizacija pod mikroskopom (Thermo Fisher Scientific, 2020). Kulture u kojima stanice rastu vezane jedna za drugu ili za podlogu moraju se tretirati proteolitičkim enzimom kako bi se prekinula veza između stanica i podloge. Enzim koji se najčešće koristi je tripsin (Unchern, 1999). Suspenzijski uzgoj pogodan je za stanice prilagođene suspenziji i nekolicini neadhezivnih staničnih linija poput hematopoetske stanične linije. Uzgoj se odvija u bocama i zahtjeva miješanje radi adekvatne izmjene plinova kada je volumen sloja iznad stanica 0,2-0,5 mL cm⁻². Miješanje se postiže magnetnim mješačem ili tresilicom. Pasažiranje se lako provodi i ne zahtjeva tripsinizaciju stanica, ali zahtjeva brojanje stanica i računanje vijabilnosti. Rast je limitiran koncentracijom stanica te kultura mora biti razrijeđena kako bi se stimulirao rast (Thermo Fisher Scientific, 2020).

2.1.2.2. HaCaT stanična linija

HaCaT, tj. stanična linija humanih keratinocita je spontano transformirana linija besmrtnih keratinocita izolirana iz kože odraslog čovjeka. HaCaT stanična linija je prva kontinuirana stanična linija humanih keratinocita koja zadržava cjelovitu sposobnost diferencijacije, pokazuje normalnu morfogenezu i zadržava strukturu nakon transplantacije *in vivo* (Boukamp i sur., 1988; Colombo i sur., 2017). Na primjer, kada se HaCaT stanice nanese na miševe s teškom imunodeficijencijom (engl. *Severe Combined Immunodeficiency*, SCID) ili uzgajaju u organotipskim kulturama dolazi do normalne keratinizacije i stratifikacije pokazujući da HaCaT stanice zadržavaju sva funkcionalna svojstva diferencijacije ljudskih keratinocita. Kod kariotipizacije ova linija je aneuploidna (u početku hipodiploidna) s jedinstvenim stabilnim marker-kromosomima koji ukazuju na monoklonsko porijeklo. Karakteristike HaCaT stanične linije jasno dokazuju da se spontana transformacija humanih keratinocita može pojaviti *in vitro* i povezani su sa sekvencijalnim kromosomskim promjenama (Boukamp i sur., 1988). Iako HaCaT stanična linija ima transformiran fenotip *in vitro*, stanice nisu tumorogenične. Besmrtne humane HaCaT stanične linije mogu se uzgajati u tradicionalnom mediju te se mogu održavati unutar kulture dulji vremenski period. HaCaT stanice u kulturi mogu prelaziti iz stanja diferencijacije u bazalno stanje i obrnuto, a to ovisi o koncentraciji kalcija u mediju (Deyrieux i Wilson, 2007). Primarni keratinociti uzgojeni *in vitro* u niskoj koncentraciji kalcija zadržavaju bazni fenotip, dok dodavanje kalcija $>0,1$ mM pokreće njihovu diferencijaciju (Colombo i sur., 2017). HaCaT stanice široko su korištene u proučavanju iritacije kože, karcinoma kože, genotoksičnosti, mutagenosti i citotoksičnosti, kao i za ispitivanja štetnih učinaka UV zračenja (Klemola, 2008).

2.1.3. Uzgoj staničnih linija

Osnovi okolišni uvjeti za optimalan rast stanica uključuju kontroliranu temperaturu, podlogu za pričvršćivanje stanica, odgovarajući medij za rast i inkubator koji održava odgovarajući pH i osmolalnost. Najvažniji korak u održavanju stanične kulture jest izbor odgovarajućeg medija za uzgoj stanica *in vitro*. Medij sadrži hranjive tvari potrebne za rast stanica, faktore rasta i hormone. Tipični medij sastoji se od ugljikohidrata, aminokiselina, soli, bikarbonata, vitamina i hormona (Uysal i sur., 2018).

Tipični medij sadrži:

- ugljikohidrate kao izvor energije i to pretežno glukozu i galaktozu te fruktozu i maltozu;

- aminokiseline - esencijalne aminokiseline koje stanice ne mogu same sintetizirati, a nužne su za sintezu proteina (posebno je važan L-glutamin koji osigurava dušik za nikotinamid adenin dinukleotid (NAD), nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) i nukleotide te služi kao sekundarni izvor energije za metabolizam). Mediju se mogu dodati i neesencijalne aminokiseline da bi nadomjestile one koje su se potrošile tijekom rasta stanica;
- vitamine B skupine - biotin, folati, nikotinamid, pantotenska kiselina, piridoksin, riboflavin, tiamin i vitamin B12;
- anorganske soli- održavaju osmotsku ravnotežu, soli Na^+ , K^+ , Cl^- (ioni koji su važni za regulaciju membranskog potencijala) i soli dvovalentnih kationa poput Mg^{2+} , Ca^{2+} (Arora, 2013; Yang i Xiong, 2012).

Stanice zahtijevaju specifičan pH od 7,2-7,4 kako bi mogle obavljati svoje stanične funkcije. Do promjena pH dolazi zbog različitih produkata staničnog metabolizma, a jedan od njih je CO_2 koji u hermetičkim uvjetima reagira s vodikovim peroksidom pri čemu nastaje ugljična kiselina koja uzrokuje smanjenje pH medija (Yang i Xiong, 2012). Reguliranje pH je važno za održavanje optimalnih uvjeta, a adekvatna pH vrijednost medija postiže se dodatkom pufera, najčešće bikarbonatnog. Većina komercijalno dostupnih medija za kulturu uključuje fenol crveno kao pH indikator koji omogućava stalno praćenje pH (Arora, 2013). Ova formula zapravo definira tipičan bazalni medij. Osim bazalnog medija postoje još dvije vrste medija – obogaćeni mediji i mediji bez seruma. Iako bazalni medij zadovoljava osnovne potrebe stanica, s vremenom ga je potrebno obogatiti. U tom smislu, najvažniji sadržaj koji treba dodati je serum (Uysal i sur., 2018). Serum je složena mješavina albumina, faktora rasta i inhibitora rasta. Jedan je od najvažnijih sastojaka medija za uzgoj staničnih kultura te služi kao izvor aminokiselina, proteina, vitamina (posebno onih topivih u mastima - vitamini A, D, E, K), ugljikohidrata, lipida, hormona, faktora rasta, minerala i elemenata u tragovima (Arora, 2013). 10% seruma dodanog mediju podržava staničnu diobu i rast. Među različitim vrstama seruma najčešće se koristi fetalni goveđi serum (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS) koji sadrži velike količine faktora embrionalnog rasta (Uysal i sur., 2018).

Dodatak seruma mediju ima sljedeće funkcije:

- osigurava osnovne hranjive tvari za stanice;
- osigurava nekoliko faktora rasta i hormona koji potiču proliferaciju, rast stanica i sudjeluju u specijaliziranoj funkciji stanica. Serum sadrži razne hormone, kao što su inzulin, adrenokortikalni hormoni (hidrokortizon, deksametazon), steroidni hormoni

(estradiol, testosteron i progesteron) itd. Faktori rasta uključuju fibroblastni faktor rasta (engl. *Fibroblast Growth Factors*, FGF), epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal Growth Factor*, EGF), trombocitni faktor rasta (engl. *Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF);

- osigurava nekoliko proteina „nosača“ poput albumina koji prenosi lipide, vitamine i hormone, te transferina koji prenosi željezo;
- neki proteini, poput fibronektina, pomažu pri pričvršćivanju stanica na podlogu. Također, osigurava čimbenike koji pomažu stanicama da se šire prije nego što se počnu dijeliti;
- fiziološka aktivnost nekih proteina vezana je uz inhibiciju određenih enzima, najčešće proteaza koji štite stanice od proteolize. Neke stanice (poput epitelnih stanica, mijeloidnih stanica) mogu otpustiti proteazu, koju može neutralizirati sastojak anti-proteaze u serumu;
- izvor je minerala u tragovima poput Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Fe^{2+} ;
- osigurava zaštitu za određene stanice- serum se široko koristi za zaustavljanje učinka tripsina. Albuminski serum olakšava viskoznost seruma i štiti stanicu od mehaničkih oštećenja, posebno u suspenziji staničnih kultura. Elementi u tragovima i ioni, poput SeO_3 i selena, igraju vrlo važnu ulogu u metaboličkoj detoksikaciji (Arora, 2013; Yang i Xiang, 2012).

Upotreba seruma ima i nekoliko nedostataka. Za većinu stanica serum nije fiziološka tekućina *in vivo*, stoga upotreba seruma može promijeniti normalno stanje nekih stanica. Serum može pospješiti rast nekih stanica (poput fibroblasta) i inhibirati proliferaciju drugih stanica (poput epidermalnih keratinocita). Određene komponente kao što su antitijela i bakteriotoksini mogu biti toksične za stanice, utjecati na stanični rast i uzrokovati staničnu smrt. Postoji rizik od kontaminacije seruma (virusima i mikoplazmama) tijekom njegove proizvodnje koja potencijalno utječe na stanice terezultira neuspjehom eksperimenta i nepouzdanim eksperimentalnim rezultatima (Yang i Xiong, 2012).

2.1.4. Primjena staničnih linija

Kontinuirane stanične linije se često koriste u istraživanjima umjesto primarnih kultura. Nude nekoliko prednosti nad upotrebom primarnih kultura kao što su isplativost, jednostavnost korištenja, pružaju neograničenu opskrbu stanicama i zaobilaze etičke probleme vezane uz upotrebu ljudskih i životinjskih tkiva. Stanične linije su homogene, genetski identične, što je

dragocjeno jer pružaju dosljedne i reproducibilne rezultate. Upotrebljavaju se u proizvodnji cjepiva, ispitivanjima metabolizma i citotoksičnosti lijekova, proizvodnji antitijela, proučavanju funkcije gena, stvaranju umjetnih tkiva i sintezi biološki aktivnih spojeva (Kaur i Dufour, 2012). Koriste se i za proučavanje toksičnosti kemikalija koje se koriste u tekstilnoj industriji kao i tekstilija koje ih sadrže (Klemola, 2008). Singh i suradnici (2017) proučavali su citotoksični učinak tekstilije tretirane nanočesticama CuO (bakrov (II) oksida) na staničnoj liniji humanog dermalnog fibroblasta (HDF) i staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma (HepG2) *MTT* metodom. Studije citotoksičnosti pokazale su da tretirane tekstilije nisu toksične za HDF stanice dok je primijećena određena citotoksičnost za HepG2 stanice. Zhang i suradnici (2015) ispitivali su citotoksičnost različitih površinskih agenasa za tretman tekstilija na staničnoj liniji humanih keratinocita (HaCaT) i staničnoj liniji plućnih fibroblasta (CRL-1490). Zaključili su da vrijeme izloženosti i upotreba različitih staničnih linija također utječu na rezultate citotoksičnosti. Stoga se prilikom provođenja testova toksičnosti u obzir moraju uzeti ti čimbenici.

2.2. *IN VITRO* TESTOVI TOKSIČNOSTI

In vitro testovi toksičnosti razvijeni su kao alternativa *in vivo* testovima i uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva, kulturama organa itd. *In vitro* sustavi idealni su za ispitivanje molekularnih, staničnih i fizioloških mehanizama kemijski inducirane toksičnosti koji se ne mogu vidjeti *in vivo* kao što su ispitivanja toksičnosti za ciljne organe i ciljne molekule (Kniewald i sur., 2005). Također, pogodni su za proučavanje metaboličkih puteva, odnosno ponekad je moguće detektirati metabolite *in vitro* koji se zbog svoje brze biotransformacije ne mogu otkriti *in vivo* (Eisenbrand i sur., 2002).

Pod pojmom "citotoksičnost" podrazumijeva se sposobnost tvari da uzrokuje smrt stanice. Većina *in vitro* testova citotoksičnosti bavi se nekrozom stanica, ali jednako važnim mehanizmom stanične smrti smatra se i apoptoza, koja zahtijeva drugačije metode procjene. *In vitro* testovi korisni su i potrebni za definiranje citotoksičnosti npr. intrinzične sposobnosti tvari da uzrokuje staničnu smrt kao posljedicu oštećenja osnovnih staničnih funkcija (Eisenbrand i sur., 2002). Tvari mogu biti selektivno citotoksične ili je njihovo citotoksično djelovanje rezultat interferencije sa specifičnim staničnim funkcijama (Klemola, 2008). *In vitro* testovi potrebni su za definiranje raspona koncentracije za daljnje i detaljnije ispitivanje kako bi se dobile informacije o parametrima kao što su genotoksičnost, indukcija mutacija ili programirana stanična smrt (Eisenbrand i sur., 2002).

