

In vitro testovi u ispitivanju potencijalne štetnosti tekstilnih materijala

Radnić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:159:857576>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Marija Radnić

7286/N

***IN VITRO* TESTOVI U ISPITIVANJU POTENCIJALNE ŠTETNOSTI
TEKSTILNIH MATERIJALA**

ZAVRŠNI RAD

Projekt: „Bolničke zaštitne tekstilije“ (HPROTEX)

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič

Zagreb, 2019.

Ovaj završni rad izrađen je u okviru projekta „Bolničke zaštitne tekstilije“ (HPROTEX) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost – HRZZ.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

***IN VITRO* TESTOVI U ISPITIVANJU POTENCIJALNE ŠTETNOSTI TEKSTILNIH MATERIJALA Marija Radnić, 0058209725**

Sažetak: Kulture humanih stanica se koriste u industrijskoj biotehnologiji te u brojnim znanstvenim disciplinama, između ostalog i kao test sustavi u cilju ispitivanja toksičnosti ksenobiotika. U farmaceutskoj industriji njihova primjena vrlo je važna pri proizvodnji visokovrijednih pripravaka poput humanih i veterinarskih cijepiva, hormona, neuroregulatora i sl. Uključivanje *in vitro* metoda u toksikološka ispitivanja nužno je u cilju smanjenja broja životinja u pokusima. Osim toga, primjena kulture stanica omogućuje istraživanja molekularnih mehanizama toksičnosti, interakcija s receptorima i praćenje specifičnih unutarstaničnih promjena izazvanih djelovanjem toksikanta, dok *in vivo* studije ne omogućuju takve spoznaje. Većina alternativnih testova toksičnosti još je u postupku razvoja i validacije te se koriste samo kao predtestovi. U ovom radu preliminarno je ispitana mogućnost korištenja humanih keratinocita - HaCaT stanične linije kao alternativnog test sustava u ispitivanju potencijalno štetnih tvari kojima su impregnirane tekstilije. Upotreba kulture HaCaT stanica omogućila je vrlo brzo, rutinski i relativno jeftino dobivanje podataka čime se test sustav pokazao zadovoljavajućim.

Ključne riječi: HaCaT stanična linija, *in vitro* testovi toksičnosti, kulture stanica, *MTT* metoda, tekstilije

Rad sadrži: 32 stranice, 6 slika, 35 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Teuta Murati; Marina Miletić, mag. ing., asistent

Datum obrane: rujan, 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Nutrition
Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for toxicology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

APPLICATION OF *IN VITRO* MODELS IN TOXICITY TESTING OF TEXTILES

Marija Radnić, 0058209725

Abstract: Human cell cultures are used in industrial biotechnology and in numerous scientific disciplines, including as test systems for toxicity testing of xenobiotics. In the pharmaceutical industry, their application is very important in producing high-valuable preparations such as human and veterinary vaccines, hormones, neuroregulators etc. Inclusion of *in vitro* methods in toxicity studies is necessary - primarily in order to reduce the number of animals used in experiments. In addition, the use of cell cultures allows investigation of molecular mechanisms of toxicity, interaction with receptors and monitoring of specific intracellular changes caused by the activity of toxicant, whereas *in vivo* studies do not provide such insights. The majority of alternative toxicity tests are still in the process of development and validation and are used only as preliminary tests. In this study it has been investigated the possibility of HaCaT cell line (human keratinocytes) usage as an alternative test-system in determination of the potential harmfulness of selected textile materials. The usage of HaCaT cell culture proved to be a suitable model to follow toxicity of selected textile. The data were obtained very quickly, routinely and testing procedure was relatively non expensive and reproducible.

Keywords: cell cultures, HaCaT cell line, *in vitro* toxicity tests, *MTT* method, textile

Thesis contains: 32 pages, 6 figures, 35 references

Original in: Croatian

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

Mentor: : PhD. Ivana Kmetič, Associate Professor

Technical support and assistance: PhD. Teuta Murati, Assistant Professor;
BSc. Marina Miletić, Scientific Assistant

Defence date: September, 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kulture humanih stanica.....	2
2.1.1. Primarne kulture stanica i stanične linije	3
2.1.1.1. Stanične kulture u monosloju.....	4
2.1.1.2. Stanične kulture u suspenziji.....	6
2.2. Uzgoj i primjena staničnih linija	6
2.3. Građa i fiziologija kože	9
2.3.1. Apsorpcija putem kože.....	10
2.3.2. HaCaT stanična linija	12
2.4. Štetne tvari na tekstilijama	12
2.5. Alternativni testovi toksičnosti.....	14
2.5.1. <i>Kenacid Blue</i> metoda	17
2.5.2. <i>Neutral Red</i> metoda.....	17
2.5.3. <i>MTT</i> metoda	18
2.5.4. <i>Trypan Blue</i> metoda	19
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. MATERIJAL	20
3.1.1. Biološki materijal	20
3.1.2. Tekstilije.....	20
3.1.3. Kemikalije.....	20
3.1.4. Otopine i puferi	20
3.1.5. Oprema i uređaji	20
3.2. METODE RADA.....	21
3.2.1. Primjer ispitivanja potencijalne štetnosti tekstilnih materijala	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
5. ZAKLJUČAK.....	26
6. POPIS LITERATURE	28

1. UVOD

Kulture stanica koriste se u staničnoj i molekularnoj biologiji. Izvrstan su model za proučavanje fiziologije i biokemije stanica, učinka lijekova i toksičnih spojeva na stanice, mutagenoze i karcinogeneze, unutarstaničnih signalnih puteva, a koriste se i u biotehnologiji za proizvodnju velikih količina biološki važnih spojeva (vakcine, terapijski proteini i dr.). Glavna prednost korištenja staničnih kultura je konzistentnost i ponovljivost rezultata (Invitrogen, 2019). Ispitivanja toksičnosti se mogu provoditi *in vitro* i *in vivo* eksperimentima (Kniewald i sur., 2005). Klasičnim (*in vivo*) testovima toksičnosti istražuje se akutna (jedna doza), subakutna (ponavljanje doze do jednog mjeseca), subkronična toksičnost (ponavljane doze od 1-3 mjeseca) i kronična toksičnost (ponavljanje doze od 3 mjeseca do dvije godine) (Atterwill, 1995). Za razliku od njih, *in vitro* sustavi upotrebljavaju se u istraživanjima molekularnih, staničnih i fizioloških mehanizama toksičnosti izazvanih kemikalijama na koje *in vivo* testovi ne mogu dati odgovor (Kniewald i sur., 2005). Kako bismo dobili *in vitro* sustave što sličnijima onima *in vivo*, nužno je stanice kultivirati u odgovarajućem mediju za uzgoj stanica točno definiranog sastava, pH, te pri optimalnoj temperaturi i parcijalnom tlaku CO₂ i O₂ (Freshney, 2005). Za određivanje bazalne citotoksičnosti ksenobiotika najčešće se koriste sljedeće metode: *Kenacid Blue*, *Neutral Red*, *MTT* i *Trypan Blue*. U ovom radu, kao alternativni test-sustav bit će korištena HaCaT stanična linija kože (humani keratinociti) u svrhu preliminarnog ispitivanja mogućih citotoksičnih učinaka odabranog tekstilnog materijala čija je namjena korištenje u bolničkom okruženju. Tekstilije za primjenu u medicini mogu biti podvrgnute različitim uvjetima kationiziranja i antimikrobne dorade s ciljem minimalnog kemijskog i mehaničkog oštećenja što doprinosi manjem otpuštanju tekstilne prašine. Rješavanje problema pojave tekstilne prašine kao potencijalnog prijenosnika zaraza i uzročnika kvarova uređaja u bolničkom okruženju vrlo je važno, stoga su istraživanja u ovom području nužna. Preduvjet za korištenje novorazvijenih tekstilija je neškodljivost (odsutnost sistemske toksičnosti, lokalnih reakcija, alergijskih reakcija i dr.) za tijelo čovjeka. Cilj ovog rada je preliminarno ispitati mogućnost korištenja humanih keratinocita - HaCaT stanične linije kao alternativnog test sustava u ispitivanju potencijalno štetnih tvari kojima su impregnirane tekstilije. Citotoksični učinci pratit će se nakon 72 sata *MTT* metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kulture humanih stanica

Stanice, fundamentalne jedinice života, korisno su pomagalo u biološkim istraživanjima. Da bi ispunile svoju svrhu u biološkim istraživanjima, stanice moraju biti uzgojene u umjetnom okruženju izvan originalnog organizma. Pojam kulture stanica označava održavanje stanica višestaničnih organizama *in vitro* - izvan njihovog izvornog okruženja pod točno definiranim uvjetima što sličnijima onima *in vivo* (ABM, 2004). Najveću upotrebu kulture stanica imaju u razvoju cjepiva, terapijskih proteina i u svrhu liječenja karcinoma. Početkom tridesetih i četrdesetih godina prošlog stoljeća istraživači su koristili žive životinje za uzgoj poliovirusa, ali s pojavom kulture stanica uspjeli su postići mnogo veću kontrolu nad proizvodnjom virusa, što im je omogućilo da ih bolje prouče i na kraju razviju cjepiva. Druga važna primjena je ekspresija različitih tipova proteina u stanicama sisavaca. U početku, *E. coli* je bio primarni organizam koji se koristio za proizvodnju proteina, ali s potrebom proizvodnje proteina s pravilnim posttranslacijskim modifikacijama, fokus je stavljen na korištenje eukariota. Počevši od 1970-ih i 80-ih, proteini poput interferona i antitijela uspješno su komercijalno proizvedeni putem staničnih kultura. Određeni citokini i faktori rasta mogu se proizvesti primjenom kulture stanica, a razumijevanje strukture i aktivnosti ovih proteina pomaže nam razumjeti njihovu ulogu u organizmu. Nadalje, budući da je karcinom jedan od vodećih uzročnika smrti u svijetu, milijuni dolara uloženi su za njegovo istraživanje kako bi se pronašao lijek i koristan tretman za liječenje. Ovdje su presudne kulture stanica jer se normalne stanice mogu transformirati u stanice raka metodama koje uključuju zračenje, kemikalije i viruse, a tako uzgojene stanice se onda mogu koristiti za izučavanje karcinoma i testiranje novih načina liječenja (ABM, 2004). Stanične kulture imaju mnoge prednosti u kvantifikaciji, karakterizaciji i uzastopnom uzorkovanju, ali nemaju mogućnost složenih interakcija kao što je to moguće kod kulture organa (Freshney, 2005).

Dvije su glavne vrste kulture stanica: primarne kulture stanica i stanične linije. Stanične linije mogu biti konačne i kontinuirane. Primarne kulture stanica imaju limitiran životni vijek, a kontinuirane stanične linije su često transformirane i mogu se "neograničeno" uzgajati (Invitrogen, 2019).

