

# Ispitivanje toksičnosti kationiziranih i antimikrobno obrađenih tkanina

---

**Paić-Karega, Matea**

**Master's thesis / Diplomski 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:159:887590>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-08**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2019.

Matea Paić-Karega

1051/N

**ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI  
KATIONIZIRANIH I  
ANTIMIKROBNO OBRAĐENIH  
TKANINA**

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

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc Ivani Kmetič te doc. dr. sc. Teuti Murati 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

### ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI KATIONIZIRANIH I ANTIMIKROBNO OBRADENIH TKANINA

Matea Paić-Karega, 1051/N

**Sažetak:** U današnje vrijeme sve više raste svijest o važnosti očuvanja zdravlja te postizanju istog kod oboljelih što je usko vezano uz zdravstveni sektor gdje se žele smanjiti kontaminacije uzrokovane različitim mikroorganizmima. U tu svrhu sve veći interes privlače antimikrobna svojstva tkanina primjenom kojih se može suzbiti razvoj i širenje opasnih mikrobnih infekcija koje uzrokuju bakterije poput *Escherichie coli*, *Klebsielle pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* te *Acinetobacter baumannii* u bolničkom okruženju. Tkanine se mogu impregnirati različitim antimikrobnim agensima koji osim suzbijanja mikroorganizama ne smiju štetno djelovati na čovjeka. U ovom radu preliminarno je ispitana potencijalna toksičnost tvari kojima su impregnirane tekstilije namijenjene za uporabu u bolnicama na modelu kulture stanica - humanih keratinocita. Za određivanje proliferacije i vijabilnosti stanica korištena je *MTT* metoda nakon 72 h. Primijećen je utjecaj broja pranja na impregnirane tekstilije – što je tkanina više puta oprana pretpostavka je da na njoj zaostaje manje štetnih tvari što je potvrđeno manjim citotoksičnim učinkom na keratinocite. Metodom protočne citometrije određen je tip stanične smrti, odnosno udio vijabilnih, apoptotskih i nekrotičnih stanica u kulturi.

**Ključne riječi:** antimikrobna svojstva tekstilnih materijala; HaCaT stanična linija; kitozan; *MTT* metoda; protočna citometrija

**Rad sadrži:** 40 stranice, 7 slika, 5 tablica, 56 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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc. dr. sc. Teuta Murati
2. Izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič
3. Izv. prof. dr. sc. Sandra Flinčec Grgac
4. Izv. prof. dr. sc. Igor Slivac

**Datum obrane:** 22. studeni 2019.

## 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

### TOXICITY ASSESSMENT OF CATIONIZED AND ANTIMICROBIC TREATED TEXTILES

*Matea Paić-Karega, 1051/N*

**Abstract:** Nowadays, the importance of maintaining as well as achieving health is increasing which is closely related to the health sector, where the contamination caused by different microorganisms needs to be reduced. Hence, the antimicrobial properties of textiles are being closely monitored due to their ability to suppress development and spreading of dangerous microbial infections caused by bacteria such as *Escherichie coli*, *Klebsielle pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in hospital setting. Textiles can be impregnated with various antimicrobial agents, which, in addition to suppressing microorganisms, must not have harmful effect on humans. In this study, the potential toxicity of textile impregnated substances intended for hospital use has been preliminary examined using the cell culture model of human keratinocytes. The *MTT* method after 72 h was used to determine cell proliferation and viability. Number of washes and its effect on the impregnated textiles has been observed – assumption is that the more the textile is being washed, the less of harmful substances will be left behind which is confirmed by the smaller cytotoxicity effect on keratinocytes. Flow cytometry was used to determine the type of cell death, that is, the proportion of viable, apoptotic and necrotic cells in culture.

**Keywords:** antimicrobial properties of textiles; HaCaT cell line; chitosan; *MTT* method; flow cytometry

**Thesis contains:** 40 pages, 7 figures, 5 tables, 56 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. Ivana Kmetič, Associate Professor

**Technical support and assistance:** PhD. Teuta Murati, Assistant Professor

Marina Miletić, MSc., Scientific Assistant

**Reviewers:**

1. PhD. Teuta Murati, Assistant professor
2. PhD. Ivana Kmetič, Associate professor
3. PhD. Sandra Flinčec Grgac, Associate professor
4. PhD. Igor Slivac, Associate professor

**Thesis defended:** 22 November 2019



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. Antimikrobna svojstva tkanina .....	2
2.1.1. Primjena antimikrobno obrađenih tkanina .....	3
2.1.1.1. Primjena u sportu .....	4
2.1.1.2. Primjena u filterima za uklanjanje štetnih čestica u zraku .....	4
2.1.1.3. Primjena u zdravstvu .....	4
2.2. Antimikrobni agensi .....	5
2.2.1. Pregled antimikrobnih agenasa .....	6
2.2.2. Kitozan .....	8
2.3. Testovi toksičnosti .....	9
2.3.1. <i>In vitro</i> testovi toksičnosti.....	10
2.3.1.1. Određivanje citotoksičnosti <i>Trypan Blue</i> metodom.....	10
2.3.1.2. Određivanje citotoksičnosti <i>MTT</i> metodom.....	11
2.3.1.3. Određivanje citotoksičnosti protočnom citometrijom.....	12
2.4. Stanične kulture .....	13
2.4.1. Primarne stanične kulture.....	14
2.4.2. Konačne i kontinuirane stanične linije.....	15
2.4.2.1. Stanične kulture u suspenziji i monosloju.....	15
2.5. Uzgoj i primjena staničnih linija .....	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>19</b>
3.1. Materijali .....	19
3.1.1. Biološki materijal.....	19
3.1.2. Tekstilije .....	19
3.1.3. Kemikalije.....	21
3.1.4. Otopine i puferi .....	21
3.1.5. Oprema i uređaji .....	23
3.2. Metode rada .....	24
3.2.1. Uzgoj i održavanje HaCaT stanica u kulturi.....	24
3.2.2. Priprema tekućih ekstrakta tekstilija .....	24
3.2.3. Određivanje citotoksičnosti antimikrobnih tvari kojima su impregnirane tekstilije <i>MTT</i> metodom.....	25

3.2.4. Određivanje citotoksičnog učinka ekstrakta tekstilija metodom protočne citometrije .....	25
3.3. Statistička obrada rezultata .....	27
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>28</b>
4.1. <i>In vitro</i> učinak potencijalno štetnih tvari kojima su impregnirane tekstilije na HaCaT staničnoj liniji određen <i>MTT</i> metodom .....	28
4.2. <i>In vitro</i> učinak potencijalno štetnih tvari kojima su impregnirane tekstilije na HaCaT staničnoj liniji određen metodom protočne citometrije .....	32
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>35</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>36</b>

# 1. UVOD

Uporaba vlakana u svijetu porasla je tijekom nekoliko desetljeća. Između 1950. i 2008. godine, potrošnja *per capita* narasla je s 3,7 kg na 10,4 kg. Nastavak razvoja doveo je do potražnje od 55,2 milijuna tona sintetičkih vlakana u 2014. godini, uz 25,4 milijuna tona prirodnih vlakana, uključujući pamuk i vunu (Morais i sur., 2016). Tekstilna vlakna koriste se u različitim industrijama diljem svijeta, a posebno su značajna za primjenu u medicinske svrhe budući da se mogu tretirati različitim antimikrobnim agensima kako bi se suzbile infekcije i postigla finalna kontrola higijene. Antimikrobni agensi kojima se tretiraju tekstilije mogu se definirati kao prirodne ili sintetske supstance koje ubijaju ili inhibiraju rast mikroorganizama poput npr. bakterija ili gljivica koje se nalaze na tekstiliji (Burnett-Boothroyd i McCarthy, 2011). Osim što moraju djelovati negativno na mikroorganizme, moraju zadovoljiti i određene sigurnosne uvjete za potrošača (Mansfield, 2002).

Primjer antimikrobnog agensa je i kitozan. To je linearan polisaharid građen od D-glukozamina i *N*-acetil-D-glukozamina (acetilirana jedinica) povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom koji se dobiva deacetilacijom hitina (Goy i sur., 2009). Komercijalna uporaba kitozana javlja se 1930-tih godina, a danas se osim iz egzoskeleta *crustacea* može ekstrahirati i iz uzgojenih jestivih gljiva (Bellich i sur., 2016).

Moguće toksično djelovanje određenih ksenobiotika može se ispitati različitim testovima toksičnosti. Testovi toksičnosti mogu biti alternativni ili *in vitro* testovi te *in vivo* testovi toksičnosti. Za određivanje citotoksičnosti najčešće se koriste *Kenacid Blue*, *Neutral Red*, *MTT* i *Trypan Blue* metoda (Kniewald i sur., 2005). U ovom će radu kao alternativni test-sustav biti korištena HaCaT stanična linija, tj. stanična linija humanih keratinocita. Cilj ovog rada je preliminarno ispitati potencijalnu toksičnost kationiziranih i antimikrobno obrađenih tkanina. Za određivanje *in vitro* učinaka koristit će se *MTT* metoda te metoda protočne citometrije. Antimikrobno obrađene tkanine dobivene su s Tekstilno-tehnološkog fakulteta. Riječ je o poliester/pamuk tkaninama koje se razlikuju prema kemijskoj obradi te broju pranja.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Antimikrobna svojstva tkanina

Tekstilna vlakna se primjenjuju u različitim industrijama u cijelome svijetu te se svakodnevno koriste kako bi zadovoljile različite potrebe. Naravno, tehnološke prednosti tekstilija najviše su prepoznate kod odjevnih predmeta, međutim bitne su i u ostalim industrijama poput pakiranja hrane, filtera, purifikacije vode, sportske opreme, medicinskih aparata, bolničkih tekstilija, održavanja zdravlja i higijene, građevinskoj industriji i dr.