Razumijevanje mehanizama kojima kemikalije uzrokuju oštećenje stanica i tkiva te razlozi povećane osjetljivosti određenih vrsta, pojedinaca ili tkiva na određene kemikalije značajno će poboljšati našu sposobnost predviđanja mogućih posljedica izloženosti ljudi i okoliša. Jedna od najvećih prednosti *in vitro* testova je u mogućnosti korištenja ljudskih stanica i tkiva, čime se uklanja potreba za ekstrapolacijom podataka, dobivenih provođenjem pokusa na laboratorijskim životinjama, na čovjeka (Kniewald i sur., 2005). *In vitro* sustavi uglavnom se upotrebljavaju za *screening* i stvaranje opsežnijih toksikoloških profila, tj. rangiranje kemikalija. Izuzetno su prikladni za proučavanje kemikalija male molekularne mase kao što su prehrambeni aditivi, zaslađivači, tvari koje se koriste u proizvodnji hrane, kontaminanata, pesticida, veterinarskih ostataka i prirodnih toksikanata. Također, mikronutrijenti i nutritivni suplementi poput vitamina, minerala te nenutritivne bioaktivne komponente procjenjuju se *in vitro* testovima (Eisenbrand i sur., 2002). U laboratorijima koji provode *in vivo* ispitivanja na životinjama nastoji se primjenjivati takozvani 3R (engl. *Reduce, Refine, Replace*) pristup koji opisuje upotrebu alternativnih strategija, potrebu za smanjenjem broja pokusnih životinja i za uvođenjem metoda kojima se bol i patnja životinja koje se koriste želi svesti na minimum (Singh i sur., 2018). Osim etičkih prednosti, ovi su testovi jeftiniji i brži za provođenje te nastaje manja količina toksičnog otpada (Klemola, 2008). *In vitro* testovi nude još nekoliko prednosti kao što su kontrolirani uvjeti ispitivanja, visoka razina standardizacije te smanjenje varijabilnosti između pokusa. Također, potrebne su male količine materijala za testiranje, mogu se koristiti transgenske stanice koje nose ljudske gene te je smanjeno ispitivanje na životinjama (Araújo i sur., 2014).

Nedostatak *in vitro* metoda je da zbog odsutnosti metaboličke aktivacije u staničnim sustavima ne mogu u potpunosti zamijeniti *in vivo* ispitivanja na laboratorijskim životinjama. Ostali razlozi uključuju poteškoće prilikom ekstrapolacije *in vitro* koncentracija u *in vivo* dozu te poteškoće u simulaciji posljedica dugotrajne izloženosti (Ghallab, 2013).

2.3. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA TEKSTILJA

Kako su potrošači sve svjesniji utjecaja na osobnu higijenu i zdravstvenih rizika povezanih s nekim mikroorganizmima, potražnja za antimikrobnim tekstilijama pokazuje velik porast u posljednjih nekoliko godina. U 2000. godini procijenjeno je da je proizvodnja antimikrobnih tekstilija dostigla oko 30 000 tona u zapadnoj Europi i 100 000 tona širom svijeta. Nadalje, između 2001. i 2005. god. u zapadnoj Europi zabilježeno je godišnje povećanje antimikrobnih tekstilija za oko 15%, što je jedan od najbrže rastućih sektora tekstilne industrije (Morais i sur., 2016). Tekstilni materijal je već dugo prepoznat kao medij koji podržava rast

mikroorganizama kao što su bakterije i gljive. Ti mikroorganizmi se nalaze gotovo posvuda u okolini i mogu se brzo razmnožavati kada su zadovoljeni osnovni uvjeti poput vlage, hranjivih tvari i temperature. Većina sintetičkih vlakana, zbog visoke hidrofobnosti, otpornija je na napade mikroorganizama od prirodnih vlakana. Proteini u keratinskim vlaknima i ugljikohidrati u pamuku mogu djelovati kao hranjive tvari i izvori energije pod određenim uvjetima. Rast mikroorganizama na tekstilijama izaziva niz neželjenih učinaka ne samo na tekstilni materija, već i na njegova korisnika. Ti učinci uključuju stvaranje neugodnog mirisa, mrlja i promjene boje tekstilija, smanjenje mehaničke čvrstoće tekstilija i povećanje vjerojatnosti kontaminacije. Iz tih razloga, vrlo je poželjno da se rast mikroorganizama na tekstilijama svede na najmanju moguću mjeru tijekom njegove upotrebe i skladištenja (Gao i Cranston, 2008). Većina mikroorganizama koji sudjeluju u kontaminaciji tekstilija kao *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Acinetobacter baumannii* mogu uzrokovati infekcije kod ljudi. Kontaminacija mikroorganizmima predstavlja prijetnju posebno za tekstilije koje se koriste u bolnicama za zdravstvenu i higijensku njegu, ali i u sportskoj odjeći, sustavima za pročišćavanje vode i prehrambenoj industriji. Stoga potražnja za antimikrobnim tekstilnim materijalom raste te se posljednjih nekoliko godina provode intenzivna istraživanja kako bi se smanjio ili eliminirao rast mikroorganizama na tekstilijama (Periolatto i sur., 2017).

Na tržištu su prisutna brojna antimikrobna sredstva, međutim nisu sva prikladna za upotrebu na tekstilijama. Kada se nanose na površinu tekstilija antimikrobna sredstva mogu djelovati na dva načina: difuzijom i kontaktom. Difuzijski agens djeluje migracijom, tj. aktivno sredstvo se širi površinom tekstilija i na taj način inhibira rast mikroorganizama. Kontaktni agensi za razliku od migrirajućih moraju doći u izravni kontakt s mikroorganizmima kako bi bili učinkoviti. Kada se primjenjuje na tekstilijama važno je da antimikrobni tretman ispuni nekoliko osnovnih zahtjeva - mora biti siguran za potrošača što se postiže korištenjem niskotoksičnih supstanci, ne smije uzrokovati alergije ili iritacije na koži, ne smije negativno utjecati na svojstva ili izgled tekstilije i treba biti što otporniji na procese pranja (Laird i Riley, 2016).

Idealan antimikrobni tretman tekstilija trebao bi zadovoljiti brojne zahtjeve:

- učinkovitost protiv širokog spektra bakterijskih i fungalnih vrsta, ali istodobno niska toksičnost za potrošače;
- tekstilni proizvodi tretirani antimikrobnim sredstvima moraju prije stavljanja na tržište zadovoljiti testove citotoksičnosti, iritacije i osjetljivosti;
- završna obrada treba biti otporna na pranje, kemijsko čišćenje i glačanje;

- modifikacija ne bi trebala negativno utjecati na kvalitetu ili izgled tekstilija;
- završna obrada bi trebala biti ekonomična i ne proizvoditi štetne tvari za proizvođača i okoliš (Gao i Cranston, 2008).

Daljnje razmatranje je da antimikrobna obrada tekstilija ne bi trebala ubiti nepatogenu mikrofloru kože koja je važna za zdravlje jer snižava pH površine kože i na taj način stvara nepovoljno okruženje za rast patogenih bakterija (Gao i Cranston, 2008).

2.3.1. Antimikrobni agensi

Antimikrobna sredstva ili inhibiraju rast ili ubijaju mikroorganizme. Gotovo sva antimikrobna sredstva koja se koriste na komercijalnim tekstilijama, npr. srebro, triklozan, poliheksametilen bigvanid (PHMB) i kvarterni amonijevi spojevi su biocidi (Gao i Cranston, 2008). Ti se učinci ispoljavaju na različite načine ovisno o njihovoj kemijskoj strukturi i prirodi te afinitetu prema određenim ciljnim mjestima unutar mikroorganizma (Morais i sur., 2016). Odnose se na uništavanje ili inhibiciju sinteze stanične stjenke koja je ključna za život i preživljavanje bakterijskih vrsta, inhibiciju funkcije stanične membrane, inhibiciju sinteze proteina, inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina uzrokovanu interferiranjem antimikrobnih agenasa s komponentama uključenima u procese sinteze DNK ili RNK te inhibiciju ostalih metaboličkih procesa neophodnih za opstanak stanica (Gao i Cranston, 2008; Morais i sur., 2016).

Kvarterni amonijevi spojevi su kationski agensi koji u otopini nose pozitivan naboj na N atomu te se obično pričvršćuju na površinu anionskih vlakana (poliester, pamuk, najlon i vuna) ionskom interakcijom. Antimikrobno djelovanje posljedica je interakcije s negativno nabijenom staničnom membranom mikroorganizama što rezultira oštećenjem stanične membrane, denaturacijom proteina i inhibicijom sinteze DNK (Periolatto i sur., 2017). Učinkoviti su protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, gljiva i određenih vrsta virusa te se široko primjenjuju u industriji (Simončič i Tomšič, 2010). Triklozan je sintetički klorirani bisfenol koji nije ioniziran u otopinama što poboljšava njegovu otpornost na ispiranje. Može djelovati protiv gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija te protiv nekih gljiva i virusa na način da blokira biosintezu lipida i tako sprječava mikrobnog rast (Periolatto i sur., 2017). PHMB je polikationski amin čije je antibakterijsko djelovanje rezultat elektrostatskih i hidrofobnih interakcija s mikrobnim membranama što rezultira oštećenjima membrane i smrću stanica (Zhao i sur., 2016). Metali, oksidi ili soli metala na bazi srebra, bakra, cinka ili kobalta, imaju snažan biocidni učinak zahvaljujući redukcijom potencijalu. Ovi spojevi mogu se vezati na O, N ili S ligande donora prisutne u stanica mikroorganizama,

izazivajući oksidacijski stres, oštećujući stanične proteine, lipide i DNK. Najviše se upotrebljava srebro zbog širokog spektra djelovanja na bakterije poput *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* i *K. pneumoniae*. Uglavnom se primjenjuje u obliku soli iako u posljednje vrijeme, primjena u obliku nanočestica dobivena sol-gel tehnologijom je sve više u središtu interesa za srebro, CuO, ZnO i TiO₂ zbog veće površine, veće topljivosti i bržeg oslobađanja metalnih iona, što rezultira snažnijim antimikrobnim učinkom (Periollato i sur., 2017).

2.3.1.1. Kitozan

Kitozan je modificirani biopolimer koji se sastoji od D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina povezanih β-1,4-glikozidnom vezom (slika 1), a dobiva se iz hitina procesom deacetilacije. Glavni komercijalni izvori hitina i kitozana su otpadni produkti morskih organizama poput egzoskeleta rakova, škampa i jastoga, a nalazimo ga u obliku granula, listića i praha (Younes i Rinaudo, 2015). Deacetilacija se odnosi na postupak uklanjanja acetilnih skupina iz hitina i supstituciju reaktivnih amino skupina, a stupanj deacetilacije (engl. *deacetylation degree*, DD) određuje sadržaj slobodnih amino skupina u strukturi. DD se smatra važnim svojstvom u kitozanu jer utječe na kemijska i biološka svojstva kitozana (tablica 1) (Shirvan i sur., 2019).

Tablica 1. Kemijska i biološka svojstva kitozana (Shirvan i sur., 2019).

Biološka svojstva	Kemijska svojstva
biorazgradivost, biokompatibilnost, netoksičnost	linearni poliamin
inhibicija rasta bakterija	reaktivne amino skupine
regenerativni učinak na vezivno tkivo	dostupne reaktivne hidroksilne skupine
hemostatska, fungicidna, spermicidna i antitumorska svojstva	kelira metalne ione

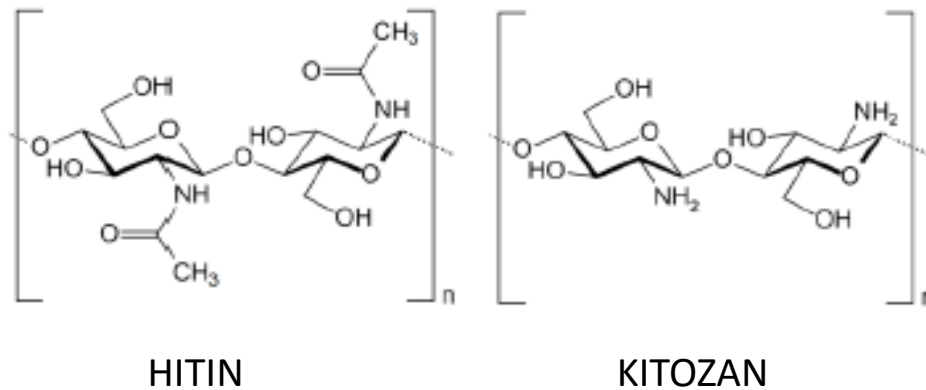
Biorazgradivost, biokompatibilnost i niska toksičnost čine kitozan idealnim antimikrobnim agensom. Predloženi mehanizam antimikrobnog djelovanja kitozana je elektrostatska interakcija između pozitivno nabijenog kitozana i negativno nabijene stanične membrane bakterija i gljiva (Shirvan i sur., 2019). Upravo je zbog svoje antimikrobne aktivnosti proučavan za upotrebu kod tekstilija i to uglavnom za medicinske svrhe. Najčešće se koristi za doradu vlakna pamuka, poliestera i vune, a pokazao je antimikrobno djelovanje protiv

širokog spektra mikroorganizama, uključujući gljive, alge i neke bakterije (Morais i sur., 2016). Zabilježeno je nekoliko istraživanja koja pokazuju djelotvornost kitozana protiv raznih bakterija i gljiva na tekstilijama. Glavni fokus kitozana kao antimikrobnog sredstva bio je na pamučnoj tekstiliji. Da bi se poboljšala trajnost obrade tekstilija kitozonom upotrebljavaju se sredstva za umrežavanje poput dimetilol-dihidroksietilen uree (DMDHEU), limunske kiseline, 1,2,3,4-butantetrakarboksilne kiseline (BTCA), glutaril dialdehida, koja povezuju kitozan i pamuk pomoću hidroksilnih skupina radi postizanja antimikrobnih svojstava pamučne tekstilije (Shirvan i sur., 2019). El-tahlawy i suradnici (2005) tretirali su pamučne tekstilije s dva različita umrežena agensa u prisutnosti kitozana da bi se tekstiliji osigurala antimikrobna svojstva uklapanjem kitozana u strukturu celuloze. Tretirane pamučne tekstilije pokazale su antimikrobno djelovanje širokog spektra protiv ispitivanih gram-pozitivnih, gram-negativnih bakterija i gljiva.