2.1.1. Primarne kulture stanica i stanične linije

Primarne stanice su stanice izolirane izravno iz ljudskog ili životinjskog tkiva upotrebom enzimskih ili mehaničkih metoda. Nakon izolacije one se smještaju u umjetno okruženje pogodno za njihov rast. Vrste stanica najčešće uzgajane kao primarne kulture su: epitelne stanice, fibroblasti, keratinociti, melanociti, endotelne stanice, mišićne stanice, hematopoetske i mezenhimske matične stanice. Ograničenog su vijeka te nakon određenog vremena provedenog u kulturi umiru, a vrijeme tijekom kojeg primarne stanice preživljavaju varira ovisno o tipu stanica (ATCC, 2019). Postoje dvije vrste primarnih kultura stanica. Adherentne stanice koje zahtijevaju vezanje za podlogu kako bi mogle proliferirati te suspenzije stanica koje ne zahtijevaju vezanost da bi rasle, a uključuju stanice kao što su npr. limfociti iz krvi. Kada su stanice izolirane, mogu se uzgajati kao kultura eksplantata, suspenzija ili monosloj. Prije nego što se stanice počnu uzgajati, podvrgavaju se enzimatskom tretmanu za disocijaciju koji se provodi u što kraćem vremenu da ne dođe do oštećenja stanica ili ubijanja istih. Jednom kada se dobiju pojedinačne stanice na odgovarajući način se kultiviraju u mediju za uzgoj kako bi im se omogućio daljni rast (MicroscopeMaster, 2019). To se postiže se na način da se stanice presade u novu posudu u kojoj se nalazi svježiji medij čime se osigurava više prostora za njihov rast. Nakon uspostave, primarne kulture se mogu transformirati u stanične linije koje se dijele na konačne i kontinuirane. Ako je subpopulacija stanične linije izolirana iz kulture selekcijom ili nekim drugim postupkom, stanična linija postaje stanični soj. Stanični soj često podliježe dodatnim genetskim promjenama. HeLa ("Henrietta Lacks") stanice se kontinuirano uzgajaju od 1951. godine. Smatraju se prvim besmrtnim ikad uzgojenim ljudskim stanicama (Sykes i Rankin, 2014). Normalne stanice obično se dijele ograničeni broj puta prije nego što izgube sposobnost proliferacije. Kada se konačna stanična linija podvrgne transformaciji i stekne sposobnost dijeljenja na neodređeno vrijeme postaje kontinuirana stanična linija (Sykes i Rankin, 2014). 1943. god. W. R. Earle je uspostavio prvu kontinuiranu staničnu liniju L929 - stanična linija mišjih fibroblasta. Transformacija se može dogoditi spontanom mutacijom ili može biti namjerno izazvana. Mana ove metode je što je neučinkovita i u većini slučajeva se stanice transformiraju u tumorske stanice. Važno je napomenuti da postoji osnovna razlika između tumorskih stanica i normalnih - besmrtnih stanica. Tumorske stanice imaju mnoge klasične karakteristike kao što je gubitak kontaktne inhibicije, niske adhezivne sposobnosti i inhibicije apoptoze, dok normalne besmrtno stanice zadržavaju normalan genotip i fenotip. Nekoliko je načina namjernog izazivanja mutacija. Uvođenje virusih gena, poticanje

ekspresije telomeraze, enzima koji proširuje slijed telomera i koji omogućuje stanici beskonačnu proliferaciju, kao i kombinacija ovih dviju metoda. Bilo koja od ovih manipulacija rezultira nastankom kontinuiranih staničnih linija (Creative Bioarray, 2019).

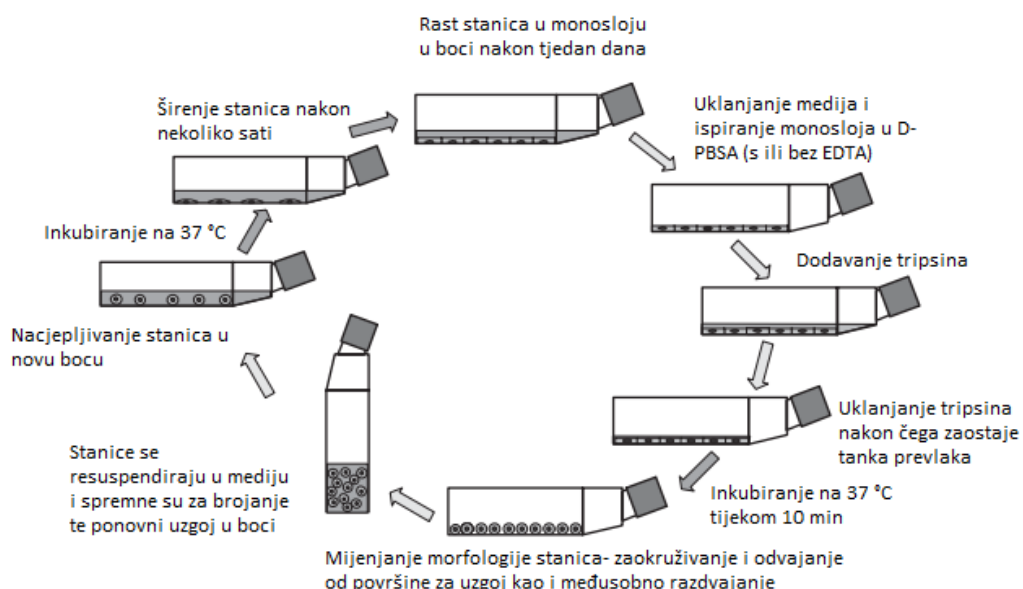
Uvjeti za uzgoj kultura stanica variraju ovisno o tipu stanica. Uzgoj se vrši u prikladnoj posudi u kojoj se nalazi medij za kultivaciju. Medij opskrbljuje stanice s esencijalnim hranjivim tvarima kao što su aminokiseline, ugljikohidrati, vitamini i minerali, faktori rasta i hormoni. Također, on regulira fizikalno-kemijske parametre: temperaturu, pH i osmotski tlak (Sykes i Rankin, 2014). Prednost primjene primarnih kultura je to što imaju morfološke i biokemijske karakteristike kao originalno tkivo, ali kao nedostatak ističe se niska homogenost, tj. heterogenost koja se očituje u prisustvu različitih tipova stanica izvornog tkiva iz kojeg su stanice dobivene te rast u malim količinama. Nasuprot tome, kod kontinuiranih staničnih linija karakteristično je to da je promijenjena morfologija stanica, veća je gustoća stanica, smanjena je potreba za serumom, moguć je rast u suspenziji, povećana je učinkovitost kloniranja i neograničenog su životnog vijeka. No, nedostatak je kromosomska nestabilnost, razlika od donorskog fenotipa, povećana mogućnost nastanka tumorskih stanica te gubitak specifičnih tkivnih markera (Freshney, 2005). Prednost kontinuiranih staničnih linija u odnosu na primarne kulture je to što tijekom uspostavljanja svježih - primarnih kultura iz eksplantiranog tkiva može doći do značajnih varijacija među samim pripravicima. Također, osjetljivije su na utjecaje toksičnih kemikalija. Stoga je korištenje kontinuiranih staničnih linija korisno jer one mogu jamčiti konzistentnost materijala u eksperimentima. Sve navedeno ukazuje na nužnost i prednosti upotrebe kultura stanica u istraživanjima u području stanične biologije, imunologije, hematologije, karcinoma, toksikologije i molekularne biologije (Creative Bioarray, 2019).

2.1.1.1. Stanične kulture u monosloju

Većina primarnih kultura, konačnih i kontinuiranih staničnih linija rastu u monosloju pri čemu su stanice vezane za površinu (Invitrogen, 2019). Adherentno svojstvo znači da je vezanost za podlogu preduvjet za proliferaciju stanica. Adhezija stanica posredovana je specifičnim receptorima na površini stanica za molekule u izvanstaničnom matriksu. Tri glavne skupine transmembranskih proteina su uključene u adheziju stanica-stanica ili stanica-ekstracelularni matriks. U međusobnoj interakciji stanica uključene su CAMs (engl. *Cell adhesion molecules* – neovisne o Ca^{2+}) i kadherini (ovisni o Ca^{2+}). Interakcije stanice i proteina ekstracelularnog matriksa primarno su posredovane integrinima koji se vežu za molekule poput fibronektina,

entaktina, lamina i kolagena specifičnim motivom koji sadrži niz od tri aminokiseline: arginin-glicin-asparaginska kiselina (RGD). Treća skupina molekula stanične adhezije su transmembranski proteoglikani koji su također u interakciji sa sastojcima matriksa, ali ne preko RGD niza (Freshney, 2005).

Različiti tipovi stanica mogu se vezati i rasti na staklenoj, metalnoj ili plastičnoj površini boce u kojoj se uzgajaju ukoliko su boce prethodno obrađene kemijskim i fizičkim tretmanima kako bi njihove površine postale električni nabijene i omogućile lakše prianjanje. Prednost uzgoja stanica u monosloju je lakša promjena medija i moguće ispiranje stanica od nepoželjnih tvari prije dodavanja novog medija, jednostavnija je perfuzija zbog imobiliziranosti stanica te je učinkovitije izlučivanje produkata. Uzgoj stanica u monosloju je prikladan za većinu staničnih linija, uključujući primarne stanične kulture te se omogućuje jednostavno praćenje rasta golim okom ili uz pomoć mikroskopa (Freshney, 2005; Invitrogen, 2019). Nedostatak ovakvog uzgoja je to što je teško prenošenje kulture u veće mjerilo, stanicama je potrebno više prostora za rast, postoje poteškoće u uzimanju uzoraka što rezultira neučinkovitim praćenjem staničnog rasta te je teško kontrolirati fizikalno - kemijske parametre. Također, prije samog uzgoja postupak zahtjeva pripremu posude za uzgoj koja se mora presvući s npr. kolagenom koji omogućuje bolje prianjanje stanica (Freshney, 2005; Invitrogen, 2019). Na slici 1 prikazane su faze u subkultivanju i staničnom rastu monoslojnih kultura.



Slika 1. Faze u subkultivanju i staničnom rastu monoslojnih kultura (Freshney, 2005).