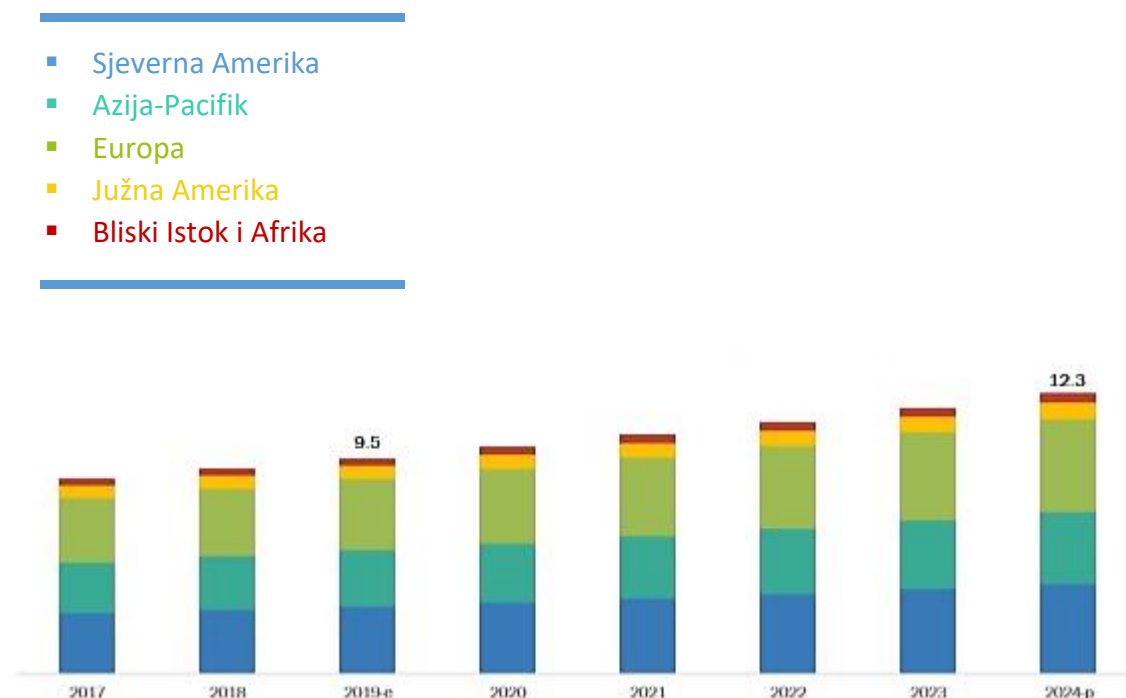
Zbog sirovinskog sastava, velike površine i sposobnosti zadržavanja vlage, tekstilije su podložne rastu mikroorganizama, poput bakterija i gljivica, koje se mogu naći gotovo svugdje te se ovisno o vlažnosti, nutrijentima i temperaturi vrlo brzo umnožavaju. Rast mikroorganizama na tekstilijama uzrokuje širok raspon neželjenih učinaka, ne samo na sam tekstil već i na korisnika. Ti učinci uključuju nakupljanje neugodnog mirisa, smanjenje mehaničkih svojstava, mrlje i diskoloracije te povećanu mogućnost kontaminacije korisnika. Zbog povećane svijesti o javnom zdravlju, tijekom zadnjih nekoliko godina provode se istraživanja kako bi se minimizirao mikrobn rast na tekstilijama. Mikrobn kontaminacija velika je prijetnja, pogotovo za tekstilije korištene u bolnicama u kojima postoji opasnost od nekoliko vrsta poput *Staphylococcus aureus*, *Escherichie coli*, *Klebsielle pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* te *Acinetobacter baumannii* (Morais i sur., 2016).

Potrebno je, dakle, provesti razvoj tkanina s antimikrobnom učinkovitošću. Kako bi tkanina mogla imati antimikrobna svojstva, primjenjuju se različiti pristupi. Ovisno o antimikrobnom agensu koji se planira koristiti, kao i o vrsti vlakana, sastavu, strukturi te teksturi površine, postoje različiti kemijski i fizički pristupi za obradu tkanina kako bi ona poprimila antimikrobna svojstva. Neki pristupi zasnivaju se na specifičnim antimikrobnim agensima koji u slučaju sintetskih vlakana mogu biti inkorporirani u polimerni matriks. Druga mogućnost je, kod svih vrsta vlakana, aplikacija antimikrobnog agensa u završnoj fazi na površinu materijala. Ovisno o korištenom pristupu, antimikrobno obrađena tekstilija može djelovati na dva načina, kontaktom i/ili difuzijom. U slučaju kontakta, agens je postavljen na vlakna te ne dispergira pa će djelovati samo kad mikroorganizam dotakne površinu tekstilije. U slučaju difuzije, agens se nalazi na površini vlakna ili u polimernom matriksu te će migrirati iz tekstilije u vanjski medij i napasti mikroorganizme (Gupta i Bhaumik, 2007).

Uz dobru antimikrobnu učinkovitost koju posjeduju tekstilije zahvaljujući korištenom agensu, težak zadatak je postići postojanost svojstava na višestruke cikluse održavanja i skladištenje koji tu učinkovitost mogu smanjiti. Rješenje bi se moglo pronaći optimiranjem tehnološkog procesa obrade i doziranja antimikrobnog sredstva u tkaninu ili čestim obnavljanju agensa. U suprotnom, funkcija se može izgubiti budući da se agens gubi ili se otpušta tijekom skladištenja i održavanja. Također, potrebno je osigurati sigurnost za stanice keratinocita za one tekstilije koje se koriste u direktnom kontaktu s ljudskom kožom, a pojedini antimikrobni agensi imaju tendenciju uzrokovati iritacije ili osjetljivost kože. Nadalje, i sama koža sadrži mikroorganizme koji je brane od patogena te bi biocidna funkcija tekstilija mogla dovesti do potpune eliminacije mikroorganizama što može naštetiti prirodnom obrambenom sustavu (Sun, 2016).

### 2.1.1. Primjena antimikrobno obrađenih tkanina

Antimikrobno obrađene tkanine posljednjih godina privlače velik interes raznih grana industrije. Rastući trend u svijetu prikazan je na slici 1. One mogu poboljšati svojstva i životni vijek proizvoda široke potrošnje. Najpoznatija je njihova primjena u zdravstvu prije svega zbog njihove sposobnosti smanjena prenošenja infekcija u zdravstvenim ustanovama. Osim toga, bitno svojstvo je i smanjenje stvaranja neugodnih mirisa. Sukladno tome, primjenu nalaze u izradi sportske opreme, ali i za osiguravanje kvalitete zraka (Purwar, 2018).



**Slika 1.** Prikaz rastućeg trenda vrijednosti tržišta antimikrobnih tekstilija prema regijama (u USD milijarde) (Market research report, 2019).

### **2.1.1.1. Primjena u sportu**

Ulaganje u sport raste iz godine u godinu, a to podrazumijeva i razvoj adekvatne opreme. Sportska oprema izrađena od antimikrobnih vlakana često posjeduje povećanu fleksibilnost i izdržljivost, te štiti od iritacija i kontaminacija. *Staphylococcus aureus* je uobičajena bakterija prisutna kod sportaša. Dakle, antibakterijska sportska odjeća i obuća mogu zaštititi sportaše od mikroorganizama i neugodnih mirisa, pritom čuvajući sama vlakna od oštećenja i propadanja. Primjer je kitozan koji se sve više koristi u izradi sportske odjeće, čarapa i obuće u svrhu kontroliranja vlage te zbog istaknutih antibakterijskih i antifungalnih svojstava. Nadalje, velika je zastupljenost i nanočestica koje se koriste u ovu svrhu budući da je u zadnje vrijeme upravo nanotehnologija otvorila nove puteve u kreiranju funkcionalne sportske opreme i odjeće (Harifi i Montazer, 2017).

### **2.1.1.2. Primjena u filterima za uklanjanje štetnih čestica u zraku**

Zbog svog velikog kapaciteta, netkani tekstil se već duže vrijeme koristi kao osnova u filterima za uklanjanje štetnih čestica u zraku. Khajavi i suradnici (2013) istraživali su kako slojevi polipropilena tretirani aktivnim ugljenom i nanočesticama srebra sprječavaju prodor mikroorganizama u zrak. Pokazalo se kako sloj filtera prevučeni srebrom može potpuno ukloniti *Staphylococcus aureus* i *Escherichiu coli* iz prolaznog zraka.

### **2.1.1.3. Primjena u zdravstvu**

Antimikrobno obrađene tekstilije često se koriste u zdravstvu u vidu obloga za suzbijanje infekcije rana i liječenju različitih kožnih oboljenja. Pri tome treba imati na umu da se oblozi nalaze u izravnom dodiru s povrijeđenom kožom zbog čega postoje uvjeti koji dozvoljavaju pojedinim antimikrobnim materijalima apliciranje na ranu. Antimikrobni materijal bi trebao imati antimikrobni učinak širokog spektra, ne bi trebao uzrokovati nikakvu reakciju u vidu alergije ili toksične reakcije te ne bi trebao razviti otpornost na bakterije (Qin, 2009). O prijenosu infekcija povezanih s patogenima na površini tekstilija dosta se izvještavalo, pogotovo kada je riječ o bolnicama. Osim samih tekstilija koje nose pacijenti i odjeća koju nose zaposlenici igra veliku ulogu u prijenosu infekcija. Također, kontaminacija se može razviti i u ručnicima te navlakama za krevet. O prenosivosti patogena unutar bolnice govorili su Munoz-Price i suradnici (2012) kada su pronašli korelaciju između patogena nađenih na rukama zaposlenika i onih izoliranih iz kuta. Zbog svega navedenog, razvoj antimikrobnih tekstilija s primjenom u zdravstvu treba i dalje biti imperativ. Uobičajene tekstilije koje se koriste za

proizvodnju uniformi u zdravstvenom sektoru uključuju kombinaciju poliestera i pamuka (Laird i Riley, 2016) te se ulažu znatni naponi za postizanje postojane antimikrobne učinkovitosti vezivanjem antimikrobnog sredstva upravo na celuloznu komponentu u mješavini.