Wimardani i suradnici (2012) ispitivali su citotoksičan učinak kitozana različite molekularne mase (engl. *molecular weight*, MW) na tri stanične linije karcinoma skvamoznih stanica ušne šupljine (engl. *oral squamous cell carcinoma*, OSCC) -humane stanične linije skvamoznog epitela karcinoma jezika (HSC-3, HSC-4), humane stanične linije skvamoznog epitela karcinoma desni (Ca9-22) te na HaCaT staničnoj liniji *MTT* metodom. Obje vrste kitozana inducirale su proliferaciju HaCaT stanica u koncentracijama koje su pokazale citotoksične učinke na HSC-3 i Ca9-22 stanice. Konkretno, HaCaT stanice tretirane kitozonom visoke molekularne mase (engl. *high molecular weight chitosan*, HMWC) u koncentraciji $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ pokazale su dvostruko veću proliferativnu aktivnost u usporedbi s netretiranim stanicama. Suprotno tome, ni kitozan niske molekularne mase (engl. *low molecular weight chitosan*, LMWC) ni HMWC nije inducirao proliferaciju OSCC stanica. Ovo istraživanje pokazuje da je citotoksični učinak kitozana u negativnoj korelaciji s molekularnom masom. Kitozan pokazuje selektivnu toksičnost za OSCC stanice, pa čak i suprotno djelovanje na stanične linije koje nisu karcinomi.

Antimikrobna sposobnost kitozana ovisna je o intrinzičnom faktoru i vanjskim uvjetima, a najviše o molekularnoj masi kitozana te stupnju polimerizacije, stupnju deacetilacije, pH medija te tipu mikroorganizma (Morais i sur., 2016). Shin i suradnici (2001) ispitivali su učinak MW kitozana na antimikrobno djelovanje pamučnih tekstilija tretiranih kitozonom. Otkriveno je da se antimikrobna aktivnost obrađenih tekstilija povećava porastom MW kitozana. Zhang i suradnici (2003) ispitivali su učinak koncentracije, MW i DD kitozana na antibakterijsku aktivnost na *E. coli* i *B. subtilis*. Uočeno je da se povećanjem MW i DD povećava antibakterijsko djelovanje kitozana.

Glavni nedostaci primjene kitozana kao antimikrobnog sredstva za tekstilije je ovisnost njegove aktivnosti o pH i temperaturi (Morais i sur., 2016). Kitozan pokazuje slabu topljivost pri pH iznad 6,5 zbog gubitka kationske prirode. Dakle, njegovo antimikrobno djelovanje prisutno je u kiselim uvjetima (Shirvan i sur., 2019). Također, tijekom skladištenja neka specifična svojstva kitozana poput viskoznosti i MW mogu se mijenjati ovisno o temperaturi što utječe na njegovu učinkovitost kao biocida (Morais i sur., 2016).



Slika 1. Kemijska struktura hitina i kitozana (Younes i Rinaudo, 2015)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biološki materijali

U ovom radu korištena je monoslojna stanična linija humanih keratinocita, HaCaT.

3.1.2. Kemikalije

Korištene su slijedeće kemikalije tijekom rada:

- DMEM-HG, basic, CLS, Eppelheim, Njemačka
- FBS (fetalni goveđi serum), GIBCO, SAD
- 0,25 % tripsin-EDTA, GIBCO, SAD
- *Trypan blue* boja, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- *MTT*, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- dimetil sulfoksid (DMSO), Kemika, Zagreb
- PBS (engl. *Phosphate Buffer Saline*) pufer
- Subitol MFL
- Felosan NOF
- Natrijev hipofosfit pentahidrat (SHP)
- ECE-fosfatni detergent

3.1.3. Otopine i puferi

Sastav DMEM-HG medija prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Sastav medija DMEM-HG

Aminokiseline	Sastojci	Koncentracija (g L⁻¹)
	L-Arginin hidroklorid	84
	L-Cistein dihidroklorid	62,6
	L-Glutamin	584
	L-Glicin	30
	L-Histidin hidroklorid ×H ₂ O	42
	L-Izoleucin	105
	L-Leucin	105
	L-Lizin hidroklorid	146
	L-Metionin	30
	L-Fenilalanin	66
	L-Serin	42
	L-Tirozin dinatrij x 2H ₂ O	103,79
	L-Treonin	95
	L-Triptofan	16
	L-Valin	94
Vitamini	D-Ca pantotenska kiselina	4
	Folna kiselina	4
	Kolin klorid	4
	<i>Myo</i> -inozitol	7,2
	Niacinamid	4
	Piridoksin hidroklorid	4,04
	Riboflavin	0,4
	Tiamin hidroklorid	4
Anorganske soli	CaCl ₂	200
	Fe(NO ₃) ₃ ×9H ₂ O	0,1
	MgSO ₄	97,67
	KCl	400
	NaHCO ₃	3700
	NaCl	6400
	Na ₂ HPO ₄	109
Ostali sastojci	D-Glukoza	4500
	Na fenol crvenilo	15,9
	Na piruvat	110

Sastav 0,4 %-tne otopine *Trypan blue*:

Sastojci Količina

Trypan blue 0,08 g

PBS pufer 20 mL

Ishodna otopina MTT:

MTT 25 g

PBS 5 mL

Sterilno profiltrirati.

PBS pufer

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
dH ₂ O	do 1000 mL

3.1.4. Oprema i uređaji

Tijekom rada korištena je slijedeća oprema i uređaji:

- inkubator s kontroliranom atmosferom IR 1500, Automatic CO₂, Flow Laboratories, Velika Britanija
- komora za sterilan rad (laminar) Twin 30, Gelaire Flow Laboratories, Velika Britanija
- inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- svjetlosni mikroskop, LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright-Line, Njemačka

3.2. METODE RADA

3.2.1. Uzgoj monoslojne HaCaT stanične linije

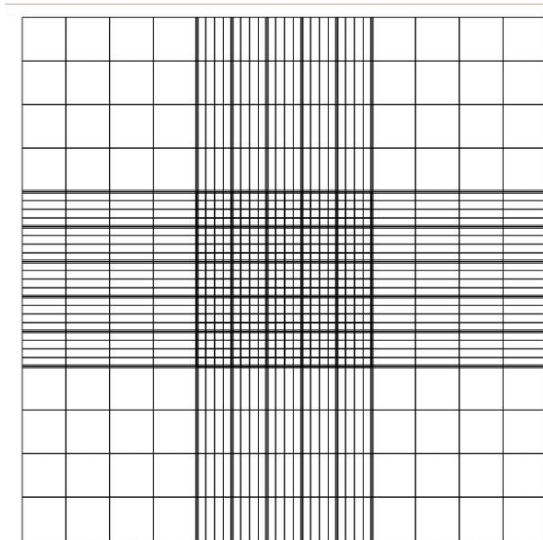
HaCaT stanice uzgajane su u T-bocama u uvjetima kontrolirane atmosfere (5% CO₂ i 95% zraka) na temperaturi od 37°C u inkubatoru. Manipulacija stanicama vršila se u komori za sterilan rad – laminaru. Budući da HaCaT stanična linija raste u monosloju, stanice je prije presađivanja potrebno odvojiti od površine T-boce pomoću proteolitičkog enzima tripsina. Najprije se dodaje 1 mL tripsina da bi se stanice isprale od ostataka seruma i medija, a zatim još 1 mL da bi se stanice odvojile od površine T-boce. T-boca sa stanicama se stavlja u inkubator 5 min. Kada se stanice odvoje od podloge, slijedi resuspendiranje pipetom u novom mediju za uzgoj (9 mL medija za uzgoj s 10% FBS-a). Slijedi brojanje stanica u Fuchs-Rosenthalovoj komorici te se suspenzija stanica razrjeđuje dodatkom svježeg medija za uzgoj na koncentraciju od 1×10^5 st mL⁻¹.

3.2.1.1. Trypan blue metoda

Ova metoda koristi se za određivanje broja živih i/ili mrtvih stanica u staničnoj suspenziji. Temelji se na principu da žive stanice imaju očuvanu staničnu membranu koja sprječava *Trypan blue* boju da uđe u stanicu, dok mrtve stanice to ne mogu. Žive stanice neće biti obojane, dok će mrtve stanice imati plavo obojenu citoplazmu (Aslantürk, 2017).

Stanice se broje u Fuchs-Rosenthalovoj komorici (slika 2). Fuchs-Rosenthalova komorica podijeljena je u 16 kvadratića, od čega se broje unutrašnja četiri i to tako da se uvijek broje sve stanice unutar kvadratića te stanice na donjem i desnom rubu kako bi se izbjeglo brojenje istih stanica više puta. 20 μL suspenzije stanica se dobro pomiješa s 20 μL *Trypan blue* boje te se sve dobro resuspendira. 20 μL suspenzije nanese se na Fuchs-Rosenthalovu komoricu i pod svjetlosnim mikroskopom broje se žive (neobojene) i mrtve (plavo obojene) stanice. Mrtve stanice se oboje zbog povećane propusnosti membrana. Ukupan broj stanica odredi se prema formuli:

$$\text{Ukupan broj stanica} = \text{srednja vrijednost izbrojenih stanica} \times 2 \times 5 \times 10^3 [\text{stanica mL}^{-1}]$$



Slika 2. Fuchs-Rosenthal-ova komorica (Microbehunter Microscopy, 2010)

Ova metoda je jednostavna, jeftina i dobar pokazatelj integriteta stanične membrane, a mrtve stanice se oboje plavo vrlo kratko nakon izlaganja boji. Nedostatak je što može doći do pogreške u brojanju koju možemo pripisati lošoj disperziji stanica, gubitku stanica tijekom disperzije, netočnom razrjeđivanju stanica te prisustvu mjehurića zraka u komorici. Također, ova metoda se ne može koristiti za razlikovanje živih stanica koje su izgubile stanične

funkcije, stoga nije dovoljno osjetljiva za upotrebu u ispitivanju citotoksičnosti *in vitro* (Aslantürk, 2017).

3.2.2. Priprema tekstilija

Za ispitivanje citotoksičnosti korištene su tekstilije načinjene od pamuka te kombinacije pamuka i poliestera koje su prethodno tretirane antimikrobnim agensom u svrhu korištenja u zdravstvenim i bolničkim ustanovama. Impregnacija tekstilija provedena je na Tekstilno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Nanošenje kitozana na tekstilije provedeno je na džigeru u dva koraka:

1. Luženje i mercerizacija na 25°C , prolazak 10 puta kroz kupku koja sadrži:
 - 20% NaOH
 - 8 g L⁻¹ Subitol MFL
2. Implementacija kitozana na 25°C, prolazak 10 puta kroz drugu kupku koja sadrži:
 - 10 g L⁻¹ kitozana u prahu
 - 1 g L⁻¹ Felosan NOF
 - 68 g L⁻¹ SHP
 - 70 g L⁻¹ limunske kiseline

Nakon prvog koraka, tekstilije su isprane prvo vrućom, a zatim hladnom vodom nakon čega su neutralizirane 0,1 M octenom kiselinom i isprane do pH 7. Nakon drugog koraka, tekstilije su obilno isprane i podvrgnute procesu sušenja. Sušenje i termokondenzacija provelo se na rasteznom sušioniku marke Benz. Sušenje je provedeno na 100°C u trajanju od 2 min, a termokondenzacija na 150°C u trajanju od 4 min.

Nakon sušenja i termokondenzacije, tekstilije su podvrgnute ciklusu pranja (5 puta) u skladu sa standardom EN ISO 6330:2012: tekstil – postupci pranja i sušenja u kućanstvu za ispitivanje tekstila s ciljem određivanja postojanosti i kvalitete obrade. Postupak pranja proveden je s ECE-fosfatnim deterdžentom čiji je sastav prikazan u tablici 3 dok se u tablici 4 nalazi prikaz uzoraka tekstilija te način njihove obrade.