2.1.1.2. Stanične kulture u suspenziji

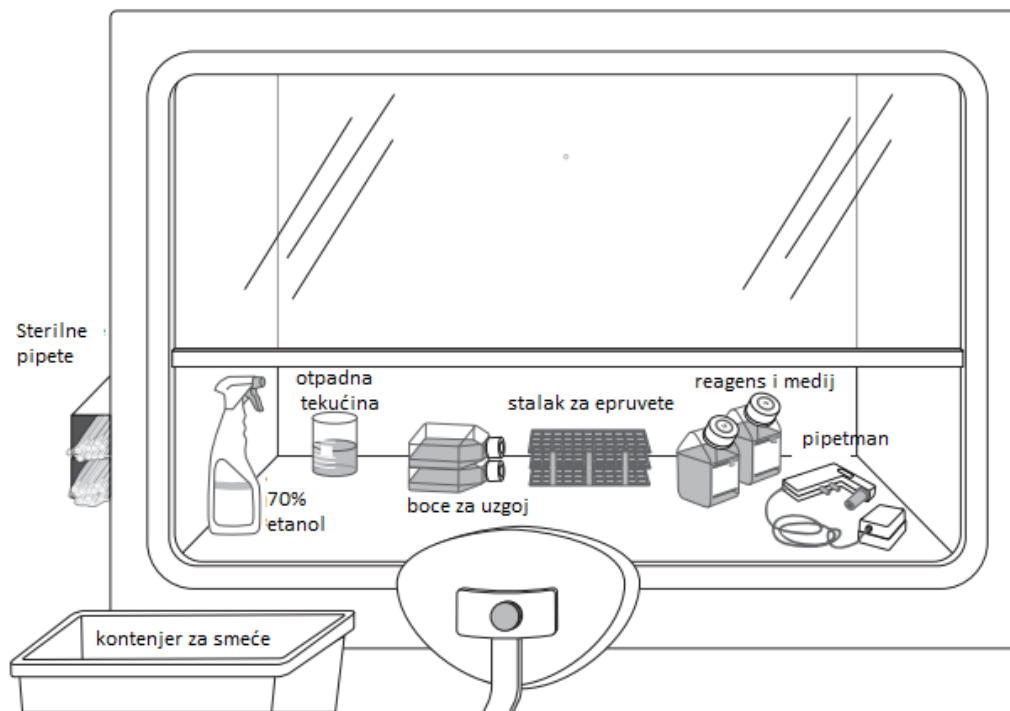
Stanice dobivene iz hematopoetskih ili određenih tkivnih tumora, nisu ovisne o vezanju za podlogu i rastu u suspenziji. Dva su načina uzgoja kulture u suspenziji: statički (tikvice za uzgoj bez mješala) i dinamički (tikvice s mješalom) (Invitrogen, 2019). Stanični rast u suspenziji ima nekoliko prednosti u odnosu na rast u monosloju. Za potrebe rasta stanične kulture u suspenziji ne radi se zamjena supstrata već se vrši prihrana svaka 2 do 3 dana i lag faza traje kraće nego kod onih u monosloju pa je proces umnažanja puno brži. Ne dolazi do kontaktne inhibicije, nije potreban tretman tripsinom i prijenos kulture u veće mjerilo je puno jednostavnije. Suspenzijske kulture zahtijevaju manje prostora i stanice se mogu razmnožavati u bioreaktorima sličnim fermentorima koji se koriste za kulture kvasca ili bakterija (Freshney, 2005; Invitrogen, 2019).

2.2. Uzgoj i primjena staničnih linija

Uzgoj kulture stanica započeo je 1907. godine s eksperimentom iz područja neurobiologije. Uspostava primarne kulture stanica provodi se u sterilnim uvjetima u komori ili laminaru (kao što je prikazano na slici 2) kroz nekoliko koraka. Prvi korak je izoliranje željene vrste stanice iz tkiva. O tome ovisi složenost postupka pa je tako moguća jednostavna izolacija centrifugiranjem ili upotrebljavanjem tvari/predmeta na koje se uz pomoć adherentnih svojstava same stanice vežu i tako razdvajaju. Za izoliranje željene vrste stanica iz tkiva koje sadrži više tipova stanica nužno je razbijanje izvanstaničnog matriksa koji stanice drži zajedno. Uzorak tkiva obično se tretira proteolitičkim enzimima (npr. tripsin) koji razgrađuju proteine u izvanstaničnom matriksu i sa sredstvima kao EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) ili nekim drugim sredstvima koji utječu na adheziju samih stanica (Alberts i sur, 2002).

Nakon toga stanice se centrifugiraju, odstranjuje se otopina enzima, a talog stanica i zaostalih komadića tkiva resuspendira se u odabranom mediju. Pripremljena suspenzija stanica sterilno se filtrira čime se uklone preostali komadići tkiva. Stanice se potom kultiviraju u kompletnom mediju za uzgoj uz dodatak antibiotika (Alberts i sur., 2002). Kada su stanice uzgojene, one se čuvaju na način da se zamrzavaju. Pohranjuju se kvalitetne stanice u eksponencijalnoj fazi rasta, a smrzavanje se postiže dodatkom krioprezervansa (DMSO, glicerol, metanol i sl.). Smrzavanje stanica se odvija postupno brzinom od 1-3 °C h⁻¹, a tako dobivene stanice se onda čuvaju u tekućem dušiku (-196 °C) ili u frižideru (-80 °C, kratkoročno).

Različite stanične linije općenito zahtijevaju specifične vrste medija, no svi mediji uključuju aminokiseline, anorganske soli i vitamine. Osim sastava medija, bitna je pH vrijednost i temperatura. Većina stanica preferira rast na temperaturi od 33 °C do 37 °C. Temperatura se mora strogo nadzirati jer odstupanje može uvelike smanjiti proliferaciju i diferencijaciju stanica. Uzgoj se provodi u posebnim posudama. Mnogo je različitih tipova posuda koje se mogu koristiti za kultiviranje stanica, a one se razlikuju po veličini, obliku, premazu i prisutnosti ili odsutnosti poklopca (Invitrogen, 2019). Kako bismo dobili *in vitro* sustave što sličnije onima *in vivo*, pažljivo se odabire sastav medija za uzgoj stanica, njegov pH, optimalna temperatura te parcijalni tlakovi CO₂ i O₂, a ti parametri karakteristični su za svaku staničnu kulturu (Freshney, 2005).



Slika 2. Komora za uzgoj kulture stanica (Invitrogen, 2019).

Stanicama su potrebni osnovni prehrambeni uvjeti za rast *in vitro*, uključujući aminokiseline, vitamine, monosaharide, ione i elemente u tragovima (Yang i Xiong, 2012). Općenito, prilikom uzgoja stanica koriste se dva tipa medija, potpuno prirodni medij ili sintetski medij s nekim prirodnim tvarima. Prirodni medij porijeklom je iz životinja, uključujući plazmu, serum, limfu i slično. Prirodni medij sadrži bogate hranjive tvari i različite hormone. Budući da ovaj medij ima vrlo složen proces proizvodnje i velike varijacije među serijama,

takav medij se postupno zamjenjivao sintetskim medijem. Umjetno sintetizirani medij priprema se dodatkom organskih i anorganskih nutrijenata, vitamina, soli, serumskih proteina, ugljikohidrata, kofaktora i dr.. Danas se uobičajno za uzgoj staničnih kultura koriste: *Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)*, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)*, *RPMI-1640*, *Ham's Nutrient Mixtures* i *Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)* (Freshney, 2005). Stanice zahtijevaju vrlo specifičan pH od 7,2 do 7,4 kako bi mogle optimalno obavljati svoje stanične funkcije. Kako bi se spriječila kiselost koju stvara CO₂ i održao optimalni pH, većina medija ima kemijski puferirajući sustav (natrijev bikarbonat). Uzgoj stanica se provodi u inkubatoru s 5-10% CO₂ u zraku. Budući da je održavanje pH neophodno za uzgoj i održavanje stanične kulture, mnogi medijski pripravci sadrže pH indikator koji se naziva fenol crveno. Fenol crveno postaje žut u kiselim uvjetima (pH<6,8), a ružičast u lužnatim uvjetima (pH>8,2) (BiteSizeBio, 2017). Svaki medij za rast zahtijeva izvor ugljika koji stanice mogu metabolizirati. To je često glukoza, ali može biti i druga vrsta šećera kao što su galaktoza, heksoza i fruktoza. Glukoza se obično dodaje u konačnoj koncentraciji od 5,5 mM, što je približno jednako razinama glukoze koje se nalaze u ljudskoj krvi (BiteSizeBio, 2017). Svim su stanicama potrebne aminokiseline koje služe kao prekursori za sintezu proteina. Aminokiseline koje se nalaze u mediju su arginin, cistein, glutamin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, tirozin i valin (većinom L-izomeri) u koncentraciji od 0,1-0,2 mM (Freshney, 2005). Vitamini uglavnom djeluju kao koenzimi ili prostetske skupine u procesima staničnog metabolizma. Vitamini koji se nalaze u mediju su biotin, folat, nikotinamid, pantotenska kiselina, piridoksin, riboflavin, tiamin i vitamin B₁₂. Soli prisutne u mediju su NaCl, KCl, NaH₂PO₄, NaHCO₃, CaCl₂, MgCl₂. Uz to, medij sadrži elemente u tragovima, kao što su molibden, vanadij, željezo, cink, selen, bakar i mangan. Da bi se spriječio rast bakterija mediju se mogu dodati i antibiotici poput penicilina i/ili streptomycina. Uz sve navedeno, medij sadrži i proteine: inzulin, transferin te specifične faktore rasta (Freshney, 2005; Yang i Xiong, 2012). Serum je mješavina mnogo malih i velikih biomolekula s različitim fiziološkim aktivnostima čiji odabir ovisi o tipu stanica koji se uzgaja, a najčešće su upotrebljavani fetalni goveđi i teleći serum, konjski i humani serum. Prije same upotrebe humanog seruma nužno je da bude testiran na prisutnost virusa HIV-a i hepatitisa B. Serum se dodaje mediju u količini od 5 do 20%, što je potrebno za optimalan rast stanica (Freshney, 2005). Prednost upotrebe seruma je to što osigurava esencijalne nutrijente, potiče adheziju stanica i time omogućuje njihov rast, sadrži hormone i proteine kao npr. transferin, potreban za prijenos željeza u stanicu te štiti stanice od proteaza. Uz transferin prisutni su i albumin, globulin i fibronektin. U serumu se nalaze i polipeptidi, masti,

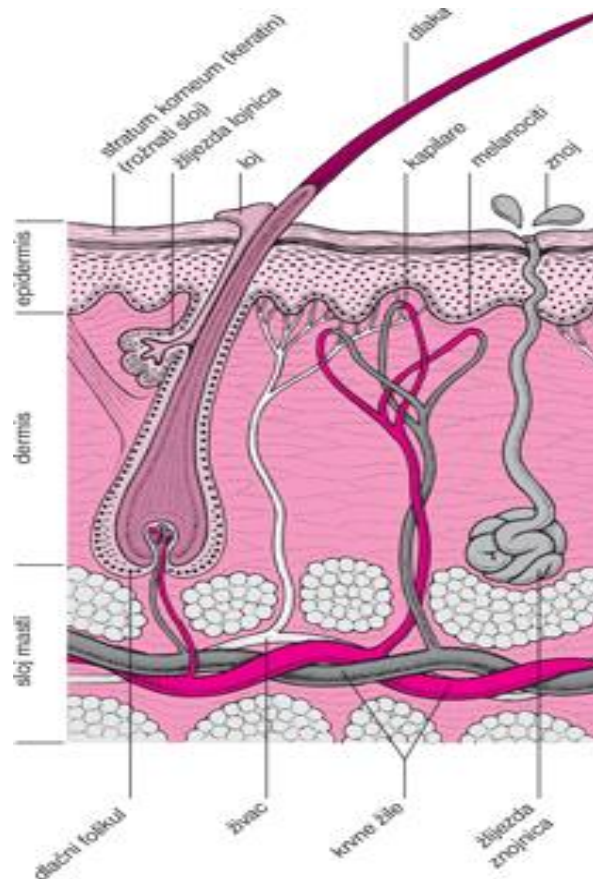
ugljikohidrati, faktori rasta, hormoni i anorganski minerali (Freshney, 2005; Yang i Xiong, 2012). Upotreba seruma u mediju osim prednosti ima i niz nedostataka. Skup je, može utjecati na fiziološku varijabilnost, često je kontaminiran virusima te uz faktore rasta sadrži i inhibitore rasta (Freshney, 2005). Radi svega navedenog sve češće se primjenjuju obogaćeni *serum-free* mediji, koji sadrže hormone i faktore rasta s kojima je moguća kultivacija stanica bez dodatka seruma. No, prije upotrebe takvog medija stanice moraju biti prilagođene za rast u tim uvjetima (Freshney, 2005). Korištenje kultura ljudskih stanica kao modela za složenije biološke sustave sastavni je dio molekularne biologije i biomedicinskih istraživanja. Istraživanja koja uključuju upotrebu kultura stanica pružaju bolje razumijevanje u područjima razvojne biologije te ekspresije proteina i gena (Biocompare, 2019). Humane stanične linije imaju veliku primjenu. Unaprijedile su znanstvena istraživanja i koriste se u:

- proizvodnji cjepiva,
- testiranju metabolizma i citotoksičnosti lijekova,
- proizvodnji antitijela,
- proučavanju funkcije gena,
- stvaranju umjetnih tkiva (npr. umjetna koža),
- sintezi biološki aktivnih spojeva (npr. terapijskih proteina) (Kaur i Dufour, 2012).