## 2.2. Antimikrobni agensi

„Antimikrobni agens“ je opći pojam za lijek, kemikaliju ili neku drugu supstancu koja je sposobna ubiti ili usporiti rast mikroba. Među antimikrobnim agensima mogu se pronaći antibakterijski agensi, antiviralni agensi, antifungalni agensi te antiparazitski agensi. Još jedna definicija uže vezana uz tekstilno područje predlaže da se antimikrobni agens može definirati kao prirodna ili sintetska supstanca koja ubija ili inhibira rast mikroorganizama poput npr. bakterija ili gljivica koje se nalaze na tekstiliji. Antimikrobne obrade tekstilija nužne su kako bi se izbjegla kroskontaminacija patogenima, da bi se suzbilo širenje zaraze, kako bi se zaustavio metabolizam bakterija u cilju sprječavanja nastanka neugodnih mirisa te za sprječavanje degradacije kvalitete tekstilnih proizvoda (Burnett-Boothroyd i McCarthy, 2011). Kada se primjenjuje na određenu tekstiliju, bitno je da antimikrobni tretman zadovoljava nekoliko osnovnih zahtjeva:

- sigurnost za potrošača što se postiže korištenjem nisko toksičnih supstanci
- ne smije uzrokovati alergije ili iritacije za kožu
- ne smije negativno utjecati na svojstva ili izgled tekstilije
- treba biti što otporniji na procese pranja (Mansfield, 2002).

Svojstva idealnog antimikrobnog sredstva su:

- postojana antimikrobna svojstva tijekom upotrebe i pranja proizvoda
- aktivitet prema širem rasponu mikroorganizama
- antimikrobni učinak treba biti ograničen samo na površinu tekstilija da ne dođe do međudjelovanja s bakterijama kože
- ne sadrži toksične supstance koje mogu migrirati
- efikasnost sredstva je moguće odrediti primjenom standardnih metoda ispitivanja (Bischof Vukušić i sur., 2007).

Bakterije i gljivice posjeduju vanjski sloj građen od polisaharida koji održava integritet staničnih komponenti te štiti stanicu od ekstracelularnih uvjeta. Preživljavanje i rast mikroorganizama ovisan je o staničnom integritetu te o fiziološkim procesima unutar stanice.

Zbog toga se antimikrobni kemijski agensi klasificiraju prema načinu na koji djeluju protiv stanične funkcije ili integriteta mikroba. Ako se njihov učinak zasniva samo na inhibiciji rasta stanica, tada se govori o biostatiku, a ako su sposobni ubiti mikroorganizme radi se o biocidnom učinku (Gao i Cranston, 2008).

Većina antimikrobnih agenasa koji se koriste na komercijalnim tekstilijama posjeduju biocidne učinke. Ti se učinci ispoljavaju na različite načine ovisno o njihovoj kemijskoj strukturi i prirodi te afinitetu prema određenim ciljnim mjestima unutar mikroorganizma. Ti različiti učinci odnose se na:

- uništavanje ili inhibiciju sinteze stanične stijenke koja je ključna za život i preživljavanje bakterijskih vrsta
- inhibiciju funkcije stanične membrane, važne barijere koja regulira intra i ekstracelularni protok tvari
- inhibiciju sinteze proteina (npr. važnih enzima i/ili strukturnih proteina)
- inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina (DNA i RNA) uzrokovanu interferiranjem antimikrobnih agenasa s komponentama uključenim u proces sinteze DNA ili RNA
- inhibiciju ostalih metaboličkih procesa, na primjer prekidanje puta folne kiseline koji je esencijalan za bakteriju zbog stvaranja prekursora bitnih za sintezu DNA (Morais i sur., 2016).

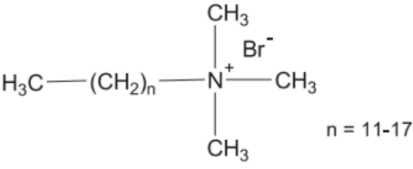
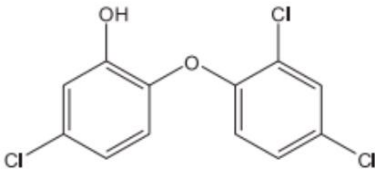
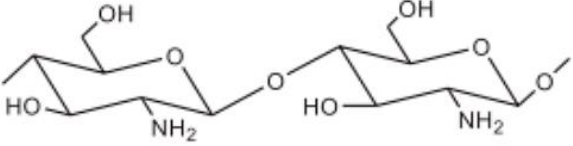
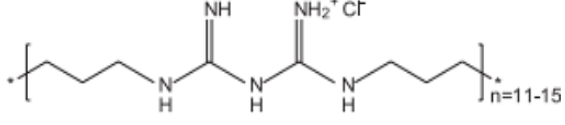
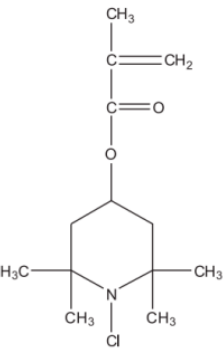
### **2.2.1. Pregled antimikrobnih agenasa**

Od antimikrobnih spojeva, koriste se različiti tipovi poput kvarternih amonijevih spojeva, triklozana, metalnih soli ili čak prirodnih polimera. Svako tretiranje tkanine antimikrobnim spojem mora udovoljiti različitim zahtjevima. Osim što moraju biti učinkoviti protiv mikroorganizama, glavni izazov je netoksičnost za potrošača što se odnosi na citotoksičnost, alergije, iritacije, osjetljivost. Nadalje, mikroorganizmi mogu postati rezistentni prema nekim antimikrobnim agensima te je upravo rezistentnost na kombinacije sredstava zabrinjavajuća okolnost i još jedan od izazova s kojim se treba suočiti (Morais i sur, 2016).

U tablici 1 prikazan je sažetak glavnih antimikrobnih agenasa koji se koriste na tekstilijama, njihova kemijska struktura te materijal na kojem se koriste.

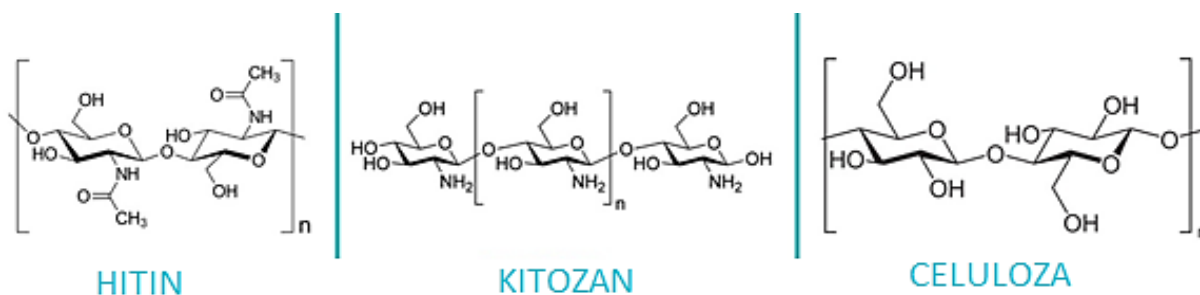


**Tablica 1.** Pregled antimikrobnih agenasa koji se koriste na tekstilijama (Morais i sur., 2016).

Antimikrobni agens	Struktura	Tkanina
Kvartarni amonijevi spojev		Pamuk Poliester Najlon Vuna
Trikloran		Poliester Najlon Polipropilen Acetilceluloza Akрил
Metali i metalne soli	Npr: TiO <sub>2</sub> i ZnO	Pamuk Vuna Poliester Najlon
Kitozan		Pamuk Poliester Vuna
Poliheksametilen bigvanid		Pamuk Poliester Najlon
N-halamini		Pamuk Poliester Najlon Vuna

### 2.2.2. Kitozan

Kitozan je linearan polisaharid građen od D-glukozamina i *N*-acetil-D-glukozamina (acetilirana jedinica) povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom. Jedini je prirodni polimer s pozitivnim nabojem. Dobiva se kao rezultat deacetilacije hitina koji je glavni konstituent egzoskeleta rakova i ostalih *crustacea* poput jastoga ili škampa. Hitin se ekstrahira iz navedenog egzoskeleta nakon čega se deacetilira kako bi se dobio kitozan (Goy i sur., 2009, Morales i Ruiz, 2016). Prvi interes za komercijalnu uporabu kitozana javlja se u 30-tim godinama prošlog stoljeća, međutim nakon toga opada zbog kompeticije sa sintetskim polimerima sve do sredine 70-tih kada se proizvodnja kitozana pokazala ekonomičnom. U zadnje vrijeme kitozan se može dobiti i iz hitina ekstrahiranog iz uzgojenih jestivih gljiva, poput *Agaricus bisporus* (Bellich i sur., 2016). Razlike u kemijskoj strukturi hitina, kitozana i celuloze prikazane su na slici 2.



**Slika 2.** Razlike u kemijskoj strukturi hitina, kitozana i celuloze (Swicofil, 1995).

Kitozan se obično proizvodi alkalnom hidrolizom hitina, procesom koji rezultira *N*-deacetilacijom i depolimerizacijom. Antimikrobna sposobnost kitozana ovisna je o intrinzičnom faktoru i vanjskim uvjetima, a najviše molekularnoj masi kitozana te stupnju polimerizacije, stupnju deacetilacije, pH medija te tipu mikroorganizma (Morais i sur., 2016). Lou i suradnici (2011) navode kako je prvi korak njegovog antimikrobnog mehanizma interakcija između pozitivno nabijenog kitozana, koji potječe od primarne amino skupine, i negativno nabijene membrane mikroorganizma. Zatim, u slučaju niske molekularne mase otopine kitozana, on može penetrirati kroz staničnu stijenku, vezati se na DNA te inhibirati sintezu mRNA, sprječavajući tako sintezu proteina. U slučaju visoke molekularne mase otopine kitozana koja pokazuje veću gustoću pozitivnog naboja, interakcija može promijeniti staničnu membranu, povećavajući njezinu permeabilnost, što će uzrokovati istjecanje nekih intracelularnih tvari ili može formirati nepropusni omotač oko stanice tako blokirajući transport esencijalnih tvari u stanicu (Morais i sur., 2016).