Uvjeti pranja: • omjer kupelji: 1:20

- vrijeme pranja: 40 min
- temperatura: 60 °C
- koncentracija deterdženta: 2,5 g L⁻¹

Tablica 3.Sastav ECE-fosfatnog detergenta (preuzeto s deklaracije proizvoda)

sastav	maseni udio %
linearni natrijev alkilbensulfonat (srednja duljina alkanskog lanca C _{11,5})	8,0 ± 0,02
etoksilirani masni alkohol (14 EO)	2,9 ± 0,02
natrijev sapun, duljina lanca C ₁₂ – C ₁₆ : 13 % to 26 % C ₁₈ – C ₂₂ : 74 % to 87 %	3,5 ± 0,02
natrijev tripolifosfat	43,7 ± 0,02
natrijev silikat (SiO ₂ : Na ₂ O= 3,3 : 1)	7,5 ± 0,02
magnezijev silikat	1,9 ± 0,02
karboksimetilceluloza (CMC)	1,2 ± 0,02
etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), natrijeva sol	0,2 ± 0,02
natrijev sulfat	21,2 ± 0,02
voda	9,9 ± 0,02
ukupno	100

Tablica 4. Uzorci tekstilija i način obrade

Uzorak	Obrada
CO	netretirana pamučna tekstilija
HIP_CO_8_5W	pamučna tekstilija tretirana s 8% NaOH i obrađena u kupelji s kitozonom, oprana 5 puta
HIP_CO_20_5W	pamučna tekstilija tretirana s 20% NaOH i obrađena u kupelji s kitozonom, oprana 5 puta
PES/CO	netretirana pamuk/poliester tekstilija
HIP_PES/CO_8_5W	pamuk/poliester tekstilija tretirana s 8% NaOH i obrađena u kupelji s kitozonom, oprana 5 puta
HIP_PES/CO_20_5W	pamuk/poliester tekstilija tretirana s 20% NaOH i obrađena u kupelji s kitozonom, oprana 5 puta

3.2.3. Priprema tekućih ekstrakata tekstilija

Uzorci tekstilija veličine 60 cm² (s Tekstilno-tehnološkog fakulteta) presavijaju se i stavljaju u Falcon epruvetu u kojoj se nalazi 10 mL medija za uzgoj koji sadrži 10% FBS-a. Nakon toga uzorci se stavljaju na tresilicu na 2 h pri sobnoj temperaturi, a zatim se premještaju u inkubator na dodatna 22 h pri temperaturi od 37°C. Nakon isteka 24 h uzorak tekstilije izvadi se iz Falcon epruvete te se otopina sterilno filtrira 3 puta pomoću filtera veličine pora 0,22µm. Filtrat ujedno predstavlja ishodnu otopinu koju koristimo za pripremu razrijeđenja dodatkom medija za uzgoj s 10% FBS-a. Različita razrijeđenja ishodnih otopina prikazana su u tablici 5.

Tablica 5. Razrijeđenja ishodnih otopina

I.O.	ishodna otopina
SM	serum-medij otopina za uzgoj HaCaT stanične linije
2x	1600 µL I.O. + 1600 µL SM
4x	800 µL I.O. + 2400 µL SM
8x	400 µL I.O. + 2800 µL SM
16x	200 µL I.O. + 3000 µL SM
32x	100 µL I.O. + 3100 µL SM

3.2.4. Određivanje citotoksičnosti antimikrobnih tvari kojima su impregnirane tekstilije *MTT* metodom

MTT je kolorimetrijska metoda koja se koristi za određivanje metaboličke aktivnosti stanica kao pokazatelja stanične vijabilnosti, proliferacije i citotoksičnosti (Merck KGaA, 2020). Temelji se na redukciji žute tetrazolijeve soli (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromida ili *MTT*-a) u ljubičaste kristale formazana kao rezultat aktivnosti mitohondrijskih dehidrogenaza. Broj preživjelih stanica nakon inkubacije stanične kulture sa citotoksičnom tvari, a nakon bojanja *MTT* reagensom proporcionalan je sadržaju obojenog formazana kojeg odredimo spektrofotometrijski. Vijabilnost se izražava kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrole (Denizot i Lang, 1986). Ova metoda je jednostavna, sigurna i visoko reproducibilna te se primjenjuje za određivanje stanične vijabilnosti i u testovima citotoksičnosti. Nedostaci su netopljivost formazana u vodi i nakupljanje ljubičastih kristala u stanicama. Stoga je prije mjerenja apsorbancije potrebno upotrijebiti organsko otapalo kao što su dimetilsulfoksid (DMSO) ili izopropanol za otapanje kristala (Aslantürk, 2017).

Postupak se sastoji od naciepljivanja stanične kulture i tretmana ispitivanim ksenobiotikom, tretmana *MTT*-om i inkubacije nakon koje se nastali kristali formazana otapaju u organskom otapalu. Intenzitet nastale boje određuje se spektrofotometrijski pri 570 i 630 nm uz slijepu probu. Na kraju se uspoređuje i računa postotak inhibicije u staničnom rastu nastalog djelovanjem ksenobiotika te određuje IC vrijednost (doza kod koje je došlo do određenog postotka inhibicije staničnog rasta odnosno vijabilnosti stanica).

3.2.4.1. Postupak određivanja stanične vijabilnosti MTT metodom

200 μL suspenzije HaCaT stanica u koncentraciji od 1×10^5 st mL^{-1} otpipetiramo u svaku jažicu mikrotitarske pločice s 96 jažica. Stanice se inkubiraju 24 h nakon čega se uklanja medij u kojemu su rasle. Stanice se tretiraju različitim razrijeđenjima ishodne otopine ekstrakta tekstilija na način da se u svaku jažicu doda 200 μL pripremljenog razrijeđenja. Kao kontrola koriste se stanice koje rastu u svježem mediju za uzgoj uz dodatak 10% FBS-a. Nakon tretmana slijedi inkubacija u trajanju od 48 h i 72 h. Nakon inkubacije u svaku jažicu namikrotitarskoj pločici dodaje se 20 μL otopine *MTT*-a. Stanice se inkubiraju 3h na 37°C . Nakon isteka vremena medij se vadi iz jažica te se dodaje 200 μL DMSO-a u kojemu se otapaju kristali formazana pri čemu se razvija ljubičasto obojenje čiji intenzitet se mjeri spektrofotometrijski na valnoj duljini od 540 nm u odnosu na slijepu probu.

3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (\bar{x}) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

S pripadajućim standardnim pogreškama $S_{\bar{x}}$:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}$$

N = ukupan broj uzoraka u skupini

x_i = pojedinačne vrijednosti uzoraka

Statistička analiza provedena je Studentovim t -testom izračunavajući t vrijednost prema izrazu:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{\bar{x}_1}^2 + S_{\bar{x}_2}^2}}$$

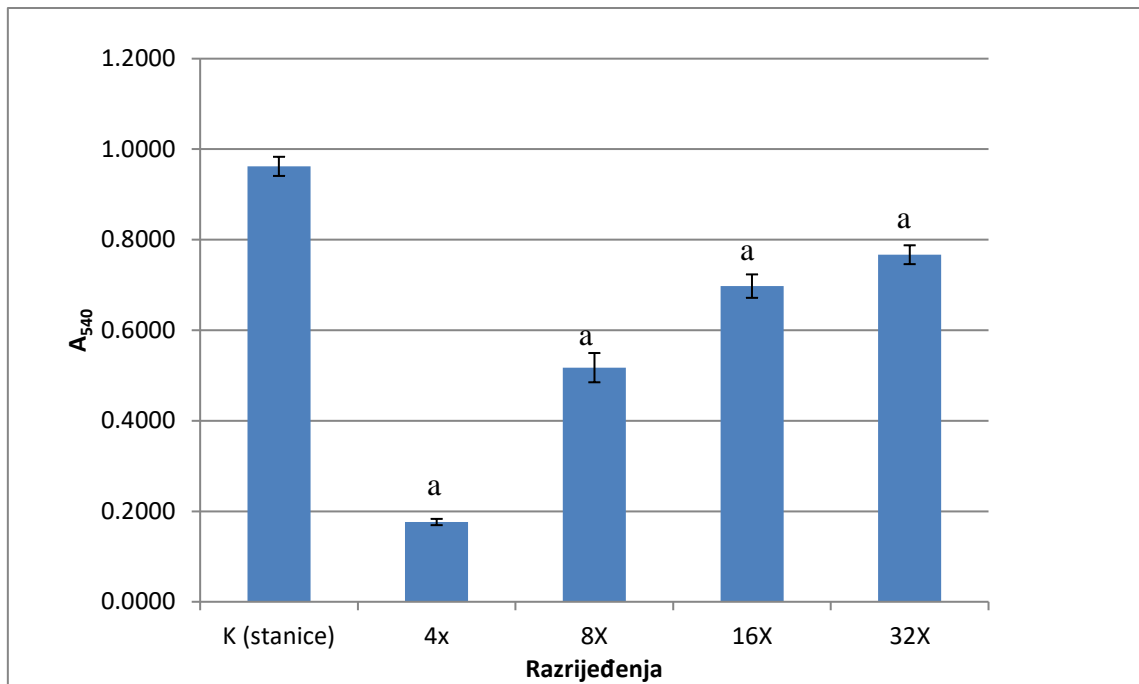
Statistički značajnim smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UČINAK EKSTRAKATA IZOLIRANIH IZ POLIESTER/PAMUK TEKSTILIJA KOJE SU TRETIRANE ANTIMIKROBNIM AGENSOM NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU HaCaT STANIČNE LINIJE ODREĐEN *MTT* METODOM

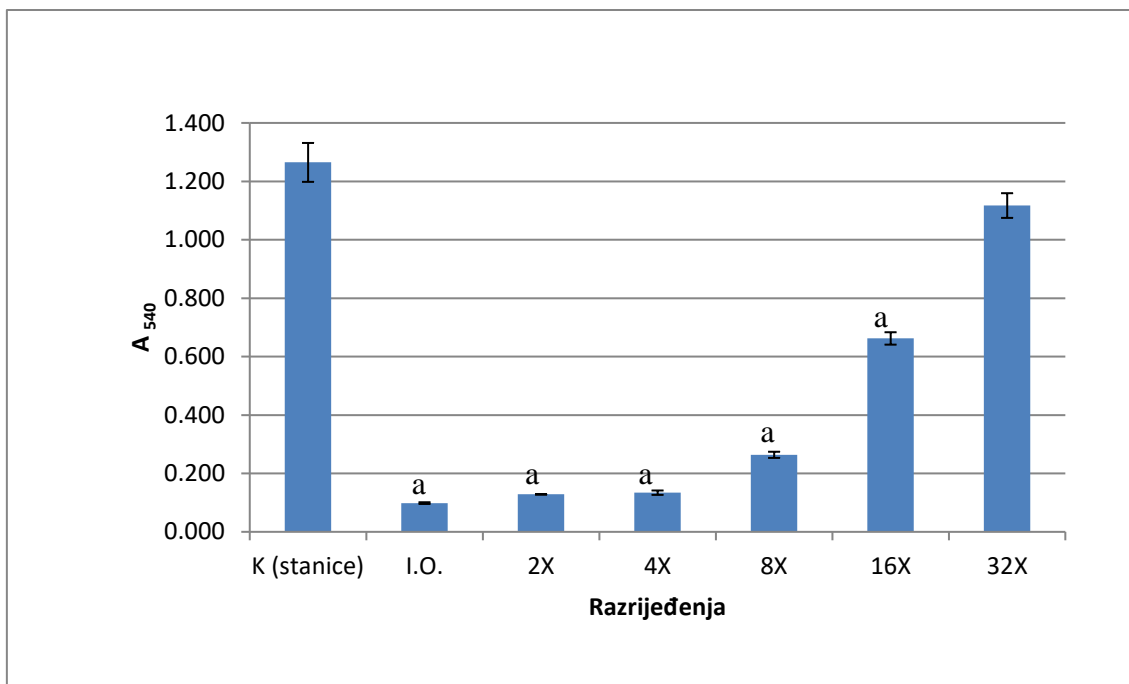
Citotoksični učinak različitih razrijeđenja (2x – 32x) ishodne otopine PES/CO (poliester/pamuk netretirana tekstilija), HIP_PES/CO_20_5W (poliester/pamuk tekstilija – luženje s 20%-tnim NaOH, oprana 5 puta, obrada s 10 g L⁻¹ kitozan; 70 g L⁻¹ limunska kiselina; 65 g L⁻¹ natrijev hipofosfit pentahidrat; 1 g L⁻¹ felosan NOP), HIP_PES/CO_8_5W (poliester/pamuk tekstilija – luženje s 8%-tnim NaOH, oprana 5 puta, obrada s 10 g L⁻¹ kitozan; 70 g L⁻¹ limunska kiselina; 65 g L⁻¹ natrijev hipofosfit pentahidrat; 1 g L⁻¹ felosan NOP), CO (netretirana pamučna tekstilija), HIP_CO_8_5W (pamučna tekstilija - luženje s 8 %-tnim NaOH, oprana 5 puta, obrada s 10 g L⁻¹ kitozan; 70 g L⁻¹ limunska kiselina; 65 g L⁻¹ natrijev hipofosfit pentahidrat; 1 g L⁻¹ felosan NOP), HIP_CO_20_5W (pamučna tekstilija-luženje s 20 %-tnim NaOH, oprana 5 puta, obrada s 10 g L⁻¹ kitozan; 70 g L⁻¹ limunska kiselina; 65 g L⁻¹ natrijev hipofosfit pentahidrat; 1 g L⁻¹ felosan NOP) na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica određen je *MTT* metodom 48 h i 72 h nakon tretmana.

Učinak različitih razrijeđenja (4x – 32x) ishodne otopine (I.O.) koja je pripravljena namakanjem 60 cm² poliester/pamuk (PES/CO) tekstilije u 10 mL medija za uzgoj s 10% FBS-a na proliferaciju i vijabilnost HaCaT stanica određen *MTT* metodom 48 h nakon tretmana stanica prikazan je na slici 3. Primijećeno je statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje proliferacije i vijabilnosti stanica kod uzoraka tretiranih razrijeđenjima 4x – 32x u odnosu na kontrolni uzorak – netretirane stanice.