2.3. Građa i fiziologija kože

Koža prekriva cijelu površinu tijela i najveći je organ našeg organizma te čini 18% ukupne mase čovjeka. Primarni zadatak kože je zaštita cijelog organizma i unutarnjih organa od negativnih utjecaja iz okoline. Ona predstavlja barijeru za apsorpciju. U koži postoje različiti receptori koji podražaje iz okoline pretvaraju u signale i tako potiču kožu, a i cijeli organizam na adekvatne funkcionalne i morfološke promjene. Koža ima nekoliko funkcija: zaštita od mehaničkih, tj. fizikalnih, kemijskih i bioloških podražaja, dehidracije (isušivanja), sunčeve svjetlosti i patogenih mikroorganizama. Posjeduje termoregulatornu, imunološku i sekretornu funkciju te osjetne funkcije (bol, svrbež, dodir i pritisak, vibracije, hladnoću i toplinu) (Lipozenčić, 2004). U koži se skupljaju i iz nje izlučuju voda, znoj, loj, masnoća, soli i druge otopljene tvari. Voda daje koži elastičnost, prozračnost, odnosno baršunast izgled te omogućuje normalno odvijanje biokemijskih procesa u koži (Lipozenčić, 2004). Koža se sastoji od tri sloja: epidermis - epitelni sloj ektodermalnog podrijetla, dermis (korijum) - sloj od vezivnog tkiva mezodermalnog podrijetla i treći sloj subkutis (potkožno tkivo), koji spaja

kožu s podlogom i anatomski odgovara površinskoj fasciji. Epidermis se uglavnom sastoji od oroženoga mnogoslojnog pločastog epitela, ali sadrži i tri posebne, manje brojne vrste dendritičkih stanica: melanociti, Langerhansove stanice i Merkelove stanice (Bradamante i Kostović-Knežević, 2005; Marinović Kulišić, 2016). Na slici 3 prikazana je građa kože.



Slika 3. Građa kože (Medicinski priručnik za pacijente, 2014)

2.3.1. Apsorpcija putem kože

Koža je izložena ksenobioticima poput plinova, otapala i tvari u otopinama. Najčešća mjesta ulaska toksičnih tvari u ljudskih organizam su koža, pluća i gastrointestinalni trakt. Epidermis, epitelni sloj, uglavnom se sastoji od oroženog mnogoslojnog pločastog epitela. Idući od korijuma prema površini, epidermis se sastoji od pet slojeva stanica koje stvaraju roževinu ili keratin. Stoga se orožene epitelne stanice nazivaju keratinociti (Bradamante i Kostović-Knežević, 2005). Epidermis je na površini ravan, a na bazalnoj strani izbočen u dubinu, u različito dugačke grebene. Na ravnoj površini se nalazi sloj ljuštenja (disjunkcije), u kojemu se keratinociti pojedinačno odvajaju i otpadaju. Mrtve stanice s keratinom čine ga

ograničavajućim za apsorpciju (Kmetič, 2016). Epidermis čovjeka obnavlja se svakih 15-30 dana, ovisno o dobi, području tijela i drugim čimbenicima. Sve se mitoze u epidermisu zbivaju u tzv. Malpighijevu sloju koji sadržava epidermalne matične stanice (Bradamante i Kostović-Knežević, 2005). Diobu stanica kože potiče epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor* – EGF). Epiderma se različito mijenja kod bolesti kože (Kmetič, 2016). Koža je jako rastezljiva i obiluje osjetnim živcima. Jedna od najvažnijih zadaća kože jest primanje podražaja iz okoline. U epidermisu prisutne su folikule dlaka (Bradamante i Kostović-Knežević, 2005). Kroz folikule korijena dlaka te žlijezde lojnice penetracija toksikanta je omogućena. Resorpcija kroz kožu odvija se pasivnom difuzijom. To se primarno odnosi na lipofilne tvari. Kao primjer možemo navesti otapalo poput ugljikovog tetraklorida (CCl_4) koje nakon dermalne apsorpcije uzrokuje sistemsku toksičnost, odnosno oštećenja jetre. Nadalje, insekticid paration nakon kontakta s kožom i apsorpcije može dovesti do smrtnosti obzirom na biotransformacijsku aktivnost stanica kože koje ga prevode u znatno toksičniji - paraokson. Takav slučaj zabilježen je u poljoprivrednih radnika (Kmetič, 2016). Osim liposolubilnih spojeva, dobro se apsorbiraju i male, u vodi topive, polarne molekule (npr. hidrazin ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$)) koje mogu izazvati sistemske i lokalne toksične učinke. Stupanj i brzina apsorpcije kroz kožu ovise o mjestu dodira toksikanta i njegovoj koncentraciji, a faktori koji pospješuju dermalnu apsorpciju su: vlažnost kože, temperatura, oštećenje kože, organska otapala (benzin), otopine detergenata koji pospješuju penetraciju i sl. Također, do povećane apsorpcije dolazi ukoliko nastanu oštećenja na koži jer si toksična tvar olakšava apsorpciju na mjestu kontakta s oštećenjem (Kmetič, 2016). Obično se razlikuje debela koža (glatka, bez dlaka, ćelava), koja se nalazi na dlanovima i tabanima te tanka koža (dlakava), koja se nalazi drugdje na tijelu. Oznake "debela" i "tanka" odnose se na debljinu epidermalnog sloja, koja iznosi između 75 i 150 μm na tankoj koži, a između 400 i 600 μm na debeloj koži (Bradamante i Kostović-Knežević, 2005). Stoga je za apsorpciju bitno istaknuti da je unos toksikanta ovisan i o mjestu ulaska (taban vs. tjeme) (Kmetič, 2016). Zbog svoje veličine koža sadržava velik broj limfocita i Langerhansovih stanica. Langerhansove stanice zvjezdolikog su oblika, nalaze se uglavnom u nazubljenom sloju epidermisa i čine 2-8% stanica. One mogu vezati antigene i predočiti ih T-limfocitima. Sudjeluju u stimulaciji T-limfocita pa zato imaju važnu ulogu u imunskim reakcijama kože. Odnosno, u nekim vrstama imunskih odgovora epidermis ima važnu ulogu (Bradamante i Kostović-Knežević, 2005).

2.3.2. HaCaT stanična linija

Kao što je navedeno, epidermis je slojevit epitel sastavljen od velikog broja keratinocita. Keratinociti su dobili naziv po svojoj karakterističnoj diferencijacijskoj aktivnosti sinteze keratina koji epidermisu daje karakterističnu čvrstoću (Alberts i sur., 2002). Epidermis se obnavlja matičnim stanicama koje leže u njenom bazalnom sloju. Vanjski slojevi epidermisa tijekom života zamijene se i do tisuću puta (Alberts i sur., 2002). Keratinociti čine 95% epidermalnih stanica. Primarno, oni imaju strukturnu i barijernu funkciju. HaCaT je monoklonska stanična linija keratinocita. HaCaT stanice se kultiviraju uz 5% CO₂ na 37 °C u DMEM mediju s 10% FBS seruma uz 2,2 mM glutamina, 100 U mL⁻¹ penicilina i 100 mg mL⁻¹ streptomicina. Tako uzgojena linija prilagođena je dugoročnom rastu bez dodataka čimbenika rasta. Pokazuje normalnu morfogenezu i izražava sve glavne površinske biljege izoliranih keratinocita. Keratinociti su aktivni sudionici u epidermalnom popravku i imunološkoj obrani kože putem izlučivanja faktora rasta, citokina i kemokina. Nakon stimulacije, HaCaT stanice diferenciraju i ekspimiraju specifične markere diferencijacije. Također, mogu formirati slojevite epidermalne strukture. Imaju sposobnost vraćanja iz diferenciranog oblika u bazalno stanje promjenom koncentracije Ca²⁺ u serumu. Nadalje, zadržavaju sposobnost stvaranja dobro strukturiranog epidermisa nakon transplantacije *in vivo* (Colombo i sur., 2017). Kultura primarnih humanih keratinocita često se upotrebljava u istraživanju imunološkog i upalnog odgovora. Interpretacija eksperimentalnih podataka može biti komplicirana radi donatorske varijabilnosti, ograničenog životnog vijeka stanica i varijacija između uzoraka (Colombo i sur., 2017). Također, HaCaT stanice široko su korištene u proučavanju iritacije kože, karcinoma kože, genotoksičnosti, mutagenosti i citotoksičnosti, kao i za ispitivanja štetnih učinaka UV zračenja. Koristiti se i za proučavanje toksičnosti tekstilnih kemikalija i tkanina koje ih sadrže (Klemola i sur., 2007).

2.4. Štetne tvari na tekstilijama

Svakodnevno smo izloženi direktnom kontaktu s tekstilijama. Odjeća koju nosimo, posteljina na kojoj spavamo, ručnici kojima se sušimo i namještaj na kojemu sjedimo samo su neki od primjera. Svemu navedenom dodaju se različite kemikalije kako bi im se poboljšala svojstva, no u nekih ljudi one mogu izazvati zdravstvene probleme kao što je pretjerana kožna osjetljivost i alergijske reakcije (ECHA, 2019). Tekstil je heterogena skupina proizvoda. Proizvodnja tekstila je kompleksan proces koji uključuje niz koraka: proizvodnja i