Glavna mana kitozana kao antimikrobnog sredstva za tekstilije je teško rukovanje te velika ovisnost njegove aktivnosti o pH i temperaturi. Budući da je kitozan jedino topljiv u kiseloj sredini te postaje polikation kada je pH niži od pKa (6,3-6,5), jači antibakterijski učinak uočen je u kiselim uvjetima (Morais i sur., 2016). Također, homogenost i stupanj deacetilacije su jedan od faktora koji povećavaju topljivost kitozana ukoliko je pH manji od 6. Nadalje, tijekom skladištenja i ovisno o temperaturi, neka specifična svojstva kitozana mogu se promijeniti, poput viskoznosti i molekularne mase, što posljedično utječe na biocidnu učinkovitost (Bellich i sur., 2016).

Ovaj linearni polisaharid sveobuhvatno je proučavan za uporabu kod tekstilija, i to u medicinske svrhe, najviše zbog svoje biokompatibilnosti, netoksičnosti, nekancerogenosti te antimikrobne aktivnosti. Najviše se koristi kod pamuka, poliestera i vunениh vlakana te pokazuje antimikrobnu aktivnost unutar širokog spektra mikroorganizama, uključujući gljivice, alge i neke bakterije (Morais i sur., 2016). Kada se govori o gram-negativnim i gram-pozitivnim bakterijama, studije pokazuju oprečna mišljenja. Dok neke daju naslutiti da su gram-pozitivne bakterije osjetljivije na njegovo djelovanje zbog prisutnosti polianionskih teihoičnih kiselina na površini, druge se pozivaju na ulogu hidrofobnih interakcija izloženih lipopolisaharida govoreći da su gram-negativne bakterije značajnije pogođene djelovanjem kitozana (Muzzarelli i sur., 1990; Helander i sur., 2001). Kitozan ima GRAS status (engl. *generally recognized as safe*).

### 2.3. Testovi toksičnosti

Testovi toksičnosti koriste se za ispitivanje različitih spojeva kojima su izloženi ljudi i životinje te njihovih učinaka na organizam, poput pesticida, aditiva, lijekova, kozmetike, itd. Testovi toksičnosti mogu biti alternativni ili *in vitro* testovi te *in vivo* testovi toksičnosti. Testovima toksičnosti koji se provode *in vivo* moguće je ispitati neurotoksičnost, imunotoksičnost, citotoksičnost, nefrotoksičnost, toksikodinamičke i toksikokinetičke parametre ksenobiotika, odrediti toksičnost na reprodukcijски sustav i plodnost, zatim teratogenost i mutagenost kao i očnu i kožnu iritaciju (Atterwill, 1995). Međutim, sve je veća primjena *in vitro* testova koji podrazumijevaju različite sustave kao što su stanične linije i frakcije, stanične kulture te dijelove tkiva i kulture organa. Bitni su zbog staničnih, fizioloških i molekularnih mehanizama toksičnosti uzrokovanih kemikalijama koji se upravo pomoću *in vitro* sustava mogu istraživati dok *in vivo* studije ne mogu dati ove odgovore (Kniewald i sur., 2005).

### **2.3.1. *In vitro* testovi toksičnosti**

*In vitro* testovi toksičnosti korisni su i obavezni za definiranje bazalne citotoksičnosti. Citotoksičnost se primarno odnosi na potencijal tvari da uzrokuje staničnu smrt. Većina *in vitro* testova citotoksičnosti mjere nekrozu. Također, služe za definiranje opsega koncentracija za daljnja i detaljna testiranja kako bi se dobile značajne informacije o parametrima poput genotoksičnosti, indukcije mutacija ili programirane stanične smrti. Utvrđivanjem doze pri kojoj je 50% stanica inhibirano u rastu, moguće je kvantitativno usporediti odgovor jedne tvari u više različitih sustava ili nekoliko tvari u istom organskom sustavu (Eisenbrand i sur., 2002).

Korištenje *in vitro* testova ima brojne prednosti. Oni daju važne alate za bolje razumijevanje opasnih učinaka kemikalija te predviđaju učinke tih tvari na čovjeka. *In vitro* sustavi koriste se primarno za „screening“ te za generiranje opsežnih toksikoloških profila. Potencijal se vidi i u izučavanju lokalnih ili organskih i specifičnih učinaka (Eisenbrand i sur., 2002). Također, imaju visok stupanj standardizacije, reproducibilni su, smanjuju ili potpuno zamjenjuju životinjske modele, provedba tih testova je brza i rutinska, manje je toksičnog otpada te su jeftiniji od *in vivo* testova (Atterwill, 1995).

Uz navedene prednosti, postoje i određeni nedostaci ovih testova. Do lažnih rezultata može doći ako ispitivana tvar utječe na sastav medija za uzgoj i uzrokuje promjenu pH medija. Može se i onemogućiti prtok hranjivih tvari u stanice ako ispitivana tvar reagira sa sastojcima medija. Nedostatak može biti i nedovoljna prisutnost ili pak potpuna odsutnost metaboličke aktivacije u staničnim sustavima te izmjena svojstava stanica u *in vitro* sustavima. Također im nedostaje službena validacija i vrednovanje (Atterwill, 1995).

*Kenacid Blue*, *Trypan Blue*, *Neutral Red* i *MTT* su neke od metoda koje omogućuju kolorimetrijsko mjerenje stanične vijabilnosti i proliferacije (Ishiyama i sur., 1996).

#### **2.3.1.1. Određivanje citotoksičnosti *Trypan Blue* metodom**

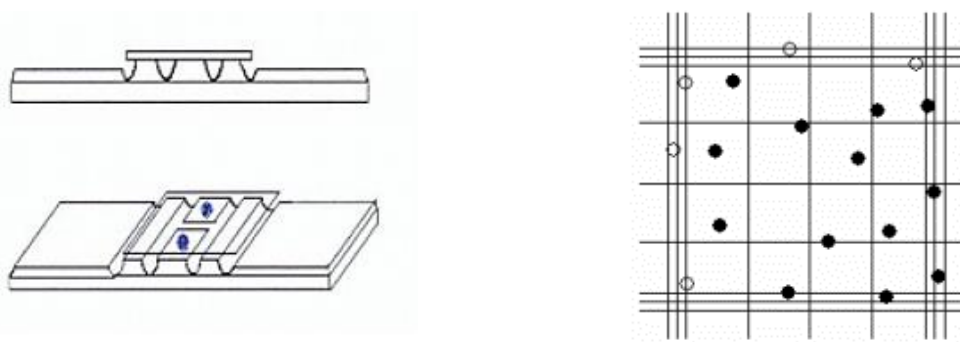
Ova metoda se koristi za određivanje broja živih stanica prisutnih u staničnoj suspenziji. Temelji se na principu da žive stanice imaju očuvanu staničnu membranu koja može „odstraniti“ određene boje ili spriječiti penetraciju boje unutar stanice, poput *Trypan Blue*, dok mrtve stanice to ne mogu. Stanice se, dakle, boje *trypan blue* bojom te vizualno (mikroskopom)

ispituju kako bi se utvrdilo je li došlo do obojenja ili ne. Žive stanice ostat će neobojane dok će mrtve biti plave (Strober, 2015).

Postupak se sastoji od toga da se volumenu od 20  $\mu\text{L}$  suspenzije stanica doda 20  $\mu\text{L}$  0,4%-tne *Trypan Blue* boje te se smjesa resuspendira. Zatim se 20  $\mu\text{L}$  smjese nanese na Fuchs-Rosenthal-ovu komoricu te se mikroskopom broje žive, odnosno mrtve stanice. Žive stanice bit će neobojane, dok će mrtve imati blavo obojenje. Ukupan broj živih stanica određuje se prema formuli:

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

Fuchs-Rosenthal-ova komorica sastoji se od 16 kvadrata. Prilikom brojanja stanica koriste se 4 središnja kvadrata. Da bi se izbjeglo brojanje istih stanica više puta, u svakom se kvadratu broje i stanice koje se nalaze na desnom i donjem rubu. Površina komorice iznosi 0,0625  $\text{mm}^2$ , a dubina 0,2 mm (slika 3).



**Slika 3.** Fuchs-Rosenthal-ova komorica (LO-Laboroptik, 2010).

### 2.3.1.2. Određivanje citotoksičnosti *MTT* metodom

*MTT* kolorimetrijski test služi za određivanje sposobnosti živih stanica da prevedu topljivu tetrazolijevu sol (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) (*MTT*) u netopljivi formazan. Tetrazolijeva sol prima elektron od oksidiranog supstrata ili prikladnog enzima poput NADH ili NADPH. Odnosno, *MTT* se reducira kao rezultat aktivnosti sukcinat dehidrogenaze. Ova reakcija uzrokuje promjenu boje žute soli u ljubičaste kristale formazana koji se mogu otopiti u organskom otapalu nakon čega se intenzitet boje otopine može spektrofotometrijski odrediti. Metoda ima mnoge prednosti te joj se danas daje prednost nad tradicionalnim tehnikama. Brza je, sveobuhvatna, kvantitativna te visoko reproducibilna i precizna. Može se

primijeniti za bilo koju staničnu liniju. Preliminarnim ispitivanjima potrebno je odrediti optimalan broj stanica potreban za eksperiment, trajanje eksperimenta te vrijeme inkubacije stanica s *MTT*-om. Praćenje rasta stanica *MTT* metodom u dobroj je korelaciji sa staničnim proteinima i brojem živih stanica. Metoda je osjetljiva i usporediva s ostalim *in vitro* metodama za procjenu citotoksičnosti. *MTT* u otopini može se čuvati na 4 °C i tamnom mjestu nekoliko tjedana tijekom kojih se pokazalo da se apsorpcijski spektar i intenzitet otopine neće promijeniti. Neka ograničenja ove metode su da se ne razlikuje citostatski i citocidni učinak, a test je najmanje efikasan kada se provodi u mediju koji se koristio za rast stanica nekoliko dana (Atterwill, 1995).