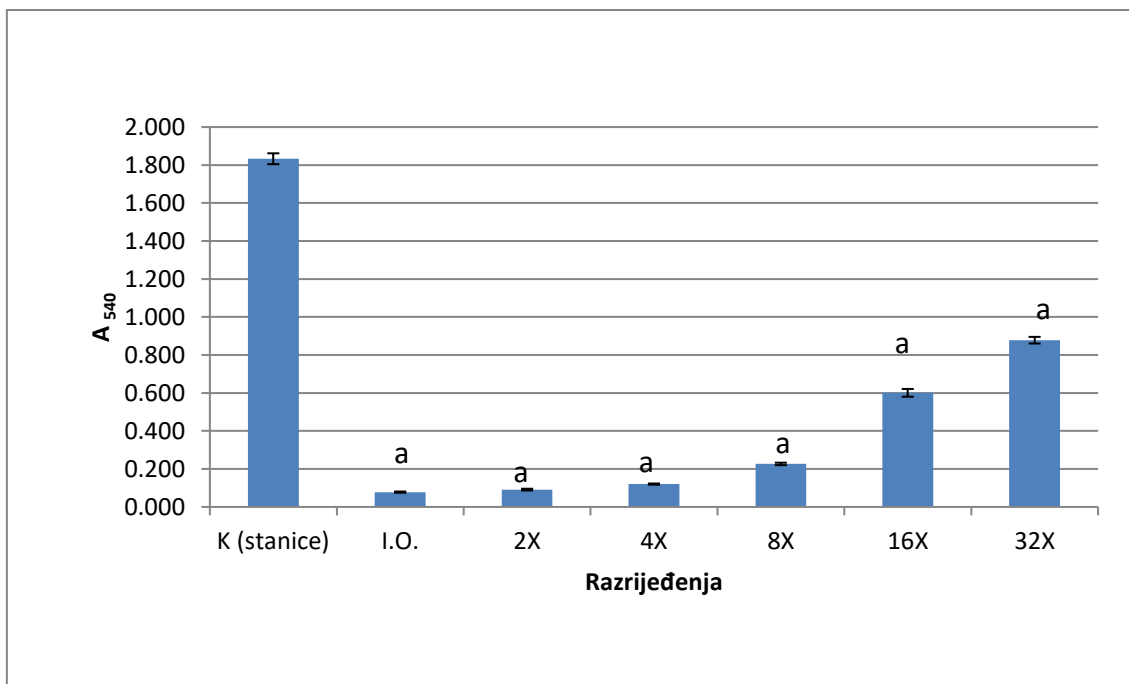
Slika 3. Vijabilnost HaCaT stanica 48 sati nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) PES/CO tekstilije u odnosu na kontrolne uzorke (K (stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.

Učinak različitih razrijeđenja (2x – 32x) ishodne otopine (I.O.) netretirane PES/CO tekstilije na proliferaciju i vijabilnost HaCaT stanica određen *MTT* metodom 72 h nakon tretmana stanica prikazan je na slici 4. Primijećeno je statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje vijabilnosti i proliferacije stanica kod uzoraka tretiranih nerazrijeđenom ishodnom otopinom (I.O.) netretirane PES/CO tekstilije te kod uzoraka tretiranih razrijeđenjima 2x – 16x. Vijabilnost stanica tretiranih otopinom razrijeđenom 32x iznosila je 88,33% u odnosu na kontrolni uzorak (netretirane stanice). Dulje vrijeme izloženosti stanica različitim ispitanim razrijeđenjima PES/CO tekstilije nije uzrokovalo dodatnu inhibiciju stanične vijabilnosti već je bila približno ista 48 i 72 sata nakon tretmana.



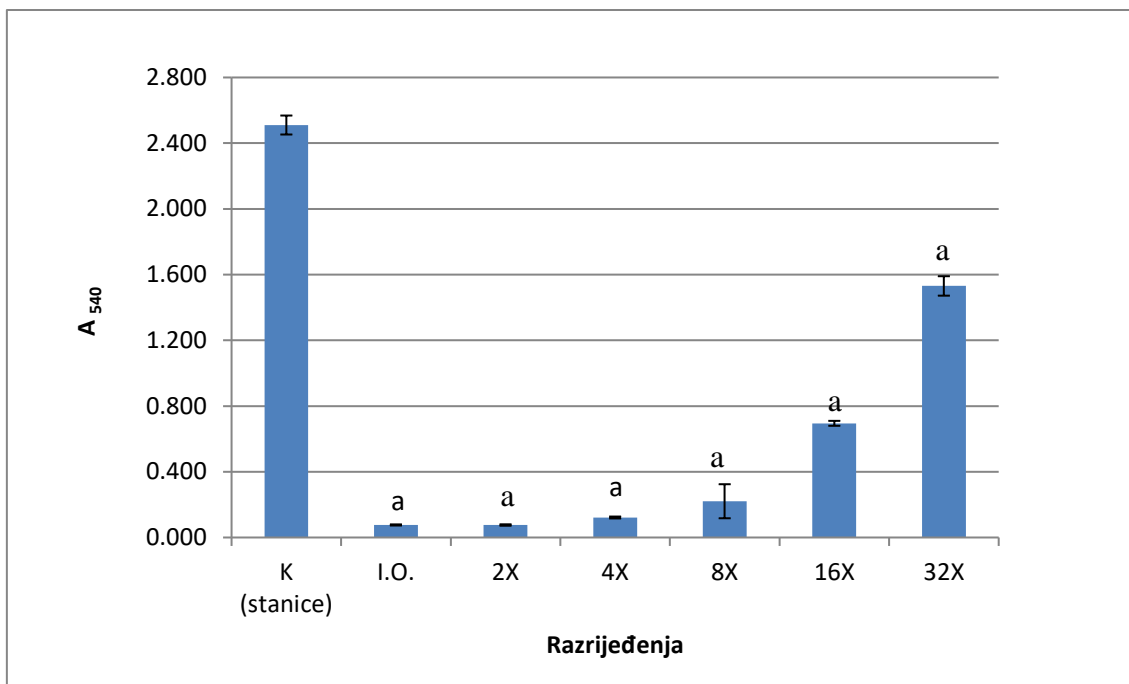
Slika 4. Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) PES/CO tekstilije u odnosu na kontrolne uzorke (K (stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.

Učinak na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica određen *MTT* metodom 48 h nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) tretirane i pet puta oprane poliester/pamuk (HIP_PES/CO_20_5W) tekstilije kod koje je luženje provedeno s 20% NaOH prikazan je na slici 5. Primijećeno je statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje vijabilnosti i proliferacije stanica kod tretmana stanica nerazrijeđenom ishodnom otopinom (I.O.) te kod svih ispitanih razrijeđenja (2x – 32x) u odnosu na kontrolu – netretirane stanice.



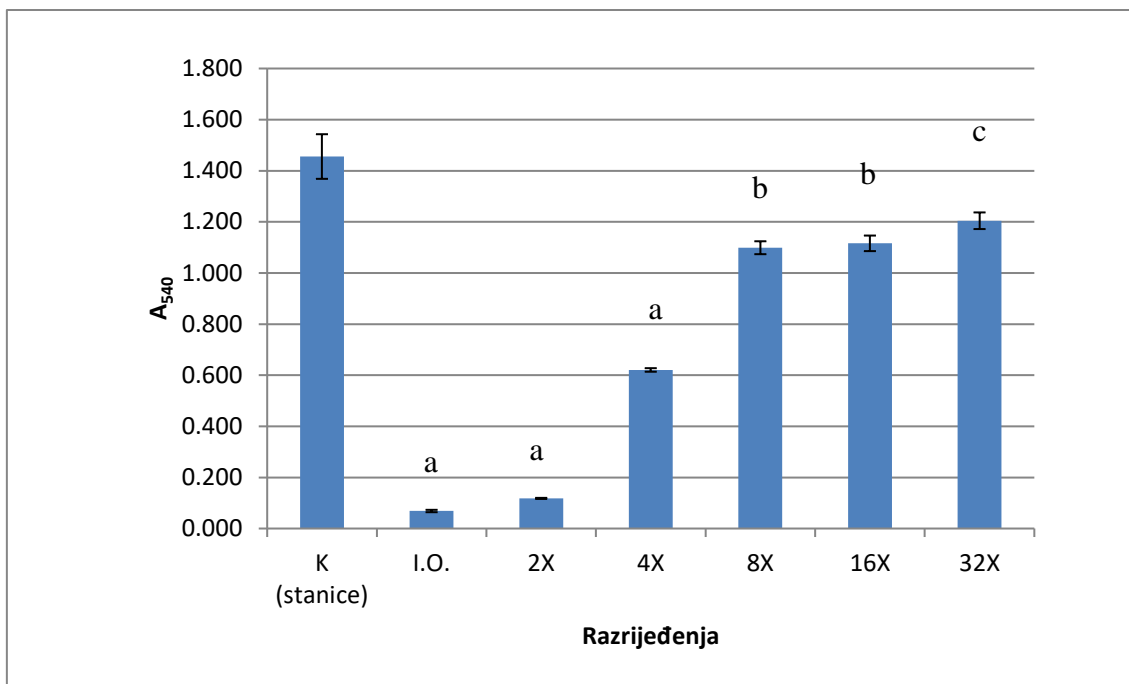
Slika 5. Vijabilnost HaCaT stanica 48 sati nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine tretirane i pet puta oprane HIP_PES/CO_20_5W tekstilije u odnosu na kontrolne uzorke (K (stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.

Prema rezultatima prikazanim na slici 6 vidljivo je da proliferacija i vijabilnost stanica značajno opada i 72 sata nakon tretmana različitim razrijeđenjima (2x – 32x) ishodne otopine (I.O.) tekstilije HIP_PES/CO_20_5W. Statistički značajno smanjenje ($p < 0,001$) uočeno je kod svih ispitanih razrijeđenja u odnosu na kontrolni uzorak. Također, kod uzoraka tretiranih razrijeđenjem 32x došlo je do porasta stanične vijabilnosti u odnosu na vijabilnost stanica tretiranih manjim razrijeđenjima te iznosi 60,98% u odnosu na kontrolni uzorak. Vrijeme inkubacije nije značajno utjecalo na povećanje inhibicije staničnog rasta već je ona bila približno ista 48 i 72 sata nakon tretmana.



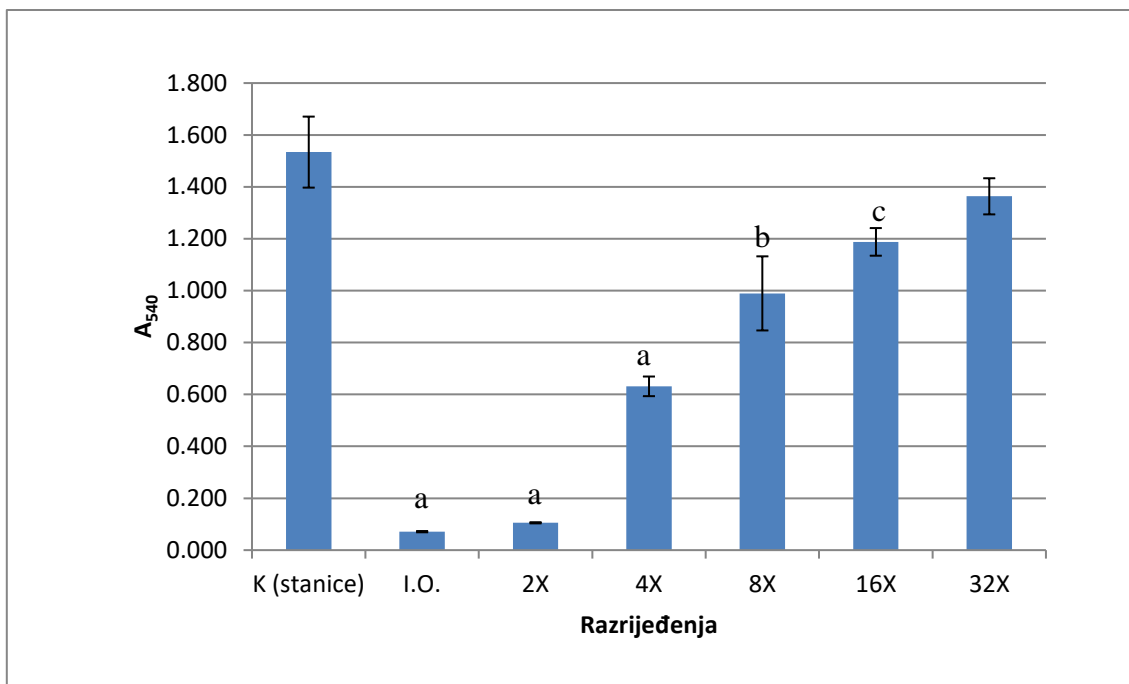
Slika 6. Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) tretirane i pet puta oprane HIP_PES/CO₂₀_5W tekstilije u odnosu na kontrolne uzorke (K (stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a*p*<0,001.

Na slici 7 prikazani su rezultati učinka tretmana za HIP_PES/CO₈_5W (5 puta oprana poliester/pamuk tekstilija kod koje je luženje provedeno s 8% NaOH) na proliferaciju i vijabilnost HaCaT stanica 48 h nakon tretmana. Statistički (*p*<0,001 -*p*<0,05) značajno smanjenje vijabilnosti stanica uočeno je kod svih ispitanih uzoraka.



Slika 7. Vijabilnost HaCaT stanica 48 sati nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) tretirane i pet puta oprane HIP_PES/CO_8_5W tekstilije u odnosu na kontrolne uzorke (K (stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,01$, ^c $p < 0,05$.