predobrada, bojenje, tiskanje i proces dorade. U svakom koraku postupka proizvodnje koriste se različite supstance (Nijkamp i sur., 2014). U postupku predobrade tekstil se priprema za bojenje, tiskanje i procese dorade. Izbor koraka prerade i izbor tvari su specifične za vrstu vlakna od kojih je tkanina načinjena. Prirodna vlakna trebaju više kemijske obrade kako bi se dobila tkanina koja je mekana ili otporna na skupljanje. Za razliku od prirodnih vlakana, sintetička vlakna trebaju više antistatičkih tretmana od ostalih materijala. Predobrada može biti kemijska, mehanička ili toplinska. Osim učinka čišćenja, predobrada tekstila povećava apsorpciju boja i poboljšava stabilnost materijala (Nijkamp i sur., 2014). Nakon same proizvodnje uspostavljena je metoda prioritizacije za identificiranje korištenih opasnih tvari u tekstilnim proizvodima. Opasne tvari su klasificirane kao kancerogene, mutagene, potencijalno toksične za reproduktivni sustav, tvari koje uzrokuju akutnu dermalnu toksičnost, osjetljivost kože i specifičnu toksičnost za ciljni organ (engl. *Specific Target Organ Toxicity*, STOT). Poznato je da odjeća štiti kožu od utjecaja okoline i pomaže joj u regulaciji temperature i vlažnosti kože, ali ona može predstavljati i prijetnju za zdravlje ljudi radi prisutnosti štetnih tvari u odjeći. Termoregulacija, posredovana lokalnim protokom krvi i znojenjem, povećava transport tvari od tekstila do kože. Antimikrobni tekstil može ometati nespecifični obrambeni mehanizmi kao što je kožna mikroflora, a međusobno djelovanje odjeće s imunološkim sustavom može dovesti do alergijskog kontaktnog dermatitisa te je stoga naročito važno kontrolirati prisutnost opasnih tvari da bi se spriječile posljedice izazvane tvarima koje narušavaju zdravlje čovjeka (Nijkamp i sur., 2014). Radi svega navedenog, napravljena je lista tvari ograničenih za primjenu u tekstilu. Na listi se npr. nalaze: spojevi žive, tris (2,3 dibromopropil) fosfat, polibromirani bifenili (PBB), kadmij, azo boje, dimetilfumarat (DMF), ftalati, difenileter, formaldehid i pentaklorofenol (Nijkamp i sur., 2014). Bitno je naglasiti da u tekstilnoj industriji postoji *Oeko-Tex Standard 100* koji označava globalnu zdravstvenu oznaku za tekstilne materijale. Oznaka jamči da tekstil ne uzrokuje alergije ili druge zdravstvene probleme kod potrošača. Globalni standard za organski tekstil (engl. *Global Organic Textile Standard*, GOTS) razvijen je s ciljem definiranja zahtjeva koji su priznati u svijetu. On osigurava organski status tekstila od sakupljanja sirovina ekološkom i društveno odgovornom proizvodnjom svih proizvoda do načina označavanja kako bi se potrošaču pružila vjerodostojna sigurnost. GOTS zahtjeva upotrebu prirodnih vlakana za obradu i proizvodnju tekstila, a isključivo zabranjuje upotrebu toksičnih teških metala, formaldehida, aromatskih otapala, funkcionalnih nano čestica, genetski modificiranih organizama (GMO) i njihovih enzima, azo boja koje oslobađaju kancerogene spojeve amina, upotrebu ftalata i PVC-a (polivinilklorida) (Nijkamp i sur., 2014).

2.5. Alternativni testovi toksičnosti

Toksičnost je štetan učinak koji neka tvar može izazvati u organizmu, a kao posljedica toksičnog djelovanja nastaju direktna oštećenja stanica te strukturni i funkcionalni poremećaji na razini tkiva, organa i organskih sustava. Ispitivanja toksičnosti se mogu provoditi *in vitro* i *in vivo* ekperimentima (Kniewald i sur., 2005). Za tvari kojima mogu biti izloženi čovjek i drugi živi organizmi u okolišu obavezno je testiranje toksičnosti, a to su: lijekovi (uključujući lijekove u veterini), aditivi hrani, kontaminanti hrane porijeklom iz okoliša, industrijske kemikalije, pesticidi, tvari svakodnevne upotrebe u domaćinstvu i kozmetički pripravci.

Odabir testova toksičnosti ovisan je o vrsti kemijske tvari koja se ispituje, predviđenoj upotrebi, mogućim načinima izloženosti te propisima zemlje u kojoj se provodi registracija (Kmetič, 2018). Klasičnim (*in vivo*) testovima toksičnosti istražuje se akutna (jedna doza), subakutna (ponavljanje doze do jednog mjeseca), subkronična toksičnost (ponavljane doze od 1-3 mjeseca) i kronična toksičnost (ponavljanje doze od 3 mjeseca do dvije godine). Sve širu primjenu nalaze alternativni (*in vitro*) testovi. Takvi testovi uključuju primjenu različitih sustava kao što su stanične frakcije, stanične linije, primarne stanične kulture te dijelovi tkiva i kulture organa (Atterwill, 1995). *In vitro* testovi se koriste za ispitivanje mutagenosti, iritacije, reproduktivne toksičnosti, toksičnosti na ciljne organe, imunotoksičnosti, endokrine toksičnosti, neurotoksičnosti, nefrotoksičnosti, citotoksičnosti i kancerogenosti te se njima određuju potencijalno aktivne tvari i mehanizmi kroz koje ostvaruju toksično djelovanje (Atterwill, 1995).

Četiri su glavna čimbenika utjecala na razvoj *in vitro* toksikologije: potreba za jednostavnim i jeftinim učinkovitim sustavima za testiranje velikog broja kemikalija, javni i zakonodavni pritisak da se smanji upotreba eksperimentalnih životinja, potreba za boljim razumijevanjem mehanizma toksičnosti te želja za korištenjem ljudskih stanica i tkiva kad god je to moguće (Kniewald i sur., 2005).

Kod *in vitro* ispitivanja koriste se animalne ili humane stanice jetre, bubrega, ovarija, testisa, hipofize, štitnjače, limfnih čvorova, embrionalne animalne stanične linije itd. i mikroorganizmi (npr. Amesov test). Mogu se koristiti stanične frakcije, fragmenti tkiva ili primarne kulture stanica. Stanice se mogu iskoristiti za ispitivanja u virologiji, genetičkom inženjerstvu i

genskoj terapiji. Kao metode određivanja citotoksičnosti često se koriste *Kenacid Blue* metoda, *MTT*, *Trypan Blue* i *Neutral Red* metoda (Atterwill, 1995). *In vitro* testovi osiguravaju informacije o tome kako pojedini kontaminanti ili tvari koje su s namjerom dodane u hranu (poput aditiva) reagiraju sa staničnim komponentama i makromolekulama, a to je najbolje ispitati na humanim stanicama. Naročito su prikladni za proučavanje kemikalija male molekulske mase i mikronutrijenata. Kemikalije male molekulske mase odnose se na prehrambene aditive, zaslađivače, tvari koje se koriste u proizvodnji hrane, kontaminante, pesticide, veterinarski ostaci i prirodni toksikanati, dok su pod mikronutrijente svrstani suplementi poput vitamina, minerala te nenutritivne bioaktivne komponentne (Eisenbrand i sur., 2002). Prednost *in vitro* testova je to što omogućuju brz i učinkovit način za *screening* kemikalija, omogućuju dodatne uvide prilikom ekstrapolacije rezultata dobivenih korištenjem eksperimentalnih životinja na ljude, korisni su za razumijevanje opasnih utjecaja kemikalija na staničnom i molekularnom nivou i omogućuju proučavanje veza između strukture ispitivanog spoja i njegovog mehanizma djelovanja na staničnoj razini (Eisenbrand i sur., 2002). Uz prednosti postoje i neki nedostaci upotrebe *in vitro* testova toksičnosti. Nedostatak je izostanak validacije i službenog vrednovanja. Također, prilikom provedbe eksperimenta tvar koja se ispituje može utjecati na sastav medija za uzgoj i uzrokovati promjene pH vrijednosti pa tako i utjecati na ispravnost dobivenih rezultata. Nadalje, kada ispitivana tvar reagira sa sastojcima medija za uzgoj, moguće je da se onemogući prtok hranjivih tvari u stanicu. U ovoj vrsti testova toksičnosti kao nedostatak ističe se i nedovoljna prisutnost ili potpuna odsutnost metaboličke aktivacije u staničnim sustavima kao i izmjenjena svojstva stanica (Atterwill, 1995).

U proteklih nekoliko godina puno pažnje posvećeno je razvoju *in vitro* modela koji mogu zamijeniti životinje u ispitivanjima kožnih iritacija. Modeli organa ili transplantata prikladni su samo za kratkotrajnu izloženost uzoraka kože ispitivanim spojevima i njihova dostupnost limitirana je dostupnošću ljudske kože. Na modelima koji koriste kulturu keratinocita ili fibroblasta moguća je proizvodnja velikog broja stanica, kao i ispitivanja toksičnosti s različitim tvarima u širokom rasponu koncentracija (Ponec, 1992).

Alternativni testovi toksičnosti se većinom koriste kao predtestovi klasičnim (animalnim) testovima za utvrđivanje raspona aktivnosti tvari ili određivanje raspona toksičnih koncentracija. Koriste se i za određivanje odnosa koncentracije prema vremenu izlaganja te mehanizma djelovanja određene tvari (Atterwill, 1995).

Koža je svakodnevno izložena okolišnim čimbenicima, uključujući farmaceutske, industrijske i kozmetičke proizvode (Ponec, 1992). Izlaganje kože kemijskim tvarima može dovesti do raznih kožnih reakcija, kao što je iritantni kontaktni dermatitis, osjetljivost, promijenjena pigmentacija, nastanak akni i pojava karcinoma (Sandt i sur., 1999). U principu, vanjski čimbenici na koži mogu izazvati dvije vrste reakcija - alergijski dermatitis, u kojemu se javlja imunološki odgovor, te iritacijski dermatitis. Iritacijski dermatitis izazvan je direktnim kontaktom toksične tvari i epidermalnih keratinocita koji uzrokuje izravno oštećenje stanica ili promjenu u sintezi raznih medijatora što na posljepku dovodi do indukcije odgovora. *In vivo* kožna iritacija uključuje kompleksan proces koji je često pojačan djelovanjem i nekih drugih organa. Radi te kompleksnosti, teško je razviti *in vitro* model koji može kompletno zamijeniti *in vivo* model. U uzgoju kulture stanica kože, mali dio svježe izrezane kože stavlja se u posudu za uzgoj kulture, prekriva se medijem za uzgoj i inkubira na 37 °C određeni vremenski period. Upotreba tako uzgojenih kultura je limitirana veličinom dostupnog tkiva pa se samo mali broj eksperimenata može provesti. Također, većina istraživanja može ispitati samo akutnu toksičnost (Ponec, 1992). Testiranje proizvoda za njegu kože i ostale kozmetike provodilo se na ljudskoj koži sve do 1940. godine kada su se razvile metode za *in vivo* testiranja na životinjama. No, Europska unija donijela je zakon o zabrani ispitivanja sigurnosti kozmetičkih proizvoda i njihovih sastojaka upotrebom životinja, te je industrija bila prisiljena pronaći alternativu ili razviti nove modele testiranja (Yu i sur., 2019). Korištenje *in vitro* sustava (staničnih frakcija, staničnih linija, primarnih staničnih kultura, dijelova tkiva, kulture organa itd.) ima široku primjenu u takvim toksikološkim istraživanjima. *In vitro* sustavi upotrebljavaju se u istraživanjima molekularnih, staničnih i fizioloških mehanizama toksičnosti izazvanih kemikalijama. Razvoj i uvođenje strategija testiranja koje primjenjuju kombinaciju eksperimentalnih podataka iz niza alternativnih metoda (fizikalno-kemijske tehnike, QSAR – *engl. Quantitative Structure Activity Relationship* tehnike, koja se temelji na kvantitativnoj povezanosti strukture i aktivnosti tvari, te metaboličko i kinetičko modeliranje) omogućuje najefikasniju procjenu toksičnosti, kao i istodobno smanjenje broja laboratorijskih životinja potrebnih u postupcima testiranja toksičnosti spojeva (Kniewald i sur., 2005). Trenutno se koriste različiti *in vitro* modeli za određivanje toksičnosti na koži, uključujući besmrtno stanične linije keratinocita, konvencionalne kulture keratinocita, eksplantat kože ili kulture organa i dr. (Sandt i sur., 1999).