Količina obojanog formazana određuje se spektrofotometrijski nakon otapanja kristala u DMSO (dimetil sulfoksid). Količina je proporcionalna metaboličkoj aktivnosti i broju stanica u uzorku. Ta metabolička aktivnost zahtjeva funkcionalne mitohondrije. Test je prvotno opisan za upotrebu u *microwell* pločama za određivanje rasta i preživljavanje stanica. Danas se koristi u radu s humanim stanicama tumora te staničnim linijama različitog podrijetla, za procjenu hormona i faktora rasta, kemosenzitivnosti, radiosenzitivnosti, određivanja mikrobne aktivnosti itd. (Siewerts i sur., 1995). Ovom metodom omogućeno je praćenje stanične proliferacije i citotoksičnosti (Mosmann, 1983).

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

### **2.3.1.3. Određivanje citotoksičnosti protočnom citometrijom**

Protočna citometrija je metoda zasnovana na laserskoj tehnologiji koja se koristi za analizu stanice ili njenih dijelova. Pogodna je za istovremeno određivanje više parametara na pojedinačnoj stanici (Abcam, 2017). *Muse cell analyzer* je instrument koji se koristi za pristupačniju upotrebu protočne citometrije.

*Muse cell analyzer* omogućava kvantitativnu analizu živih stanica, rane ili kasne apoptoze te mrtvih stanica. Potrebna je minimalna priprema uzoraka kako bi se postigli točni i precizni rezultati. *Software* pruža informacije o:

- koncentraciji (st mL<sup>-1</sup>) živih stanica, stanica u ranoj apoptozi, kasnoj apoptozi te mrtvih stanica
- postotku živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te postotku mrtvih stanica.

Apoptoza ili programirana stanična smrt je važan i aktivan regulatorni put staničnog rasta i proliferacije. Stanice odgovaraju na specifične indukcijske signale inicirajući intracelularne procese koji rezultiraju karakterističnim fiziološkim promjenama. Jedna od tih promjena je eksternalizacija fosfatidilserina (PS) na površinu stanice. *Annexin V* je kalcij-ovisan fosfolipid-vezajući protein koji ima visok afinitet prema PS. U ranoj fazi apoptoze molekule PS se translociraju na vanjsku površinu membrane stanice gdje ih *Annexin* može vezati. *Muse cell analyzer* koristi *Annexin V* za detekciju stanica u apoptozi. Za detekciju mrtvih stanica koristi se marker koji je indikator integriteta stanične membrane (Merck Millipore, 2017).

## 2.4. Stanične kulture

Uzgoj staničnih kultura obuhvaća procese kojima znanstvenik uzgaja i održava stanice pod kontroliranim uvjetima izvan živućeg organizma (Carter i Shieh, 2015). Prvo se stanice izoliraju iz organizma (*in vivo*) te nakon toga slijedi njihov uzgoj u uvjetima *in vitro* (Hudu i sur., 2016). Tehnika se prvotno počela razvijati početkom dvadesetog stoljeća. Principi prema kojima se provodi utvrđeni su kada je Roux, inače embriolog, upotrijebio toplu, slanu otopinu kako bi održavao pileći embrio nekoliko dana te tako došao do nekih osnovnih principa (Hudu i sur., 2016). Stanična linija L929 prva je kultivirana kontinuirana stanična linija koja je izolirana 1943. godine iz L-stanica miša. Gey je uspostavio prvu kontinuiranu humanu staničnu liniju, HeLa, koja je dobila ime po pacijentici Henrietti Lacks iz čijeg su karcinoma vrata grlića maternice stanice izolirane. Mehaničko uklanjanje stanica od površine podloge zamijenjeno je 1950.-te godine tripsinizacijom čiji postupak opisuje Dulbecco u radu iz 1952. godine (Freshney, 2005). Od početne izolacije, stanice se pasažiraju ili kultiviraju dok se ne uspostavi kontinuirana stanična linija (Hudu i sur., 2016).

Neke od prednosti korištenja staničnih kultura su kontrola čimbenika i okoliša, homogenost linija, jednostavnost karakterizacije, poznato podrijetlo, smanjeno korištenje životinjskih

modela. Od nedostataka se ističu potrebni sterilni uvjeti te stručno rukovanje, kontrola radnih uvjeta, genetska i fenotipska nestabilnost (Freshney, 2005).

Postoje primarne kulture stanica te stanične linije koje mogu biti konačne ili kontinuirane. Razlikuju se prema životnom vijeku, odnosno primarne kulture te konačne stanične linije imaju limitirani vijek dok se kontinuirane stanične linije često transformiraju pa su sposobne neograničeno se uzgajati (Wolf, 2010).

#### **2.4.1. Primarne stanične kulture**

Primarna kultura stanica je ona kultura koja je direktno izolirana iz organizma, odnosno direktno iz tkiva ili organa. U obzir treba uzeti 4 faze: a) nabavku uzorka, b) izolaciju tkiva, c) seciranje i/ili raščlanjivanje i d) kultiviranje nakon nacjepljivanja u posudicu za uzgajanje. Nakon izolacije, primarna kultura stanica može se održati ili puštanjem stanica da migriraju iz fragmenata tkiva prihvaćajući se za prikladnu podlogu za rast, ili mehaničkom, odnosno enzimatskom disagregacijom tkiva kako bi se dobila suspenzija stanica. Pokazalo se kako je esencijalno za većinu normalnih, netransformiranih stanica (uz izuzetak hematopoetskih) da se prihvate za ravnu površinu kako bi preživjele te se razmnožavale s maksimalnom efikasnošću. S druge strane, transformirane stanice većinom imaju sposobnost proliferacije u suspenziji (Schaeffer, 1984).

Primarnu tehniku razvili su Harrison (1907. godine), Carrel (1912. godine) kako bi se mogla uspostaviti stanična kultura. Njihova tehnika se i dalje koristi, međutim uvelike je zamijenjena jednostavnijim protokolom. Tkivo se fino usitnjava do komadića veličine  $1\text{mm}^3$  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. Mehanička disagregacija pogodna je za tkiva poput gušterače, jetre, mozga, brža je od enzimske, no postoji rizik od mehaničkog oštećenja stanica. Za enzimsku disagregaciju najčešće se koristi tripsin te će imati bolji prinos ako je količina tkiva veća (Freshney, 2005).



Glavna prednost primarnih kultura je to što zadržavaju specifična svojstva originalnog tkiva, odnosno njegove morfološke i biokemijske karakteristike. Nedostatak se očituje u njihovoj heterogenosti zbog prisustva različitih tipova stanica izvornog tkiva.

#### **2.4.2. Konačne i kontinuirane stanične linije**

Jednom kad je primarna kultura subkultivirana (ili pasažirana), ona postaje stanična linija (Freshney, 2005). Iz stanične linije ili direktno iz primarne kulture moguće je dobiti stanični soj (Fedoroff, 1977). Ovim se postupcima iz vrlo heterogene primarne kulture, koja sadrži mnogo tipova stanica prisutnih u originalnom tkivu, može dobiti više homogenih linija. Osim biološke važnosti, ovaj proces ima značajan praktični doprinos budući da se sada kultura može propagirati, karakterizirati te pohranjivati, a potencijalno povećanje broja stanica i njihova jednolikost omogućuju širok raspon eksperimenata (Freshney, 2005).

Stanična linija može biti konačna ili kontinuirana. Konačne stanične linije imaju limitiran broj dioba (najčešće od 20 do 80) te ograničen životni vijek (Hartung i sur., 2002). Formiraju se nakon prve subkultivacije primarne kulture te se iz njih *in vitro* transformacijom (promjenom kontrole staničnog rasta) dobivaju kontinuirane stanične linije koje su besmrtno. Transformacija može biti spontana ili inducirana (virusima, kemikalijama, fizikalnim reagensima). Kontinuirane stanične linije lakše se održavaju i kloniraju, brže rastu, a daju i veći prinos te im je potrebno manje seruma. Neki od nedostataka su kromosomska nestabilnost, povećana mogućnost nastanka tumora, razlika od donorskog fenotipa, gubitak specifičnih tkivnih markera (Freshney, 2005).

##### **2.4.2.1. Stanične kulture u suspenziji i monosloju**

Ovisno o tome prihvaćaju li se stanice uz podlogu ili ne, stanične kulture mogu se podijeliti na one koje se uzgajaju u suspenziji i monoslojne. Kada se govori o staničnoj kulturi u suspenziji, stanice se nalaze slobodne u mediju za uzgoj, dok su monoslojne one kod kojih su stanice pričvršćene za površinu boce u kojoj se nalaze (Freshney, 2005).

Za uzgoj stanica u monosloju potrebna je umjetna podloga te se u tu svrhu najčešće koriste T-boce i multiwell ploče. Budući da se takvi uvjeti uvelike razlikuju od onih *in vivo*, cilj je eksperimentalne uvjete (*in vitro*) što više približiti onima *in vivo*. Ključni korak je odabir

podloge za rast jer omogućuje vezanje stanica i njihovu proliferaciju. Stanice će se moći vezati zbog prisutnosti negativno nabijenih grupa na površini te proteina poput kolagena, fibronektina i dr. kojima se oblažu boce za uzgoj. Te proteine inače stanice u *in vivo* uvjetima same izlučuju u ekstracelularni matriks (Adams, 1990; Cooper, 2000). Osim interakcija između stanica i podloge, vrlo su važne i interakcije između stanica međusobno. U njih su uključene dvije vrste molekula, CAM (*Cell Adhesion Molecules*) koje su neovisne o  $Ca^{2+}$ , te kadherini ovisni o  $Ca^{2+}$ . Monoslojni uzgoj je najčešće korištena metoda uzgoja stanica. Opskrba nutrijentima je jednostavna, uklanjanje otpadnih tvari efikasno, međutim, monoslojne kulture su neprikladne za poticanje diferencijacije stanica (Yuichi i sur., 1993). Prednosti ove metode su laka promjena medija i ispiranje stanica, jednostavna perfuzija zbog imobiliziranosti stanica, učinkovito izlučivanje produkata. Također, za ovakav su uzgoj pogodne sve stanične kulture. S druge strane, mogući nedostaci su kompliciranije i teže prenošenje kulture u veće mjerilo, neučinkovito praćenje staničnog rasta, potreba stanica za više prostora, teža kontrola parametara i postizanje homogenosti (Freshney, 2005).