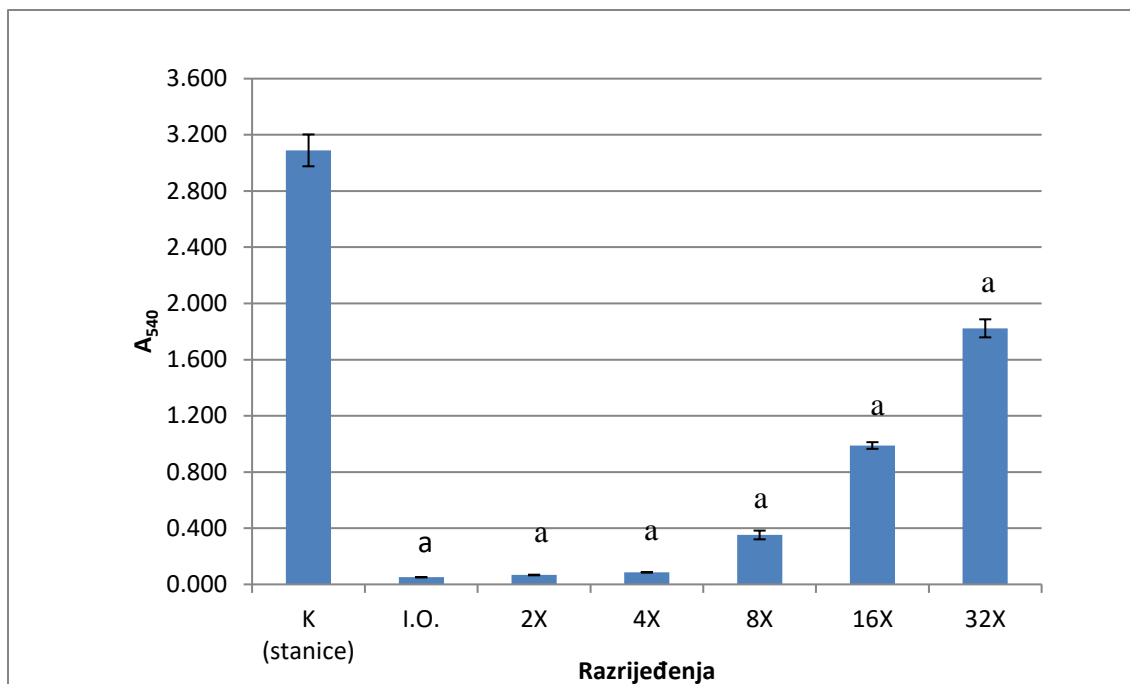
72 sata nakon tretmana stanica različitim razrijeđenjima HIP_PES/CO_8_5W tekstilije (slika 8) nije došlo do značajnih promjena u odnosu na vijabilnost i proliferaciju stanica 48 sati nakon tretmana (slika 7). Statistički značajno smanjenje vijabilnosti uočeno je kod uzoraka tretiranih nerazrijeđenom ishodnom otopinom (I.O.), razrijeđenjima 2x i 4x ($p < 0,001$), kod razrijeđenja 8x ($p < 0,025$) te kod razrijeđenja 16x ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolni uzorak.



Slika 8. Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) tretirane i pet puta oprane HIP_PES/CO_8_5W tekstilije u odnosu na kontrolne uzorke (K (stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,025$, ^c $p < 0,05$.

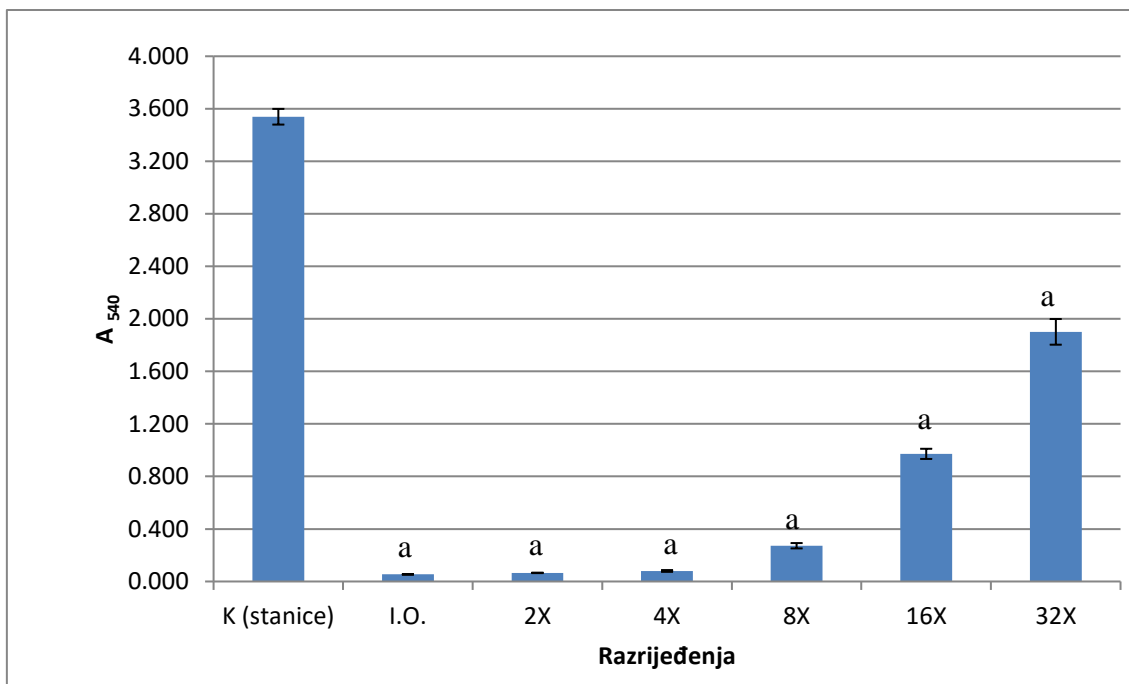
4.2. UČINAK EKSTRAKATA IZOLIRANIH IZ PAMUČNIH TEKSTILIJA KOJE SU TRETIRANE ANTIMIKROBNIM AGENSOM NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU HaCaT STANIČNE LINIJE ODREĐEN *MTT* METODOM

Učinak različitih razrijeđenja (2x – 32x) ishodne otopine (I.O.) pripremljene namakanjem 60 cm² pamučne tekstilije (CO) u 10 mL medija za uzgoj na proliferaciju i vijabilnost HaCaT stanica određen *MTT* metodom 48 h nakon tretmana stanica prikazan je na slici 9. Kod svih uzoraka primijećeno je statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje vijabilnosti i proliferacije u odnosu na kontrolu.



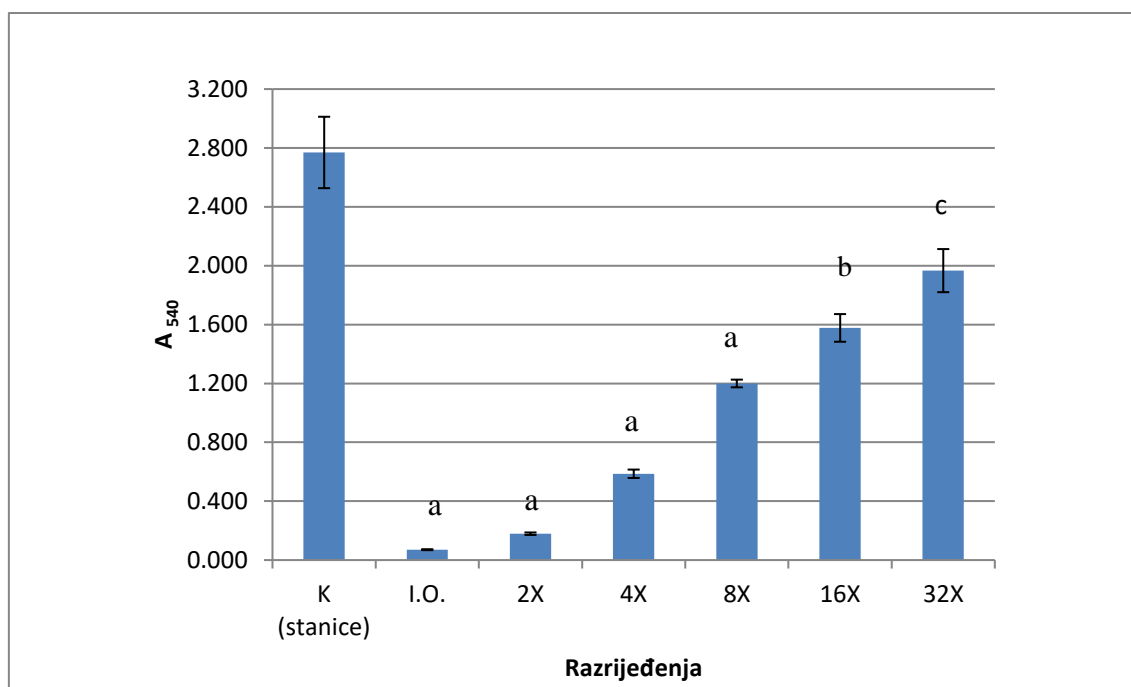
Slika 9. Vijabilnost HaCaT stanica 48 sati nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) netretirane pamučne tekstilije (CO) u odnosu na kontrolne uzorke (K (stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.

Na slici 10 prikazan je učinak različitih razrijeđenja ishodne otopine netretirane pamučne tekstilije na proliferaciju i vijabilnost HaCaT stanica 72 h nakon tretmana. Također je kod svih uzoraka došlo do statistički značajnog ($p < 0,001$) smanjenja stanične vijabilnosti i proliferacije u odnosu na kontrolu. Vrijeme inkubacije nije značajno utjecalo na povećanje inhibicije već je ona nakon 48 i 72 sata nakon tretmana bila približno ista.



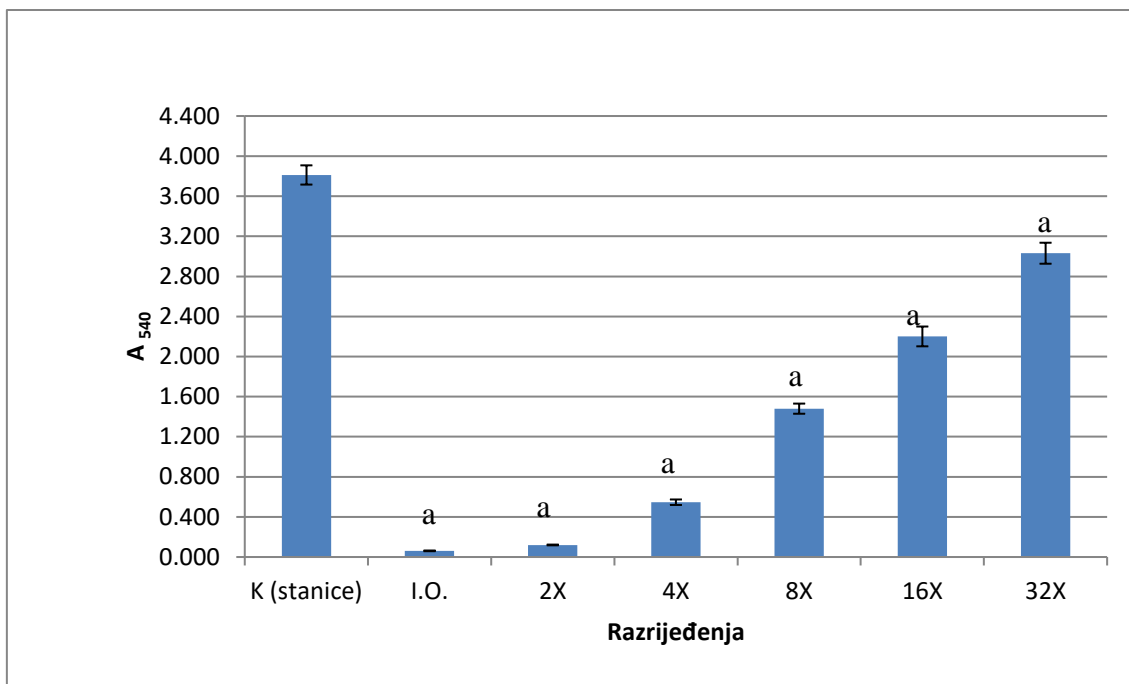
Slika 10. Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) netretirane pamučne (CO) tekstilije u odnosu na kontrolne uzorke (K (stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.

Na slici 11 vidljivo je da vijabilnost i stanična proliferacija statistički značajno padaju 48 h nakon tretmana stanica različitim razrijeđenjima ishodne otopine tekstilije HIP_CO_8_5W (5 puta oprana tekstilija kod koje je luženje provedeno s 8% NaOH) kod uzoraka tretiranih nerazrijeđenom ishodnom otopinom (I.O.) te razrijeđenjima 2x – 8x ($p < 0,001$) te kod uzoraka tretiranih razrijeđenjem 16x ($p < 0,005$) i 32x ($p < 0,025$).