2.5.1. Kenacid Blue metoda

Kenacid Blue je boja koja se prolaskom kroz staničnu membranu veže za proteine u živim stanicama. Razvili su ju Knox i suradnici, a detaljno je opisana 1976. godine (Bradford, 1976). U toksikologiji se primijenjuje kao alternativni test za praćenje mogućih toksičnih učinaka ksenobiotika. Jednostavna je, točna i daje reproducibilne rezultate. *Kenacid Blue* metodom se mjeri ukupna biomasa bojanjem staničnih proteina bojom *Commassie Brilliant Blue R-250*. Stanice se kratko ispiru, fiksiraju i bojaju, a inkorporirana boja se potom oslobađa iz stanica u desorpcijsku otopinu. Povećanje ili smanjenje u broju stanica (ukupna biomasa) rezultira promjenom u količini boje inkorporirane u stanicama u kulturi. Ta promjena boje ukazuje na stupanj citotoksičnosti uzrokovane testiranim materijalom. Postupak se sastoji od slijedećih koraka:

1. nacičepeljivanje stanične kulture i tretman ispitivanim ksenobiotikom;
2. kratkotrajno ispiranje stanica;
3. fiksiranje stanične kulture;
4. bojanje *Kenacid Blue* bojom;
5. vezanje boje na ukupne stanične proteine (inkubacija 20 minuta na 37 °C);
6. odbojavanje;
7. intenzitet nastalog obojenja određuje se mjerenjem apsorbancije (A) pri valnoj duljini (λ) od 577 nm u odnosu na slijepu probu;
8. usporedba i izračun postotka inhibicije u staničnom rastu nastalog djelovanjem ksenobiotika;
9. određivanje IC vrijednosti.

2.5.2. Neutral Red metoda

Neutral Red je kationska boja koja se prolaskom kroz staničnu membranu u živoj stanici aktivnim transportom akumulira u njenim lizosomima te se njenom primjenom može odrediti aktivnost lizosoma i Golgijevih tijela u stanicama. Razvili su ju Borenfreud i Puerner, a metoda je opisana 1985. godine (Borenfreud i Puerner, 1985) kao alternativni test za utvrđivanje toksičnosti potencijalnih ksenobiotika (Husøy i sur., 1993). Metoda je korištena kao indikator citotoksičnosti u kulturi primarnih hepatocita. Brza je, jednostavna za izvođenje, točna, daje reproducibilne rezultate te je pogodna za istovremeni rad s velikim brojem kultura. Može se koristiti za određivanje raspona koncentracija prije provedbe nekog

eksperimenta (Fautz i sur., 1991). Kada stanice upiju boju i inkorporiraju ju u lizosome, stanice se ispiru, a zatim se inkorporirana boja oslobađa iz stanica u zakiseljenoj otopini etanola. Promjena broja stanica rezultira pratećom promjenom u količini apsorbirane boje. To ukazuje na stupanj citotoksičnosti uzrokovan toksikantom. Postupak se sastoji od slijedećih koraka:

1. naciepljivanje stanične kulture i tretman ispitivanim ksenobiotikom;
2. fiksiranje stanične kulture;
3. bojanje *Neutral Red* bojom;
4. vezanje boje unutar lizosoma (inkubacija 3 sata na 37 °C);
5. odbojavanje;
6. intenzitet nastalog obojenja određuje se mjerenjem apsorbancije (A) pri valnoj duljini (λ) od 540 nm u odnosu na slijepu probu;
7. usporedba i izračun postotka inhibicije u staničnom rastu nastalog djelovanjem ksenobiotika;
8. određivanje IC vrijednosti.

2.5.3. *MTT* metoda

Tetrazolijeva sol *MTT* (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) je u vodi topljiva sol žute boje koja se djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza u živim stanicama prevodi u ljubičaste kristale formazana netopljive u vodi. Oni se mogu otopiti u organskom otapalu te se spektrofotometrijski može odrediti intenzitet obojenja. Primjenom *MTT* metode moguće je odrediti aktivnost tog enzima (Lim i sur., 2015). Formazan se nakuplja u vijabilnim stanicama jer ne može proći kroz staničnu membranu. *MTT* - test je izvorno razvio Mosmann 1983. god, ali su ga kasnije modificirali Denizot i Lang 1986. god. (Husøy i sur., 1993). *MTT* je brza kolorimetrijska metoda za praćenje stanične proliferacije i citotoksičnosti. Promjena broja stanica rezultira pratećom promjenom u količini formiranih kristala formazana što ukazuje na stupanj citotoksičnosti.

Postupak se sastoji od slijedećih koraka:

1. naciepljivanje stanične kulture i tretman ispitivanim ksenobiotikom;
2. tretman stanica *MTT*-om i inkubacija 3 sata na 37 °C;
3. prevođenje tetrazolijeve soli *MTT* djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza u obojeni formazan (*MTT* - žute boje, nastali kristali formazana - ljubičaste boje);

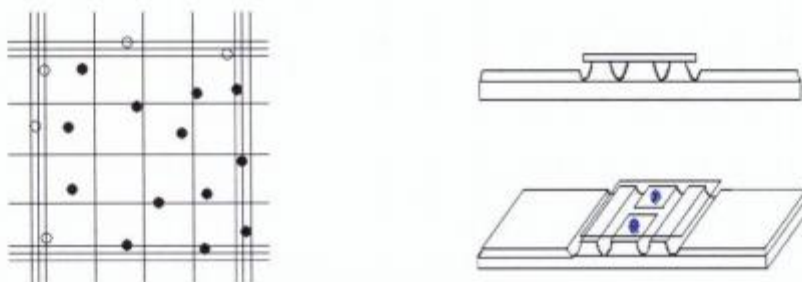
4. kristali formazana se otapaju u organskim otapalima;
5. intenzitet nastale boje određuje se spektrofotometrijski pri 540 nm i 630 nm uz slijepu probu;
6. usporedba i izračun postotka inhibicije u staničnom rastu nastalog djelovanjem ksenobiotika;
7. određivanje IC vrijednosti.

2.5.4. Trypan Blue metoda

Uzorak od 20 μL suspenzije prethodno tripsiniziranih stanica resuspendira se s 20 μL 0,4 %-tne otopine boje *Trypan Blue* te se 20 μL te smjese nanese na Fuchs-Rosenthalovu komoricu za brojanje stanica i pod svjetlosnim mikroskopom izbroje žive (nebojane) i mrtve (plavo obojane) stanice. Mrtve se stanice oboje budući da boja lako prolazi kroz membranu narušenog integriteta. Ukupan broj živih stanica u uzorku odredi se prema formuli:

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

Fuchs-Rosenthalova komorica podijeljena je na 16 kvadrata, a broje se stanice unutar četiri središnja kvadrata. Kako se iste stanice ne bi brojale više puta, u svakom se kvadratu uz stanice unutar samog kvadrata broje i stanice na donjem i desnom rubu. Dubina komorice je 0,2 mm, a površina iznosi 0,0625 mm² (slika 4).



- stanice koje se ne broje
- stanice koje se broje

Slika 4. Fuchs-Rosenthal-ova komorica (LO-Laboroptik, 2010)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Biološki materijal

U radu je korištena HaCaT monoslojna stanična linija humanih keratinocita.

3.1.2. Tekstilije

U radu je korišten odabrani tekstilni materijal čija je namjena korištenje u bolničkom okruženju.

3.1.3. Kemikalije

U radu su korištene slijedeće kemikalije:

- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), Sigma-Aldrich, St.Luis, SAD
- *Heat Inactivated FBS – Fetal Bovine Serum*, GIBCO, Life Technologies, SAD
- 0,25 % *Trypsin-EDTA* 1X (trypsin – EDTA), Sigma-Aldrich, St.Luis, SAD
- apsolutni et
- anol, Alkaloid, Skoplje, Makedonija
- DMSO (dimetilsulfoksid), Kemika, Zagreb
- boja tripan plavo (*Trypan Blue*), Sigma-Aldrich, St.Luis, SAD
- MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*), Sigma-Aldich, St. Louis, SAD

3.1.4. Otopine i puferi

Ishodna otopina *MTT*

<i>MTT</i>	25 mg
PBS	5 mL

- sterilno profiltrirati.

0,4%-tna otopina *Trypan Blue*

<i>Trypan Blue</i>	0,08 g
PBS pufer	20 mL

- profiltrirati

3.1.5. Oprema i uređaji

U radu je korištena slijedeća oprema:

- komora za sterilan rad (laminar); Twin 30, Gelaire Flow Laboratories, Velika Britanija
- inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂; IR 1500, Automatic CO₂, Flow laboratories, Velika Britanija
- čitač mikrotitarskih pločica; model LKB 5060-006, LKB Vertriebs GmbH, Beč, Austrija
- inverzni mikroskop; Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- svjetlosni mikroskop; LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- analitička vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- tehnička vaga, Mettler P1210, Zürich, Švicarska
- centrifuga LC-321, Technica železniki, Slovenija
- sterilni filteri (promjer filtra 15 mm; promjer pora 0.22 µm)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Primjer ispitivanja potencijalne štetnosti tekstilnih materijala

3.2.1.1. Kultivacija HaCaT stanica

U ispitivanju citotoksičnosti tvari kojima je impregnirana ili koje su prisutne na odabranoj tkanini korištene su HaCaT stanice humanih keratinocita koje rastu u monosloju. Stanice su uzgajane u DMEM mediju s dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS). Uzgajane su u T-bocama u uvjetima modificirane atmosfere (5% CO₂, 95% zraka) na 37 °C. Manipulacija stanicama zahtijeva sterilne uvjete, pa su se sve manipulacije vršile u komori za sterilan rad – laminaru. Budući da HaCaT stanična linija raste u monosloju, stanice je prije prenošenja u veće mjerilo bilo potrebno odvojiti od površine T-boce pomoću tripsina. Slijedilo je brojanje stanica u Fuchs-Rosenthal-ovoj komorici te se suspenzija stanica razrijeđivala dodatkom svježeg medija za uzgoj.