Rast stanica u suspenziji općenito je prikladniji od monoslojnog budući da nije ograničen površinom. Može biti statički i dinamički ovisno o tome na koji način se postiže pravilna izmjena plinova. Statički način ima sličnosti s uzgojem u monosloju te se vrši bez miješanja i protresivanja. Dubina sloja medija je između 2 i 5 mm. Ako se dubina medija poveća, tj. stanice se nalaze u manjem volumenu (do 2 L), suspenziju je potrebno miješati te se tada radi o dinamičkom načinu uzgoja. Za miješanje se koristi magnetski štapić, tzv. „*spinner*“, koji se pokreće uz pomoć magnetske mješalice (Griffits, 2000; Freshney, 2005). Glavna prednost uzgoja stanica u suspenziji je jednostavno precjepljivanje stanica u veće mjerilo. Zbog toga što stanice nisu u kontaktu s podlogom, nije potreban tretman tripsinom te ih je dovoljno samo resuspendirati i prenijeti u željeni volumen. Uz to, nije potrebna ni česta izmjena medija, brži je proces umnožavanja, a same kulture u suspenziji imaju kratku *lag* fazu.

#### **2.4.2.1.1. HaCaT stanična linija**

HaCaT predstavlja staničnu liniju humanih keratinocita te je to prva stanična linija izolirana iz ljudskog organizma koja ima sposobnost spontane *in vitro* transformacija, a da pritom zadržava diferencijacijska svojstva i strukturu (Boukamp i sur., 1988). Staničnu liniju započeli su upravo Boukamp i suradnici kada su 1988. godine kirurški odstranili dio kože s leđa 62-godišnjeg muškarca s melanomom. Općenito, normalne epitelne stanice u uvjetima *in vitro* pokazuju

nepotpun ili alternativni diferencijacijski put. S druge strane, neke stanične linije podrijetlom iz karcinoma zadržavaju značajan kapacitet diferencijacije. Kad se takve transformirane stanične linije pasažiraju, nakon nekog vremena dolazi do osobite stabilnosti njihovog fenotipa (Fusenig i sur., 1991). Uzorak je usitnjen te ostavljen u 0,2%-tnoj otopini tripsina u PBS-u tijekom 24 - 72 h. Stanice primarne kulture su uzgajane na temperaturi oko 38 °C u kontroliranoj atmosferi, nakon čega su prenesene na ploču u koncentraciji  $1,5 \times 10^6$ . Pokazalo se kako su najbolja proliferacijska svojstva ostvarena u mediju s niskom koncentracijom  $\text{Ca}^{2+}$ . Prva subkultivacija provedena je mehanički nakon čega su se pasažiranja provodila tripsinizacijom. Nakon više od 140 pasažiranja došlo je do transformacije fenotipa *in vitro*. Stanice su postale besmrtno te se razvila kontinuirana stanična linija koju je moguće klonirati (Boukamp i sur., 1988).

Primarni keratinociti kultivirani *in vitro* u niskoj koncentraciji kalcija zadržavaju bazalni fenotip dok dodatak od  $>0,1$  mM kalcija aktivira njihovu diferencijaciju. Nažalost, primarne kulture imaju dva velika nedostatka. Prvo, one zahtijevaju dodatak faktora rasta da bi preživjele *in vitro* te drugo, nakon što ih se jednom pobudi za diferencijaciju, naglo umiru te ne dozvoljavaju dugoročna istraživanja. Nasuprot tome, besmrtno 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 će ovisiti o koncentraciji kalcija u mediju i diferencijacijskim markerima. Zbog toga HaCaT stanice predstavljaju zanimljiv *in vitro* model, a uvjeti za njihov rast i transfekciju se razlikuju od literature do literature (Deyrieux i Wilson, 2007).

## **2.5. Uzgoj i primjena staničnih linija**

Za uzgoj staničnih linija potrebni su sterilni, strogo kontrolirani uvjeti. Postoje mnogi izvori kontaminacije poput bakterija, gljivica, kvasca koji se mogu prenositi preko radne površine, atmosferom, instrumentima, kemikalijama te putem osoba koje rade u laboratoriju. Sterilni uvjeti mogu se osigurati radom u laminaru, dok se uzgoj stanica odvija u inkubatoru s kontroliranom atmosferom koja se sastoji od 95% zraka i 5%  $\text{CO}_2$ . Temperatura se kreće između 34 i 37 °C, a pH iznosi 7,4. Dezinfekcija radne površine i materijala provodi se uporabom 70%-tnog etanola. Za uzgoj je od presudne važnosti medij koji se koristi. On sadrži komponente poput aminokiselina, glukoze, masnih kiselina, vitamina, soli. Također je potrebno dodati i serum koji sadrži hormone, proteine, faktore rasta, lipide, minerale, metabolite,

inhibitore enzima, hranjive sastojke. Najčešće se dodaje u količini od 10%, a u upotrebi su fetalni goveđi, teleći i konjski serum. Većini stanica odgovara atmosfera s niskom koncentracijom kiska, dok prema osmotskom tlaku stanice imaju visoku toleranciju. Za optimalan rast stanica potrebno je periodično mijenjati medij kako bi se održao pH budući da stanice počinju gubiti vijabilnost s padom pH vrijednosti (Alberts i sur., 2002; Freshney, 2005).

## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. Materijali**

#### **3.1.1. Biološki materijal**

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

#### **3.1.2. Tekstilije**

Tijekom rada korištene su odabrane standardne tkanine iz mješavine poliester/pamuka 65% /35 %, WFK 20 A obrađene antimikrobnim agensom čija je namjena korištenje u bolničkom okruženju. Postupak impregnacije tkanina proveden je na Tekstilno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu prema niže danim koracima.

Nanošenje kitozana je provedeno na džigeru u dva koraka:

1. Luženje i mercerizacija na 25 °C, 10 prolazaka kroz prvu kupku koja sadrži:
  - 20% NaOH
  - 8 g L<sup>-1</sup> Subitol MFL
2. Implementacija kitozana na 25 °C uz 10 prolazaka kroz drugu kupku koja sadrži:
  - 10 g L<sup>-1</sup> kitozana u prahu
  - 1 g L<sup>-1</sup> Felosan NOF
  - 68 g L<sup>-1</sup> SHP
  - 70 g L<sup>-1</sup> limunske kiseline

Poslije prvog koraka tkanine su isprane vrućom vodom, hladnom vodom, te neutralizirane 0,1 M octenom kiselinom i isprane do pH 7. Nakon drugog koraka tkanine su obilno isprane te podvrgnute procesu sušenja.

Sušenje i termokondenzacija je provedena na rasteznom sušioniku, Benz. Sušenje je provedeno na 100 °C u trajanju od 2 min, a termokondenzacija na 150 °C u trajanju od 4 min.

Poslije sušenja i termokondenzacije, tkanine su podvrgnute 1 i 10 ciklusa održavanja 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 2 dok se u tablici 3 nalazi prikaz uzoraka tekstilija te način njihove obrade.

**Tablica 2.** Sastav ECE-fosfatnog deterdženta (preuzeto s deklaracije proizvoda)

Composition	Mass fraction %
Linear sodium alkylbenzenesulfonate (mean length of alkane chain C <sub>11,5</sub> )	8,0 ± 0,02
Ethoxylated tallow alcohol (14 EO)	2,9 ± 0,02
Sodium soap, chain length C <sub>12</sub> – C <sub>16</sub> : 13 % to 26 % C <sub>18</sub> – C <sub>22</sub> : 74 % to 87 %	3,5 ± 0,02
Sodium tripolyphosphate	43,7 ± 0,02
Sodium silicate (SiO <sub>2</sub> :Na <sub>2</sub> O = 3,3:1)	7,5 ± 0,02
Magnesium silicate	1,9 ± 0,02
Carboxymethylcellulose (CMC)	1,2 ± 0,02
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), sodium salt	0,2 ± 0,02
Sodium sulfate	21,2 ± 0,02
Water	9,9 ± 0,02
<b>Total</b>	<b>100</b>

Uvjeti pranja:

- Omjer kupelji: 1:20
- Vrijeme pranja: 40 min
- Temperatura: 60 °C
- Koncentracija deterdženta: 2,5 g L<sup>-1</sup>

**Tablica 3.** Uzorci tekstilija dobiveni s Tekstilno-tehnološkog fakulteta i način njihove obrade:

Uzorak	Opis obrade
<b>PES/CO</b>	Netretirana pamuk/poliesterska tkanina
<b>HIP_PES/CO_20_1W</b>	Tkanina tretirana sa 20 % NaOH i obrađena u kupelji s kitozanom poslije 1 ciklusa održavanja
<b>HIP_PES/CO_20_10W</b>	Tkanina tretirana sa 20 % NaOH i obrađena u kupelji s kitozanom poslije 10 ciklusa održavanja

### 3.1.3. Kemikalije

Tijekom rada korištene su sljedeće kemikalije:

- 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
- *Muse Annexin V & Dead Cell Kit*, kat. Broj MCH 100105, Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Apsolutni etanol, Kemika, Zagreb
- Destilirana voda (dH<sub>2</sub>O)
- DMSO (dimetil sulfoksid), Kemika, Zagreb
- PBS (engl. *Phosphate Buffer Saline*) pufer

### 3.1.4. Otopine i puferi

❖ **Sastav medija DMEM-HG:**

Sastojci	Koncentracija (mg L <sup>-1</sup> )
<b><u>Aminokiseline</u></b>	
L-Arginin hidroklorid	84
L-Cistin dihidroklorid	62,6
L-Glutamin	584
L-Glicin	30
L-Histidin hidroklorid x H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O	103,79
L-Treonin	95

L-Triptofan	16
L-Valin	94

### **Vitamini**

D-1/2Ca 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 <sub>2</sub>	200
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> x 9H <sub>2</sub> O	0,1
MgSO <sub>4</sub>	97,67
KCl	400
NaHCO <sub>3</sub>	3700
NaCl	6400
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	109