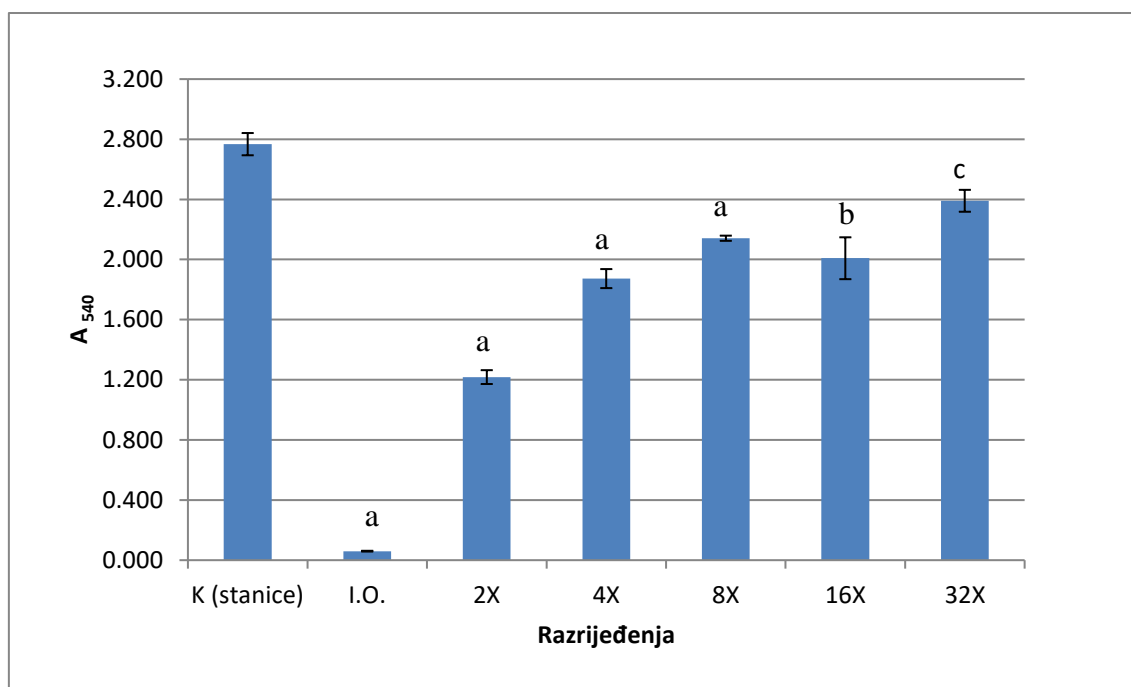
Slika 11. Vijabilnost HaCaT stanica 48 sati nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) tretirane i pet puta oprane pamučne tekstilije HIP_CO_8_5W u odnosu na kontrolne uzorke (K (stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,005$, ^c $p < 0,025$.

Na slici 12 prikazani su rezultati za HIP_CO_8_5W tekstiliju 72 h nakon tretmana HaCaT stanica. Kod svih uzoraka primijećeno je statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje stanične vijabilnosti i proliferacije u odnosu na kontrolu. Kod uzoraka tretiranih razrijeđenjem od 4x inhibicija staničnog rasta iznosila je 85,66%, kod razrijeđenja od 8x 61,17%, 16x 42,26% i 32x 20,49%. Vrijeme izloženosti nije značajno utjecalo na povećanje inhibicije staničnog rasta već je ona nakon 48 i 72 sata nakon tretmana stanica bila približno ista.



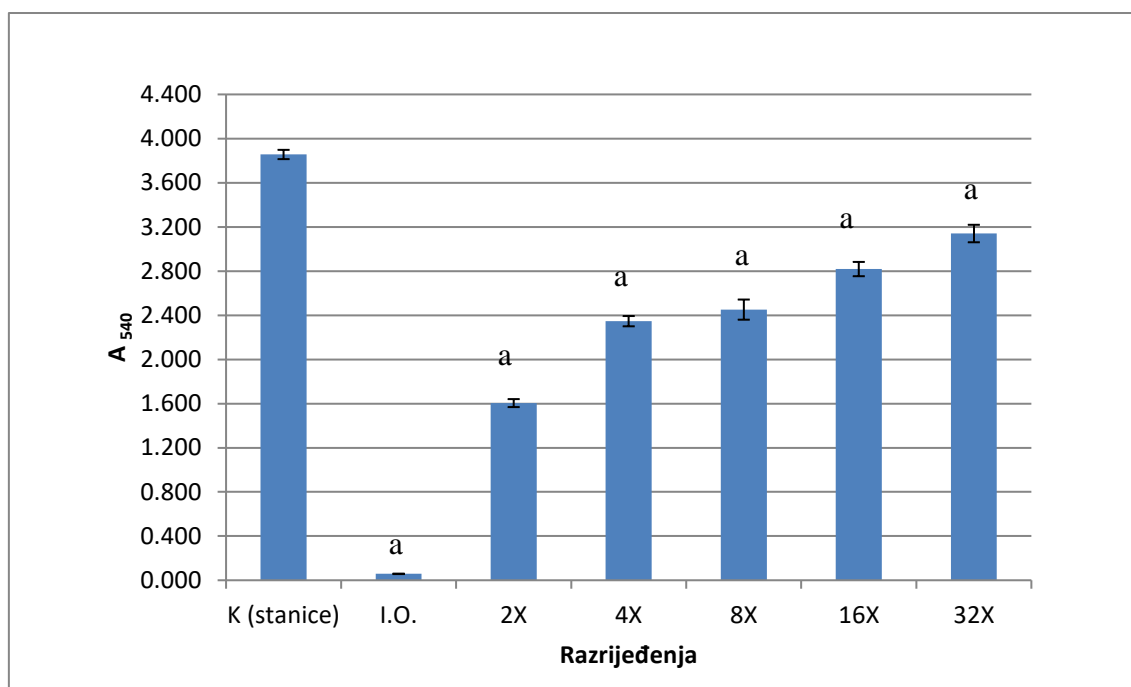
Slika 12. Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) tretirane i pet puta oprane pamučne tekstilije HIP_CO_8_5W u odnosu na kontrolne uzorke (K (stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.

Učinak različitih razrijeđenja ishodne otopine HIP_CO_20_5W (5 puta oprana tekstilija kod koje je luženje provedeno s 20% NaOH) 48 sati nakon tretmana na staničnu vijabilnost i proliferaciju prikazan je na slici 13. Primijećeno je statistički značajno smanjenje vijabilnosti kod uzoraka tretiranih nerazrijeđenom ishodnom otopinom te razrijeđenjima 2x – 8x ($p < 0,001$) te kod uzoraka tretiranih razrijeđenjem 16x ($p < 0,005$) i 32x ($p < 0,01$). Najveće smanjenje vijabilnosti stanica uočeno je kod uzoraka tretiranih nerazrijeđenom ishodnom otopinom (I.O.) te je vijabilnost iznosila svega 2,16% u odnosu na kontrolni uzorak. S porastom razrijeđenja ishodne otopine HIP_CO_20_5W tekstilije došlo je do povećanja stanične vijabilnosti te je ona kod uzoraka tretiranih razrijeđenjem od 32x iznosila 86,38% u odnosu na kontrolni uzorak.



Slika 13. Vijabilnost HaCaT stanica 48 sati nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) tretirane i pet puta oprane pamučne tekstilije HIP_CO_20_5W u odnosu na kontrolne uzorke (K (stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,005$, ^c $p < 0,01$.

Na slici 14 prikazan je učinak različitih razrijeđenja ishodne otopine HIP_CO_20_5W tekstilije 72 h nakon tretmana stanica. Kod svih uzoraka uočeno je statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje stanične vijabilnosti i proliferacije u odnosu na kontrolni uzorak. Također, najveće smanjenje vijabilnosti uočeno je kod uzoraka tretiranih nerazrijeđenom ishodnom otopinom (I.O.) te je vijabilnost iznosila svega 1,51% u odnosu na kontrolni uzorak. Dulje vrijeme izloženosti stanica različitim razrijeđenjima ishodne otopine HIP_CO_20_5W tekstilije nije značajno utjecalo na povećanje inhibicije staničnog rasta već je ona nakon 48 i 72 sata nakon tretmana bila približno ista.



Slika 14. Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) tretirane i pet puta oprane pamučne tekstilije HIP_CO_20_5W u odnosu na kontrolne uzorke (K (stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.

U literaturi nema puno istraživanja koja se bave ovom problematikom, ali HaCaT stanice koriste se kao test sustav za ispitivanje proliferacije keratinocita u velikom broju testova citotoksičnosti. Keratinociti su stanice koje su prve izložene djelovanju toksičnih tvari te su iz tog razloga najprikladnije za proučavanje dermalne citotoksičnosti.

Vihodceva i suradnici (2017) proveli su istraživanje o antibakterijskim svojstvima pamučne tekstilije koja je modificirana primjenom gel-sol tehnologije. Također su proveli *in vitro* testove dermalne citotoksičnosti pamučne tekstilije impregnirane cinkom i silicijem sol-gel tehnologijom na HaCaT stanicama. Rezultati su pokazali relativno veliko antibakterijsko djelovanje modificiranih tekstilnih uzoraka na gram-pozitivnu *S. aureus* ATCC 25923 i gram-negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 i *E. coli* ATCC 25922. Jedna od korištenih metoda u ispitivanju bila je procjena učinaka ekstrakata impregnirane pamučne tekstilije na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica. Ekstrakti tretirane pamučne tekstilije pripremljeni su koristeći dvije vrste otapala: 50%-tni etanol i 20%-tnu otopinu DMSO-a s vremenom ekstrakcije 24 sata (10 mL otapala po cm² tekstilije). HaCaT stanice tretirane su različitim koncentracijama ekstrakta tretirane pamučne tekstilije koji su dodani mediju za uzgoj u rasponu od 0,625-10% te su kao kontrolni uzorak korištene stanice tretirane čistim

otapalima koja su se koristila za proces ekstrakcije. Uočeno je značajno smanjenje stanične vijabilnosti i proliferacije za stanice tretirane većim koncentracijama ekstrakata tekstilija (10%) koji su dodani mediju za uzgoj dok najniža koncentracija (0,625%) pokazuje čak i proliferativan učinak na keratinocite koja ukazuju na potencijalni pozitivni utjecaj tretiranih tekstilija na ljudsku kožu. HaCaT stanice pokazale su se kao dobar stanični model za proučavanje dermalne citotoksičnosti.

Zanette i suradnici (2011) istraživali su učinak nanočestica srebra na kožu koristeći kao model HaCaT staničnu liniju. Potencijalno citotoksično djelovanje nanočestica srebra na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica određivano je *MTT* i sulforodamin B (SRB) metodom 24 h, 48 h, 72 h i 7 dana nakon tretmana stanica. Nanočestice srebra izazvale su smanjenje stanične vijabilnosti ovisno o koncentraciji i vremenu izloženosti. Otkriveno je da je relativno kratko vrijeme (24 h) kontakta praćeno razdobljem ispiranja od 6 dana, bilo u mogućnosti ometati proliferaciju stanica ovisno o koncentraciji. Sličnost između IC_{50} vrijednosti dva konceptualno različita ispitivanja, *MTT* testa koji se oslanja na mitohondrijsku aktivnost živih stanica, i SRB testa koji mjeri ukupni sadržaj proteina, ukazuje da prva 24 sata kontakta trajno utječu na brzinu rasta stanica. Rezultati pokazuju da nanočestice srebra izazivaju dugotrajnu inhibiciju proliferacije HaCaT stanica te da relativno kratko vrijeme kontakta s nanočesticama srebra rezultira dugotrajnim antiproliferativnim učinkom.

Garvey i suradnici (2017) istraživali su učinak nanočestica srebra na vijabilnost HaCaT stanica *MTT* metodom. Smanjenje stanične vijabilnosti utvrđeno je *MTT* metodom 24 h nakon tretmana različitim koncentracijama nanočestica srebra za sve ispitane koncentracije.

Uspoređujući dobivene rezultate za različite uzorke ispitanih pamuk te pamuk/poliester tekstilija možemo vidjeti da do smanjenja stanične vijabilnosti i proliferacije humanih keratinocita dolazi kod svih ispitanih uzoraka 48 i 72 sata nakon tretmana. Vrijeme inkubacije HaCaT stanica s otopinama dobivenima ekstrakcijom iz tekstilija nije se pokazalo kao varijabla koja ima značajan utjecaj na vijabilnost i proliferaciju stanica.

Ako usporedimo rezultate za ishodnu otopinu i različita razrijeđenja ishodnih otopina dobivenih iz HIP_PES/CO_8_5W (pamuk/poliester tekstilija tretirana s 8% NaOH i obrađena u kupelji s kitozanom, 5 puta oprana) i HIP_PES/CO_20_5W (pamuk/poliester tekstilija tretirana s 20% NaOH i obrađena u kupelji s kitozanom, 5 puta oprana) i nakon 48 i nakon 72 sata tretmana stanica, možemo vidjeti da se najveća razlika uočava kod razrijeđenja ishodne otopine od 4x –16x gdje je kod HIP_PES/CO_8_5W došlo do povećanja stanične vijabilnosti

u odnosu na ista razrijeđenja ishodne otopine dobivene iz HIP_PES/CO_20_5W tekstilije. Luženje pamuk/poliester tekstilija s 20% NaOH pokazuje jače citotoksično djelovanje na HaCaT stanice od luženja tekstilija s manjim postotkom NaOH.

Prilikom tretmana keratinocita ishodnom otopinom netretirane pamučne tekstilije kao i svih ispitanih razrijeđenja, primijećeno je statistički značajno smanjenje vijabilnosti i proliferacije stanica 48 i 72 sata nakon tretmana. Otopine dobivene ekstrakcijom pamučnih tekstilija pokazale su veće citotoksično djelovanje na HaCaT stanice od kombinacije poliester/pamuk tekstilija.