3.2.1.2. Određivanje vijabilnosti stanica MTT metodom

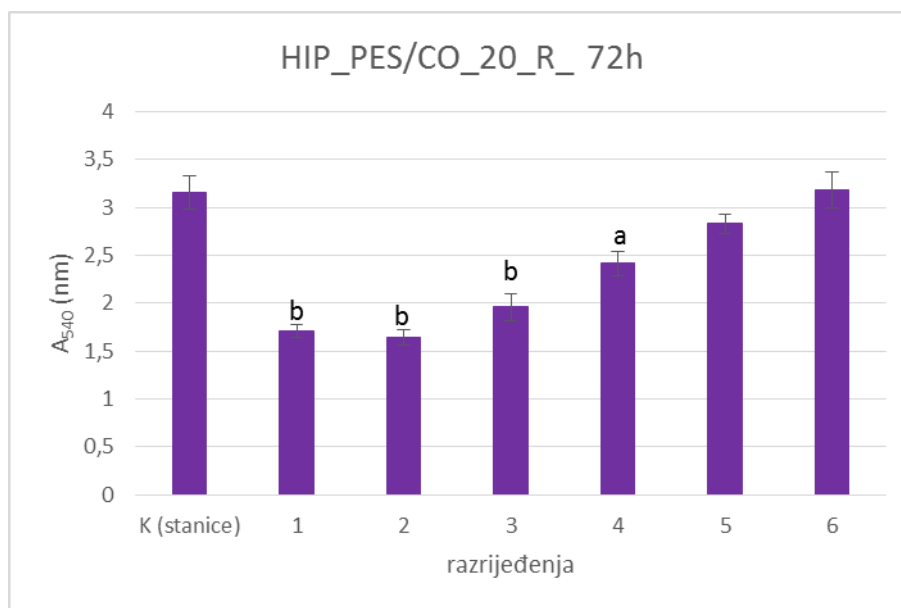
Za ispitivanje potencijalne štetnosti tekstilnih materijala odabrana je tkanina koja se sastoji od mješavine pamuka i poliestera, a obrađena je s 20% lužine (HIP_PES/CO_20R). Luženje uzorka provedeno je na način da se u otopinu u koju je uronjena tkanina dodalo 20% NaOH i 8 g L⁻¹ SUBITOL MLF-a. Uzorak je obrađen s 10 g L⁻¹ kitozana, 70 g L⁻¹ limunske kiseline, 65 g L⁻¹ natrijevog hipofosfit pentahidrata i 1 g L⁻¹ felosan NOP-a. Tkanina je isprana 20 puta. Proveden je alternativni test toksičnosti ispitivanja potencijalno štetnih tvari na tekstilijama i određen je njihov mogući toksični učinak na stanice kože.

Kako bi se pratio učinak potencijalno štetnih tvari kojima su impregnirane tekstilije na proliferaciju HaCaT stanica, u bunariće na mikrotitarskoj ploči nacjepljuje se po 200 μL suspenzije HaCaT stanica u koncentraciji 1×10^5 stanica mL^{-1} medija za uzgoj. 24 sata nakon nacjepljivanja uklanja se medij u kojem su stanice rasle. Stanice se tretiraju različitim razrijeđenjima testne otopine na način da se u svaku jažicu dodaje po 200 μL svježe pripremljenog razrijeđenja. Izvorna otopina za testiranje je pripremljena na način da je u 10 mL medija za uzgoj stanica (1 mL seruma i 9 mL medija za uzgoj) dodan komad odabrane tkanine od 60 cm^2 (6 cm x 10 cm) te stavljen 2 sata na tresilicu na sobnoj temperaturi i potom 22 sata na inkubaciju na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. 24 sata kasnije otopina je sterilno filtrirana kroz filter veličine pora od $0,22 \mu\text{m}$. Istovremeno s praćenjem učinka ishodne otopine, praćen je i kontrolni uzorak stanica (200 μL) koje rastu u svježem mediju za uzgoj uz dodatak seruma. Nakon inkubacije od 72 sata vijabilnost stanica se provjerila provedbom *MTT* metode.

U bunariće na mikrotitarskoj ploči doda se 20 μL otopine *MTT-a*. Stanice se zatim inkubiraju 3 sata na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Potom se medij izvadi iz jažica i dodaje se 200 μL DMSO-a u kojem se otapaju nastali kristali formazana pri čemu se razvija ljubičasto obojenje. Intenzitet obojenja određuje se sprektofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 540 nm u odnosu na slijepu probu.

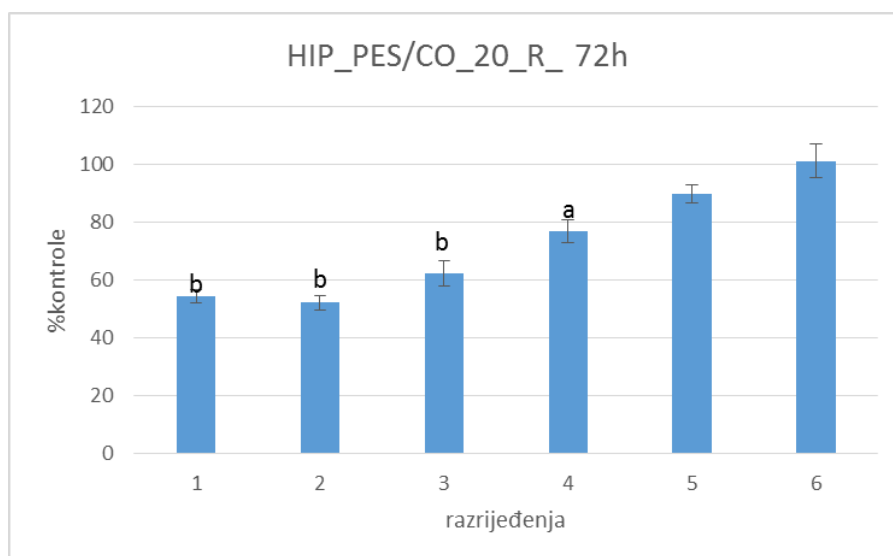
4. REZULTATI I RASPRAVA

Prema dobivenim rezultatima koje možemo vidjeti na slici 5 uočeno je da vijabilnost i proliferacija stanica značajno opada nakon 72 h izloženosti stanica ishodnoj otopini (pripremljenoj na način da je u 10 mL smjese seruma i medija za uzgoj dodan komad odabrane tkanine od 60 cm²) što implicira moguće štetne učinke kemikalija kojima je tekstilija impregnirana ili su na njoj prisutne. S povećanjem razrijeđenja ishodne otopine smanjuje se antiproliferativan učinak na stanice, a vijabilnost stanica je poboljšana.



Slika 5. Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) tvari kojima je impregnirana HIP_PES/CO_20R tkanina (1 - ishodna otopina, 2 – 1600 µL I.O. + 1600 µL medija uz dodatak 10% seruma (SM), 3 – 800 µL I.O. + 2400 µL SM, 4 – 400 µL I.O. + 2800 µL SM, 5 – 200 µL I.O. + 3000 µL SM, 6 – 100 µL I.O. + 3100 µL SM) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student t - test): ^ap<0,001, ^bp<0,01).

Statistički značajan učinak (p<0,001) na smanjenje vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolni uzorak (netretirane stanice) primijećen je pri razrijeđenju 400 µL ishodne otopine sa 2800 µL medija uz dodatak 10% seruma (SM) (uzorak 4, slika 6). Manje razrijeđena ishodna otopina (1:1; uzorak 2 i 1:3; uzorak 3) također je značajno inhibirala proliferaciju stanica, dok je pri najvećem ispitanom razrijeđenju ishodne otopine (1:31; uzorak 6) stanična vijabilnost jednaka onoj u kontrolnom uzorku (slika 6).



Slika 6. Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata (izražena kao % od kontrole - netretirane stanice) nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) tvari kojima je impregnirana HIP_PES/CO_20R tkanina (1 - ishodna otopina, 2 – 1600 μL I.O. + 1600 μL medija uz dodatak 10% seruma (SM), 3 – 800 μL I.O. + 2400 μL SM, 4 – 400 μL I.O. + 2800 μL SM, 5 – 200 μL I.O. + 3000 μL SM, 6 – 100 μL I.O. + 3100 μL SM) u odnosu na kontrolu (netretirane stanice (K)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t* - test): ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,01$.

Klemola i sur. (2007) proveli su ispitivanja u kojima su odredili citotoksičnost reaktivnih boja i obojenih tkanina koristeći humane keratinocitne HaCaT stanice *in vitro*. U proizvodnji tekstila obično se koriste reaktivne boje za bojenje pamuka i drugih vlakana na bazi celuloze. Reaktivne boje korištene u ovom ispitivanju pripadaju u kategoriju azo boja. Budući da su te boje kemijski reaktivne, mogu biti štetne, posebno u obliku praha. Stanice HaCaT bile su izložene s tri monoklortriazinil boje: žutoj, crvenoj i plavoj u različitim koncentracijama. Te tri boje su tipične komponente koje se koriste pri miješanju različitih boja. HaCaT stanice su također bile izložene vodenim ekstraktima obojenih tkanina. Nakon izloženosti od 72 sata, izmjeren je sadržaj proteina u uzorcima u usporedbi sa sadržajem proteina u ne izloženim stanicama. IC_{50} vrijednost za žuto bojilo bila je 237 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IC_{50} za crvenu 155 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dok je IC_{50} vrijednost za plavu boju bila 278 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Pamučne tkanine obojene pomoću iste tri reaktivne boje ekstrahirane su vodom i ekstrakti su analizirani pomoću HaCaT stanične linije. Vijabilnost stanica bila je dobra, jer je udio proteina u uzorcima bio preko 80% u usporedbi

sa stanicama koje nisu bile izložene, što pokazuje da niti jedan ekstrakt tkanine nije bio toksičan za stanice kože. HaCaT stanični test pokazao je toksičnost čistih boja dok obojene tkanine nisu imale štetni učinak. Humani keratinociti (HaCaT stanice) su se pokazali kao koristan alat za proučavanje toksičnosti boja i drugih tvari koje se primjenjuju na tekstil što je potvrđeno i ovim preliminarnim istraživanjem. Nadalje, Vihodceva i sur. (2017) proveli su ispitivanje procjene dermalne citotoksičnosti antibakterijskih pamučnih tkanina presvučenih sol-gel tehnologijom na epidermu koristeći HaCaT stanice *in vitro*. Zbog širokog spektra primjene, funkcionalnost medicinskog tekstila je od vitalne važnosti pa pored antibakterijskih svojstava komponente u izravnom dodiru s kožom moraju biti prilagođene koži. U ovom radu sol-gel tehnologijom tkanine su presvučene premazom od cinka i silicija. Nizom metoda koje su se paralelno provodile procjenjivala su se antibakterijska svojstva protiv patogenih mikroorganizama: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*.

Jedna od korištenih metoda u provedenom ispitivanju bila je procjena učinaka otopina sa solnim prahom na vijabilnost stanica. Morfologija i proliferacija stanica promatrana je nakon 48 h i 72 h te nakon 5 dana. Ispitivane koncentracije od 1 mg mL^{-1} i $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ pokazale su citotoksične učinke. Nakon tretmana u koncentraciji od $125 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, u vidnom polju su bili vidljivi keratinociti s minimalno promijenjenom morfologijom, ali je njihov broj bio znatno manji u usporedbi s kontrolom. Pri ovoj koncentraciji stanice su održive u kulturi, ali prisutnost otopine negativno utječe na diobu stanica. U koncentracijama koje ne prelaze $7,81 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, nijedan ispitivani uzorak nije pokazao citotoksičnost ili negativan učinak na diobu stanica. Da bi se procijenio dugoročni utjecaj koncentracije od $125 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ na staničnu morfologiju i diobu stanica, stanična kultura je analizirana i promatrana pod mikroskopom nakon inkubacije od 5 dana u prisutnosti otopine sa solnim prahom. Usporedbom rasta stanica nakon 48 h i 5 dana uočeno je da je aktivnost diobe i morfologija stanica jednaka kontrolnom uzorku stanica. Prema dobivenim rezultatima potvrđeno je da se sa sol-gel tehnologijom mogu postići antibakterijska svojstva protiv patogenih bakterija te da takve tkanine pri dugotrajnim kontaktom s kožom nemaju negativne posljedice na stanice kože. HaCaT stanice pokazale su se kao dobar stanični model za proučavanje dermalne toksičnosti.