### **Ostali sastojci**

D-Glukoza	4500
Na fenol crvenilo	15,9
Na piruvat	110

### **∴0,4 %-tna otopina *Trypan Blue***

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



### ❖Ishodna otopina *MTT*

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

Sterilno profiltrirati

### ❖PBS (engl. *Phosphate Buffer Saline*) pufer pH=7,4

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

pH pufera se podesi sa 5 M HCl

### 3.1.5. Oprema i uređaji

Tijekom rada u laboratoriju korištena je slijedeća oprema:

- inkubator s kontroliranom atmosferom; IR 1500, Automatic CO<sub>2</sub>, Flow Laboratories, Velika Britanija
- komora za sterilan rad (laminar); Twin 30, Gelair Flow Laboratories, Velika Britanija
- inverzni mikroskop; Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- svjetlosni mikroskop; LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- MUSE (*Muse Cell Analyzer*), Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka
- spektrofotometar, Helios- $\gamma$ , Thermo Electron Corporation, Velika Britanija
- analitička vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- centrifuga, Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija
- Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica; Assistant, Bright-Line, Njemačka
- precizna vaga, Mettler P1210, Zürich, Švicarska
- vibracijska mješalica, Tehnica Železniki, Slovenija

## **3.2. Metode rada**

### **3.2.1. Uzgoj i održavanje HaCaT stanica u kulturi**

HaCaT stanice čuvaju se u mediju za zamrzavanje (80% DMEM-HG, 10% FBS, 10% DMSO) na temperaturi od -80°C. Odmrzavanje se provodi naglo u inkubatoru na 37 °C te pri kontroliranoj atmosferi (5% CO<sub>2</sub>, 95% zraka). Nakon odmrzavanja stanice se prenesu u T-bocu u kojoj se nalazi 90% DMEM medija za uzgoj s 10% FBS-a te se nastavlja daljnji uzgoj stanica.

Da bi stanice optimalno rasle i razvijale se potrebni su određeni uvjeti. To uključuje rad u komori za sterilan rad (laminar), kontroliranu atmosferu (5% CO<sub>2</sub>, 95% zraka), temperaturu od 37 °C te redovito mijenjanje medija za uzgoj. Presađivanje stanica započinje ispiranjem stanica od iskorištenog medija i seruma, nakon čega ih je potrebno odvojiti od površine T-boce. U tu svrhu dodaje se 1 mL proteolitičkog enzima tripsina te se stanice vraćaju na kratku inkubaciju. Slijedi resuspendiranje tripsiniziranih stanica u novom mediju za uzgoj (90% DMEM medija i 10% FBS-a) te određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*. Stanice se zatim razrjeđuju dodatkom novog medija za uzgoj na koncentraciju od  $1 \times 10^5$  stanica mL<sup>-1</sup>.

### **3.2.2. Priprema tekućih ekstrakta tekstilija**

Uzorci tekstilija dobiveni s Tekstilno-tehnološkog fakulteta veličine su 60 cm<sup>2</sup> (6cm x 10cm). Uzorci se presavijaju i stavljaju u Falcon epruvetu u 9 mL DMEM medija za uzgoj i 1 mL FBS-a nakon čega se stavljaju 2 sata na tresilicu na sobnu temperaturu. Slijedi inkubacija na 37 °C u trajanju od 22 sata. Slijedeći dan otopina se sterilno filtrira (veličina pora filtera - 0,22 μm). Filtrat je ujedno i ishodna otopina koja se kasnije pomoću medija za uzgoj sa serumom razrjeđuje na željene koncentracije. Različita razrjeđenja ishodnih otopina prikazana su u tablici 4.

**Tablica 4.** Razrjeđenja ishodnih otopina

I.O. SM	Ishodna otopina medij za uzgoj HaCaT stanične kulture
1x	1600 $\mu$ L I.O. + 1600 $\mu$ L SM
2x	800 $\mu$ L I.O. + 2400 $\mu$ L SM
3x	400 $\mu$ L I.O. + 2800 $\mu$ L SM
4x	200 $\mu$ L I.O. + 3000 $\mu$ L SM
5x	100 $\mu$ L I.O. + 3100 $\mu$ L SM

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

Po 200  $\mu$ L stanične suspenzije HaCaT stanica u koncentraciji od  $1 \times 10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj otpipetira se u jažice na 96-well ploči. Stanice se inkubiraju 24 sata te se zatim uklanja medij u kojem su stanice rasle. Stanice se tretiraju različitim razrjeđenjima ishodne otopine ekstrakta tekstilija tako da se u svaku jažicu dodaje po 200  $\mu$ L svježe pripremljenog razrjeđenja. Istovremeno se prati i kontrolni uzorak stanica (200  $\mu$ L) koje rastu u svježem mediju za uzgoj uz dodatak FBS-a. Stanice se inkubiraju 72 sata nakon čega se *MTT* metodom spektrofotometrijski provjerava vijabilnost stanica. U jažice na mikrotitarskoj ploči doda se 20  $\mu$ L otopine *MTT*-a. Stanice se zatim inkubiraju 3 sata na 37 °C. Nakon 3 sata medij se vadi iz jažica te se dodaje 200  $\mu$ L DMSO-a u kojem se otapaju kristali formazana, nastali djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza, pri čemu se razvija ljubičasto obojenje. Intenzitet obojenja određuje se spektrofotometrijski pri 540 nm u odnosu na slijepu probu.

### 3.2.4. Određivanje citotoksičnog učinka ekstrakta tekstilija metodom protočne citometrije

Za određivanje načina staničnog odumiranja, stanice se pripremaju na način da se u svaku od jažica *multiwell* ploča (sa 6 jažica) nacijepi 4 mL HaCaT stanica u koncentraciji  $2 \times 10^4$  st  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj. Stanice se inkubiraju 24 sata nakon čega slijedi tretiranje odabranim razrjeđenjima ishodne otopine. Tako tretirane stanice inkubiraju se 48 sati, nakon čega se metodom protočne citometrije određuje udio živih, nekrotičnih i apoptotičnih stanica u populaciji. Postupak provođenja metode započinje uklanjanjem medija u kojem su stanice rasle

te dodatkom 500  $\mu$ L tripsina kako bi se stanice odvojile od površine jažice. Kada se stanice odvoje od površine jažice, na njih se dodaje 500  $\mu$ L prethodno izvađenog medija za uzgoj čime se dobiva stanična suspenzija iz koje se izdvaja 100  $\mu$ L za daljnju analizu. 100  $\mu$ L uzorka pomiješa se sa 100V kit-a (*Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit* kat. br. MCH100105). Slijedi 20 min inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega se uzorak stavlja u uređaj *Muse™ Cell Analyzer* te se na ekranu očitavaju podaci o broju živih stanica, onih u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica.

### 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 = ukupni 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  $p < 0,05$ .

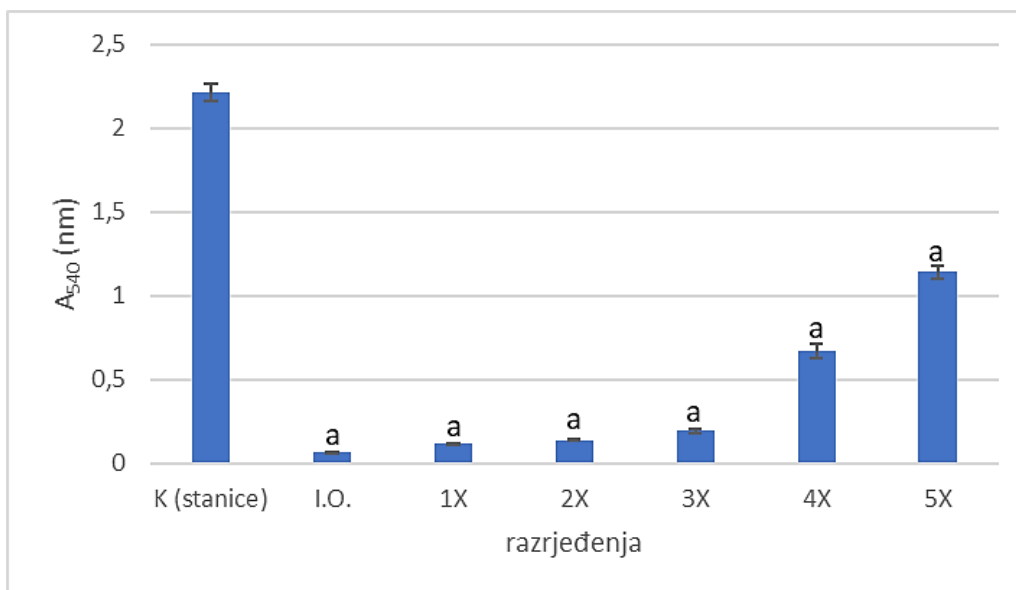
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. *In vitro* učinak potencijalno štetnih tvari kojima su impregnirane tekstilije na HaCaT staničnoj liniji određen *MTT* metodom

Velik broj kemikalija koristi se u svim koracima proizvodnje tekstilija od kojih su mnoge toksične za ljudsko zdravlje i okoliš. Npr. teški metali poput kadmija, olova, antimona koriste se kao bojila i pigmenti, a skloni su uzrokovanju neurotoksičnih, mutagenih i kancerogenih efekata. Azo bojila, koja zauzimaju 60-70% komercijalnih koloranta, mogu uzrokovati dermatitis te dovesti do oslobađanja karcinogenih i mutagenih aromatskih amina. Reproaktivna toksičnost zabilježena je kao rezultat izloženosti visoko fluoriziranoj vodi, odstranjivačima mrlja, ftalatima i antibakterijskim agensima. Nadalje, tvari poput triklorešana i klorbenzena, formaldehida te tetrakloretilena imaju direktan toksični učinak na čovjeka, od kancerogenosti do neurotoksičnosti. Zbog svega navedenog važno je bolje ispitati i kontrolirati količinu kemikalija koje se koriste za proizvodnju raznih tekstilija te limitirati uporabu onih toksičnijih (Dolez i Benaddi, 2018).