Tretman humanih keratinocita razrijeđenjima ishodne otopine netretirane pamučne tekstilije rezultirao je većom inhibicijom stanične vijabilnosti u odnosu na ista razrijeđenja tretiranih pamučnih tekstilija (HIP_CO_20_5W te HIP_CO_8_5W). Također, uočeno je povećanje stanične vijabilnosti kod svih ispitanih razrijeđenja ishodne otopine dobivene iz tekstilija HIP_CO_20_5W (luženje s 20% NaOH) u odnosu na ista razrijeđenja ishodne otopine dobivene iz HIP_CO_8_5W (luženje s 8% NaOH). Luženje pamučnih tekstilija s 8% NaOH pokazuje jače citotoksično djelovanje na HaCaT stanice od luženja tekstilija s većim postotkom NaOH.

5. ZAKLJUČCI

1. Stanična linija humanih keratinocita (HaCaT) pokazala se kao dobar *in vitro* test sustav za ispitivanje potencijalne toksičnosti antimikrobno obrađenih tekstilija *MTT* metodom.
2. Statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje vijabilnosti i proliferacije HaCaT stanica u odnosu na kontrolni uzorak utvrđeno je *MTT* metodom 48 h nakon tretmana za razrijeđenja 4x – 32x ishodne otopine dobivene ekstrakcijom PES/CO tekstilije. Statistički značajno smanjenje vijabilnosti i proliferacije utvrđeno je *MTT* metodom 72 h nakon tretmana za nerazrijeđenu ishodnu otopinu i razrijeđenja 2x–16x.
3. Statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje vijabilnosti i proliferacije HaCaT stanica u odnosu na kontrolni uzorak za nerazrijeđenu ishodnu otopinu dobivenu ekstrakcijom HIP_PES/CO_20_5W tekstilije te za sva razrijeđenja (2x –32x) ishodne otopine utvrđeno je *MTT* metodom 48 i 72 h nakon tretmana HaCaT stanica.
4. Statistički značajno smanjenje vijabilnosti i proliferacije HaCaT stanica u odnosu na kontrolni uzorak za ishodnu otopinu dobivenu ekstrakcijom HIP_PES/CO_8_5W tekstilije te razrijeđenja 2x – 4x ($p < 0,001$), razrijeđenja 8x – 16x ($p < 0,01$) i 32x ($p < 0,05$) ishodne otopine utvrđeno je *MTT* metodom 48 h nakon tretmana stanica. Statistički značajno smanjenje vijabilnosti i proliferacije utvrđeno je *MTT* metodom 72h nakon tretmana stanica za ishodnu otopinu te za razrijeđenja 2x – 4x ($p < 0,001$), 8x ($p < 0,025$) i 16x ($p < 0,05$).
5. Statistički značajno smanjenje vijabilnosti i proliferacije HaCaT stanica u odnosu na kontrolni uzorak određeno *MTT* metodom nakon 48 h i 72 h utvrđeno je kod ishodne otopine i kod svih razrijeđenja (2x –32x) ishodne otopine dobivene ekstrakcijom pamučne tekstilije (CO).
6. Statistički značajno smanjenje vijabilnosti i proliferacije u odnosu na kontrolni uzorak za ishodnu otopinu dobivenu ekstrakcijom HIP_CO_8_5W tekstilije te razrijeđenja 2x - 8x ($p < 0,001$), razrijeđenje 16x ($p < 0,005$) i 32x ($p < 0,025$) ishodne otopine utvrđeno je *MTT* metodom 48 h nakon tretmana HaCaT stanica. Statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje proliferacije i vijabilnosti utvrđeno je *MTT* metodom 72 h nakon tretmana za nerazrijeđenu ishodnu otopinu i sva razrijeđenja (2x – 32x) ishodne otopine.
7. Statistički značajno smanjenje vijabilnosti i proliferacije u odnosu na kontrolni uzorak za ishodnu otopinu dobivenu ekstrakcijom HIP_CO_20_5W tekstilije te razrijeđenja

2x – 8x ($p < 0,001$), razrijeđenje 16x ($p < 0,005$) i 32x ($p < 0,01$) ishodne otopine utvrđeno je *MTT* metodom 48 h nakon tretmana HaCaT stanica. Statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje vijabilnosti i proliferacije utvrđeno je *MTT* metodom 72 h nakon tretmana stanica za nerazrijeđenu ishodnu otopinu i sva razrijeđenja (2x – 32x) ishodne otopine HIP_CO_20_5W tekstilije.

6. LITERATURA

- Araújo, G. L., Campos, M. A. A., Valente, M. A. S., Silva, S. C. T., França, F. D., Chaves, M. M., Tagliati, C. A. (2014) Alternative methods in toxicity testing: the current approach. *Braz J. Pharm Sci.* [online] **50**, 55-62, <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502014000100005>. Pristupljeno 14. travnja 2020.
- Arora, M. (2013) Cell culture media: a review. *Mather Methods.* [online] **3**, 175. Labome, the world of laboratories, <<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>>. Pristupljeno 20. travnja 2020.
- Aslantürk, O. S. (2017) *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. U: *Genotoxicity - A predictable risk to our actual world* (Larramendy, M. L., ured.), IntechOpen, London, str. 1-18, <<https://www.intechopen.com/books/genotoxicity-a-predictable-risk-to-our-actual-world/in-vitro-cytotoxicity-and-cell-viability-assays-principles-advantages-and-disadvantages>>. Pristupljeno 5. svibnja 2020.
- ATCC (2020) ATCC primary cell culture guide. ATCC - American Type Culture Collection, <https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Primary_Cell_Culture_Guide.ashx>. Pristupljeno 13. ožujka 2020.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**, 762-771.
- Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P. A., Scaccabarozzi Calvieri, S., Gismondi, A., Taramelli, D., Dell'Agli, M. (2017) HaCaT cells as a reliable *in vitro* differentiation model to dissect the inflammatory/repair response of human keratinocytes. *Mediat. Inflamm.* **2017**, 1–12.
- Denizot, F., Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **89**, 271-277.

- Deyrieux, A. F., Wilson, V. G. (2007) *In vitro* culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology* **54**, 77-83.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.-C., Pieters, R., Kleiner, J. (2002) Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 193-236.
- El-tahlawy, K. F., El-bendary, M. A., Elhendawy, A. G., Hudson, S. M. (2005) The antimicrobial activity of cotton fabrics treated with different crosslinking agents and chitosan. *Carbohydr. Polym.* **60**, 421-430.
- Freshney R. I. (2010) *Culture of Animal Cells – a Manual of Basic Technique and specialized applications*, 6. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Gao, Y., Cranston, R. (2008) Recent advances in antimicrobial treatments of textiles. *Text. Res. J.* **78**, 60-72.
- Garvey, M., Padmanabhan, S. C., Pillai, S. L., Cruz-Romero, M., Kerry, J. P., Morris, M. A. (2017) *In vitro* cytotoxicity of water soluble silver (Ag) nanoparticles on HaCaT and A549 cell lines. *J Toxicol. Pharamcol.* **1**, 016.
- Ghallab, A. (2013) *In vitro* test system and their limitations. *EXCLI J.* **12**, 1024-1026.
- Hudu, S. A., Alshrari, A. S., Syahida, A., Sekawi, Z. (2016) Cell culture, technology: enhancing the culture of diagnosing human diseases. *J. Clin. Diagn. Res.* **10**, DE01-DE05.
- Invitrogen (2020) Cell culture basics, <<https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>>. Pristupljeno 31. ožujka 2020.
- Joshi, M., Wazed Ali, S., Purwar, R. (2009) Ecofriendly antimicrobial finishing of textiles using bioactive agents based on natural products. *Indian J. Fibre Text. Res.* **34**, 295-304.
- Kaur, G., Dufour, J. M. (2012) Cell lines: valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* **2**, 1-5.
- Klemola, K. (2008) Textile toxicity: cytotoxicity and spermatozoa motility inhibition resulting from reactive dyes and dyed fabrics. Doctoral dissertation. Faculty of Natural and Environmental Sciences, University of Kuopio, Finland.
- Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **56**, 195-204.

- Laird, K., Riley, K. (2016) Antimicrobial textiles for medical environments. U: *Antimicrobial Textiles*(Sun, G., ured.), Woodhead Publishing, Sawston/Cambridge, str. 249-262.
- Lim, S.-H., Hudson, S. M. (2003) Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. *J. Macromol. Sci. Polymer Res.* **43**, 223-269.
- Merck KGaA (2020) Protocol guide: *MTT* assay for cell viability and proliferation.<<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>>. Pristupljeno 5. svibnja 2020.
- Microbehunter Microscopy (2010) The hemocytometer (counting chamber), <<http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber/>>. Pristupljeno 29. lipnja 2020.
- Morais, D. S., Guedes, R. M., Lopes, M. A. (2016) Antimicrobial approaches for textiles: from research to market. *Materials* **9**, 498.
- Periolatto, M., Ferrero, F., Vineis, C., Varesano, A., Gozzelino, G. (2017) Novel antimicrobial agents and processes for textile applications. U: *Antibacterial Agents[online]* (Kumavath, R., ured.), IntechOpen, London, str. 17-37, <<https://www.intechopen.com/books/antibacterial-agents/novel-antimicrobial-agents-and-processes-for-textile-applications>>. Pristupljeno 17. travnja 2020.
- Shin, Y., Yoo, D. I., Jang, J. (2001) Molecular weight effect on antimicrobial activity of chitosan treated cotton fabrics. *J. Appl. Polym. Sci.* **80**, 2495-2501.
- Shirvan, A. R., Shakeri, M., Bashari, A. (2019) Recent advances in application of chitosan and its derivatives in functional finishing of textiles. U: *The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology*(Ul-Islam, S., Butola, B. S., ured.), Woodhead Publishing, Sawston/Cambridge, str. 107-133.
- Simončič, B., Tomšič, B. (2010) Structures of novel antimicrobial agents for textiles-a review. *Textile Res. J.* **80**, 1721-1737.
- Singh, G., Beddow, J., Mee, C., Maryniak, L., Joyce, E. M., Mason, T. J. (2017) Cytotoxicity study of textile fabrics impregnated with CuO nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Toxicol.* **36**, 478-484.
- Singh, S., Khanna, V. K., Pant, A. B. (2018) Development of *in vitro* toxicology: a historic story. U: *In vitro toxicology* (Dhawan, A., Kwon, S., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 1-19.

- Sinha, B. K., Kumar, R. (2008) *Principles of animal cell culture*, International Book Distributing Co., Lucknow, str. 62.
- Thermo Fisher Scientific (2020) Adherent Cell Culture vs. Suspension Cell Culture, <<https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-lines/adherent-vs-suspension-culture.html>>. Pristupljeno 1. travnja 2020.
- Unchern, S. (1999) Basic techniques in animal cell culture. *Drug delivery system workshop*, Bangkok, Thailand, str.1-30.
- Uysal, O., Sevimli, T., Sevimli, M., Gunes, S., Eker Sariboyaci, A. (2018) Cell and tissue culture: the base of biotechnology. U: *Omics Technologies and Bio-Engineering*, (Barh, D., Azevedo, V., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 391-429.
- Vihodceva, S., Ramata-Stunda, A., Pumpure, A. (2017) Evaluation of dermal toxicity of antibacterial cotton textile coated by sol-gel technology. *J. Text. Inst.* **109**, 961-966.
- Wimardani, Y. S., Suniarti, D. F., Freisleben, H- J., Wanandi, S. I., Ikeda, M-A. (2012) Cytotoxic effects of chitosan against oral cancer cell lines is molecular-weight-dependent and cell- type-specific. *Int. J. Oral. Care. Res.* **3**, 1-10.
- Yang, Z., Xiong, H. (2012) Culture conditions and types of growth media for mammalian cells. U: *Biomedical Tissue Culture[online]* (Ceccherini-Nelli L., Matteoli B., ured.), IntechOpen, London, str. 3-18, <<https://www.intechopen.com/books/biomedical-tissue-culture/culture-conditions-and-types-of-growth-media-for-mammalian-cells>>. Pristupljeno 14. travnja 2020.
- Yao, T., Asayama, Y. (2017) Animal-cell culture media: history, characteristics, and current issues. *Reprod. Med. Biol.* **16**, 99-116.
- Younes, I., Rinaudo, M. (2015) Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar. Drugs.* **13**, 1133-1174.
- Zanette, C., Pelin, M., Crosera, M., Adami, G., Bovenzi, M., Filon Larese, F., Florio, C. (2011) Silver nanoparticles exert a long-lasting antiproliferative effect on human keratinocyte HaCaT cell line. *Toxicol. in Vitro* **25**, 1053-1060.
- Zhang, Y., Newton, B., Lewis, E., Fu, P. P., Kafoury, R., Ray, P. C., Yu, H. (2015) Cytotoxicity of organic surface coating agents used for nanoparticles synthesis and stability. *Toxicol. in Vitro* **29**, 762-768.
- Zhang, Z., Chen, L., Ji, J., Huang, Y., Chen, D. (2003) Antimicrobial properties of cotton fabrics treated with chitosan. *Textile Res. J.* **73**, 1103-1106.

- Zhao, Y., Xu, Z., Lin, T. (2016) Barrier textiles for protection against microbes. U: *Antimicrobial textiles* (Sun, G., ured.), Woodhead Publishing, Sawston/Cambridge, str. 225-245.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Doroteja Prlok

Doroteja Prlok