5. ZAKLJUČAK

U toksikološkim istraživanjima koriste se *in vivo* i *in vitro* testovi za određivanje razine toksičnosti potencijalnog ksenobiotika. Iako testiranje na životinjama nije u potpunosti moguće zamijeniti drugim testovima, znanstvenici se prema pokusnim životinjama trebaju odnositi prema principu '3R' (*replacement* – zamjena, *reduction* – smanjenje broja, *refinement* – poboljšanje). Cilj toga principa je poboljšanje postojećih metoda koje bi dovelo do smanjenja broja životinja u istraživanju, manja invazivnost postupaka, minimaliziranje boli, patnje i stresa životinja tijekom istraživanja te razvoj i implementacija alternativnih metoda koje bi zamijenile testiranje na životinjama.

Danas se sve više koriste alternativni *in vitro* testovi toksičnosti. Upotreba *in vitro* sustava uključuje primjenu perfuzije organa i fragmenata tkiva, staničnih frakcija te primarnih staničnih kultura i staničnih linija. *In vitro* testovi imaju široku primjenu u toksikološkim istraživanjima. Koriste se kao pretest *in vivo* testovima u cilju utvrđivanja raspona toksičnih koncentracija, za određivanje odnosa koncentracije ispitivane tvari prema vremenu izlaganja te za određivanje mehanizama kroz koje tvar može ostvariti toksični učinak. Prednost alternativnih testova toksičnosti u odnosu na *in vivo* testove je to što su zamjenski sustavi za pokusne životinje, brže je dobivanje rezultata pokusa, jeftiniji su, koriste se kao pretestovi klasičnim testovima, nastaje manja količina toksičnog otpada i omogućuju detaljno izučavanje mehanizama djelovanja toksikanata. No, kao nedostatak ovih testova ističe se to što nisu u mogućnosti potpuno zamijeniti procese koji uključuju cjelokupan ADMET (apsorpcija, raspodjela, metabolizam, interakcija sa staničnim makromolekulama i izlučivanje) nedovoljna je ili potpuna odsutnost metaboličke aktivacije, izmjenjena su svojstva stanica u *in vitro* sustavima te nedostaje validacija ili službeno vrednovanje. Najčešće korištene *in vitro* metode u određivanju citotoksičnosti su: *Kenacid Blue*, *Neutral Red*, *Trypan Blue* metoda i *MTT* test. To su kolorimetrijski testovi kojima se u kratkom vremenu dobiva uvid o toksičnosti ispitivanog ksenobiotika. Metode su relativno jednostavne za izvođenje, točne i daju reproducibilne rezultate. Dobiveni rezultati se mogu koristiti u određivanju početne doze za *in vivo* ispitivanja. Uz sve navedeno, nastoji se postići što bolja korelacija između *in vitro* i *in vivo* modela kako bi se na osnovu *in vitro* provedenih pokusa moglo predvidjeti toksične učinke u živom organizmu.

Svakodnevnim kontaktom s tekstilijama izloženi smo brojnim štetnim tvarima koje one sadrže. Pri visokim koncentracijama štetnih tvari na tekstilijama i dugotrajnoj izloženosti moguće su brojne negativne posljedice kako na našu kožu tako i na cjelokupno zdravstveno stanje od različitih kožnih oboljenja do pretjerane osjetljivosti i alergijskih reakcija. Upotrebom prirodnih tekstilnih vlakana, te izbjegavanjem spojeva koji se mogu pronaći na tekstilu poput toksičnih teških metala, formaldehida, aromatskih otapala, azo boja (koje oslobađaju kancerogene spojeve amina), ftalata i PVC-a smanjujemo mogućnost za nastanak navedenih poteškoća.

U ovom radu preliminarno je provedeno ispitivanje mogućih štetnih učinaka kemikalija, kojima je odabrana tekstilija (mješavina pamuka i poliestera s 20% lužine, koja je isprana 20 puta) impregnirana ili su na njoj prisutne, upotrebom HaCaT stanične linije humanih keratinocita *MTT* metodom. Ispitan je učinak na dinamiku rasta i vijabilnost stanica. Primijenjen *in vitro* test u ovom radu dokazao je inhibicijsko djelovanje testnog uzorka u ispitanim koncentracijama na proliferaciju stanica humanih keratinocita te se test pokazao zadovoljavajućim.

6. POPIS LITERATURE

ABM (2004) Cell culture – an introduction. ABM - Applied Biological Materials, <https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/cell_culture_introduction.php>.

Pristupljeno 20. lipnja 2019.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002) Molecular biology of the cell, 4. izd., Garland Science, New York.

ATCC (2019) ATCC primary cell culture guide. ATCC - American Type Culture Collection, <https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Primary_Cell_Culture_Guide.ashx>

Pristupljeno 18. lipnja 2019.

Atterwill C. K. (1995) Alternative Method of Assessing Toxicity. U: *In Vitro* Toxicity Testing Protocols, **43**, O'Hare, S., Atterwill, C.K., ur., Humana Press, Totowa, New Jersey: 1-9.

Biocompare (2019) Human Cell Lines,

<[https://www.biocompare.com/pfu/111694/soids/36174-](https://www.biocompare.com/pfu/111694/soids/36174-2259403/Cells_and_Microorganisms/Human_Cell_Lines)

[2259403/Cells_and_Microorganisms/Human_Cell_Lines](https://www.biocompare.com/pfu/111694/soids/36174-2259403/Cells_and_Microorganisms/Human_Cell_Lines)> Pristupljeno 3. srpnja 2019.

BiteSizeBio (2017) What's in your cell culture medium? <<https://bitesizebio.com/37034/cell-culture-medium/>> Pristupljeno 24. lipnja 2019.

Borenfreud E., Puerner J. A. (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* **24**: 119-124.

Bradamante Ž., Kostović-Knežević LJ. (2005) Osnove histologije, 10. izd, Školska knjiga. str. 369-381.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

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. *Mediators of Inflammation* **2017**: 1–12.

Creative Bioarray (2019) Immortalized cell culture guide, <<https://www.creative-bioarray.com/support/immortalized-cell-culture-guide.htm>> Pristupljeno 17. lipnja 2019.

ECHA (2019) Clothes and textiles. ECHA- European chemicals agency. <<https://chemicalsinourlife.echa.europa.eu/clothes-and-textiles>> Pristupljeno 20. kolovoza 2019.

Eisenbrand G., Pool-Zobel B., Baker V., Balls M., Blauboer B. J., Boobis A., Carere A., Kevekordes S., Lhuguenot J.-C., Pieters R., Kleiner J. (2002) Methods of *in vitro* toxicology. *Food and Chemical Toxicology* **40**: 193-236.

Fautz R., Husein B., Hechenberger C. (1991) Application of the neutral red assay (NR assay) to monolayer cultures of primary hepatocytes: rapid colorimetric viability determination for the unscheduled DNA synthesis test (UDS). *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* **253**: 173–179.

Freshney R. I. (2005) Culture of Animal Cells – a Manual of Basic Technique, 5. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Husøy T., Syversen T., Jenssen J. (1993) Comparisons of four *in vitro* cytotoxicity tests: The MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. *Toxicology in Vitro* **7**: 149–154.

Invitrogen (2019) Cell culture basics, <<https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>> Pristupljeno 19. lipnja 2019.

Kaur G., Dufour J. M. (2012) Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* **2**: 1-5.

Klemola K., Pearson J., Lindstrom-Seppä P. (2007) Evaluating the toxicity of reactive dyes and dyed fabrics with the HaCaT cytotoxicity test, *AUTEX Research Journal* **7**: 217-223.

Kmetič I. (2016) Osnove toksikologije, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, Sveučilište u Zagrebu. <https://moodle.srce.hr/2018-2019/pluginfile.php/2070160/mod_resource/content/1/Apsorpcija%20toksi%C4%8Dnih%20tvari%2C%20raspodijela%2C%20kumulacija_poglavlje%20skripta.pdf> Pristupljeno 17.kolovoza 2019.

Kmetič I. (2018) Testovi toksičnosti, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, <https://moodle.srce.hr/2018-2019/pluginfile.php/1980475/mod_resource/content/1/Testovi%20toksivosti%20%281%29_IK.pdf> Pristupljeno 18. kolovoza 2019.

Kniewald J., Kmetič I., Gaurina Srček V., Kniewald Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **56**: 195-204.

Lim S., Loh H., Ting K., Bradshaw T., Allaudin Z.N. (2015) Reduction of MTT to purple formazan by vitamin E isomers in the absence of cells. *Tropical Life Sciences Research* **26**: 111–120.

Lipozenčić J. (2004) Uloga kože, razvitak kože, pregled građe i funkcija kože, Medicinska naklada, str. 5-9.

LO - Laboroptik GmbH (2010) Manufacturing laboratory equipment, <<http://www.laboroptik.de/englisch/info/info.html>> Pristupljeno 25. kolovoza 2019.

Marinović Kulišić S. (2016) Značenje pripreme okolne kože tlačnog vrijeda prije primjene obloga. *Acta Medica Croatica* **70**: 39-43.

Medicinski priručnik za pacijente (2014) Biologija kože, <<http://www.msdprirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/kozne-bolesti/biologija-koze>> Pristupljeno 15.kolovoza 2019.

Microscope Master (2019) Cell culture. Basics, techniques and media, <<https://www.microscopemaster.com/cell-culture.html>> Pristupljeno 20. lipnja 2019.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**: 55–63.

Nijkamp M. M., Maslankiewicz L., Delmaar J. E., Muller J. J. A. (2014) Hazardous substances in textile products. RIVM Report 2014-0155. National Institute for Public Health and the Environment, Ministry of Health, Welfare and Sport, The Netherlands, <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2014-0155.pdf?fbclid=IwAR2jTVvwS7_AHhfKq_g_CVp9sCEjFkc9GF3VHXCe4Cz_q1AiAZsIabfjuno> Pristupljeno 26. kolovoza 2019.

Ponec M. (1992) *In vitro* cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *International Journal of Cosmetic Science* **14**: 245–264.

Sandt J., Roguet R., Cohen C., Esdaile D., Ponec M., Corsini E., Barker C., Fusenig N., Liebsch M., Benford D., Brugerolle de Fraissinette A., Fartasch M. (1999) The Use of Human Keratinocytes and Human Skin Models for Predicting Skin Irritation, *ATLA* **27**: 723-743.

Sykes J. E., Rankin S.C. (2014) Laboratory Diagnosis of Canine and Feline Infectious Diseases, *Isolation in Cell Culture* **2**: 3-9.

Vihodceva S., Ramata-Stunda A., Pumpure A. (2017) Evaluation of dermal toxicity of antibacterial cotton textile coated by sol-gel technology. *The Journal of The Textile Institute* **109**: 961–966.

Yang Z., Xiong H. (2012) Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells. U: Biomedical Tissue Culture, Ceccherini-Nelli L., Matteoli B., ur., IntechOpen, London, str. 3-18, <http://cdn.intechopen.com/pdfs/40247/InTech-Culture_conditions_and_types_of_growth_media_for_mammalian_cells.pdf> Pristupljeno 24. lipnja 2019.

Yu J. R., Navarro J., Coburn J. C., Mahadik B., Molnar J., Holmes J. H., Nam A.J., Fisher J. P.

(2019) Current and future perspectives on skin tissue engineering: key features of biomedical research, translational assessment, and clinical application. *Advanced Healthcare Materials* **8**: 1-19.

Izjava o izvornosti

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

Rodrić Maja

ime i prezime studenta