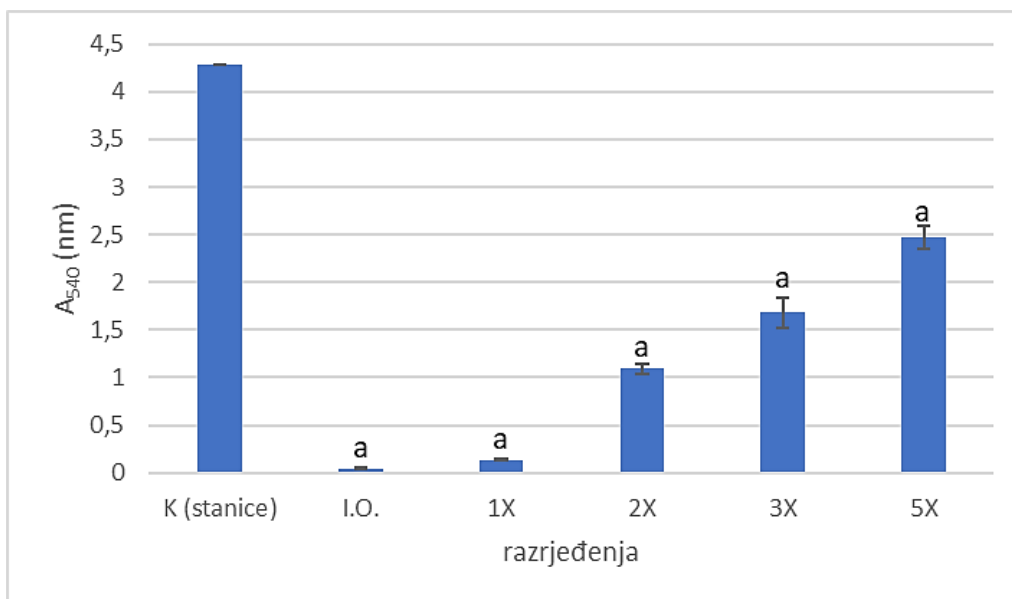
Citotoksični učinak različitih razrjeđenja (1x – 5x) ishodne otopine PES/CO (poliester/pamuk – netretirana tkanina), HIP\_PES/CO\_20\_1W (poliester/pamuk tkanina – luženje s 20%-tnim NaOH, oprana jedanput, obrada s 10 g L<sup>-1</sup> kitozan; 70 g L<sup>-1</sup> limunska kiselina; 65 g L<sup>-1</sup> natrijev hipofosfit pentahidrat; 1 g L<sup>-1</sup> felosan NOP) te HIP\_PES/CO\_20\_10W (poliester/pamuk tkanina – luženje s 20%-tnim NaOH, oprana 10 puta, obrada s 10 g L<sup>-1</sup> kitozan; 70 g L<sup>-1</sup> limunska kiselina; 65 g L<sup>-1</sup> natrijev hipofosfit pentahidrat; 1 g L<sup>-1</sup> felosan NOP) na proliferaciju HaCaT stanica određen je 72 sata nakon tretmana *MTT* metodom.

Pri ispitivanju učinka različitih razrjeđenja (1x – 5x) ishodne otopine (pripremljenoj na način da je u 10 mL medija za uzgoj dodan komad tkanine - PES/CO veličine 60 cm<sup>2</sup>) na proliferaciju i vijabilnost stanica *MTT* metodom, pri svim upotrijebljenim razrjeđenjima utvrđeno je statistički značajno smanjenje proliferacije u odnosu na kontrolni uzorak (p<0,001). Međutim, s povećanjem razrjeđenja ishodne otopine smanjuje se antiproliferativni učinak na stanice, dok je vijabilnost stanica poboljšana (Slika 4).



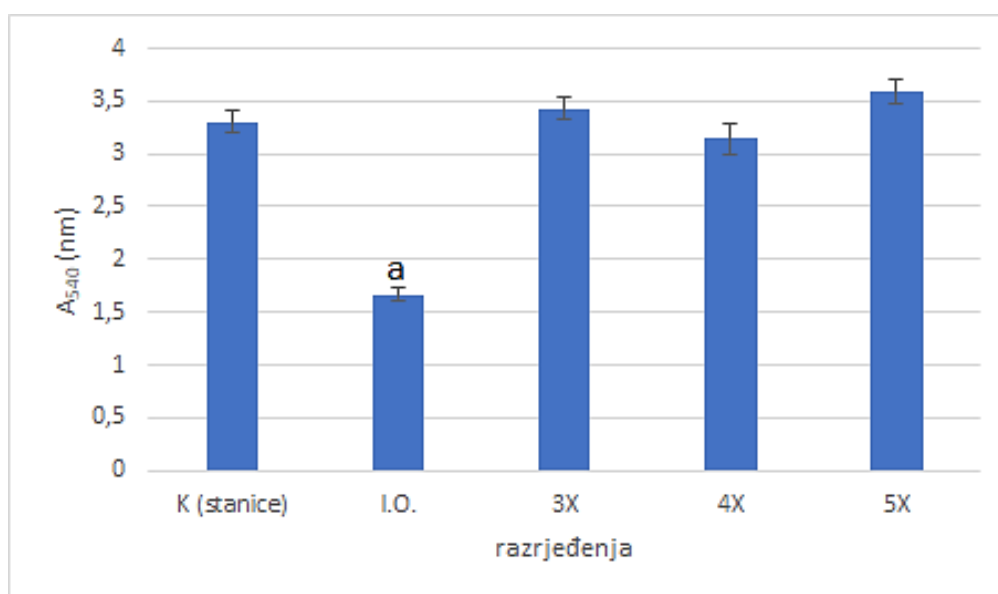
**Slika 4.** Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrjeđenjima ishodne otopine (I.O.) (pripremljenoj na način da je u 10 mL medija za uzgoj dodan komad tkanine - PES/CO veličine 60 cm<sup>2</sup>) u odnosu na kontrolne uzorke (intaktna kontrola (Ki)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup>p<0,001.

Prema rezultatima prikazanim na slici 5 možemo vidjeti da proliferacija i vijabilnost stanica značajno opada 72 sata nakon tretmana različitim razrjeđenjima (1x – 5x) ishodne otopine tvari kojim je impregnirana tekstilija - HIP\_PES/CO\_20\_1W. Statistički značajno smanjenje ( $p < 0,001$ ) uočeno je kod svih razrjeđenja u odnosu na kontrolni uzorak. Najmanja vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom uočena je kod stanica tretiranih ishodnom otopinom, a s povećanjem razrjeđenja ishodne otopine vijabilnost stanica se poboljšava.



**Slika 5.** Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrjeđenjima ishodne otopine (I.O.) tvari kojima je impregnirana HIP\_PES/CO\_20\_1W tkanina u odnosu na kontrolne uzorke (intaktna kontrola (Ki)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p < 0,001$ .

Na slici 6 prikazani su rezultati za tkaninu HIP\_PES/CO\_20\_10W. Vidljivo je da se broj vijabilnih stanica mijenja u odnosu na kontrolu s time da je statistički značajno smanjenje stanične vijabilnosti u odnosu na kontrolu uočeno samo za ishodnu otopinu ( $p < 0,001$ ). Kod stanica tretiranih razrjeđenjima 3x i 5x uočen je blagi porast vijabilnosti u odnosu na kontrolu, međutim taj porast nije statistički značajan.



**Slika 6.** Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrjeđenjima ishodne otopine (I.O.) tvari kojima je impregnirana HIP\_PES/CO\_20\_10W tkanina u odnosu na



kontrolne uzorke (intaktna kontrola (Ki)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p < 0,001$ .

U literaturi nema mnogo istraživanja sličnih ovome, međutim dosta je podataka o vijabilnosti HaCaT stanica koje su tretirane različitim agensima. Kod većine takvih radova za jednu od metoda procjene vijabilnosti korišten je upravo *MTT* test. Kako naglašavaju Ermolli i suradnici (2000), prilikom ispitivanja citotoksičnosti nikla, kobalta i kroma, uporaba *MTT* testa pokazala se opravdanom ponajviše zbog brzine i jednostavnosti korištenja te mogućnosti usporedbe s ostalim istraživanjima.

Zanette i suradnici (2011) ispitali su utjecaj nanočestica srebra na kožu koristeći HaCaT staničnu liniju te *MTT* test za dobivanje IC<sub>50</sub>. Svrha tog istraživanja bila je procijeniti potencijalnu toksičnost nanočestica srebra na HaCaT staničnu liniju koja predstavlja prepoznati model za procjenu *in vitro* toksikološkog potencijala kemikalija koje mogu izazvati štetu na koži. Nanočestice srebra poznate su po svom antibakterijskom učinku te se koriste u komercijalno dostupnim proizvodima namijenjenim direktnom kontaktu s kožom. Rezultati provedenog *MTT* testa pokazali su smanjenu mitohondrijsku funkciju stanica nakon izloženosti najvećoj koncentraciji. Nadalje, povećanje vremena kontakta stanica te nanočestica reduciralo je vijabilnost u ovisnosti o vremenu i koncentraciji.

López-García i suradnici (2014) proveli su istraživanje o odgovoru HaCaT kreatinocita na antimikrobne supstrate među kojima se našao i kitozan. Kako bi se istražio način na koji različiti antimikrobni agensi utječu na stanični rast, vijabilnost stanica te proliferaciju koristio se *MTT* test. Stanična linija nacijepljuje se na atelokolagensku matricu s različitim koncentracijama agenasa, a citotoksičnost je prikazana kao postotak stanične vijabilnosti gdje su se rezultati od 80% i više vijabilnih stanica interpretirali kao ne-citotoksičnost, između 80% i 60% kao slaba citotoksičnost, 60%-40% kao umjerena, a ispod 40% kao jaka citotoksičnost (prema ISO 10993-5 (2009)). Sve korištene koncentracije kitozana (2,0%, 1,0%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,02%) pokazale su slabu inhibiciju, odnosno stanična vijabilnost iznosila je  $>80\%$  što ukazuje na ne-citotoksičnost ovog agensa. Treba naglasiti i stabilnost te topljivost kitozana u vodi i kiselim otopinama.

Uspoređujući rezultate dobivene u ovom istraživanju za različita razrjeđenja ishodnih otopina dobivenih iz tkanina PES/CO i PES/CO\_20\_1W najveća razlika uočava se kod razrjeđenja 2x

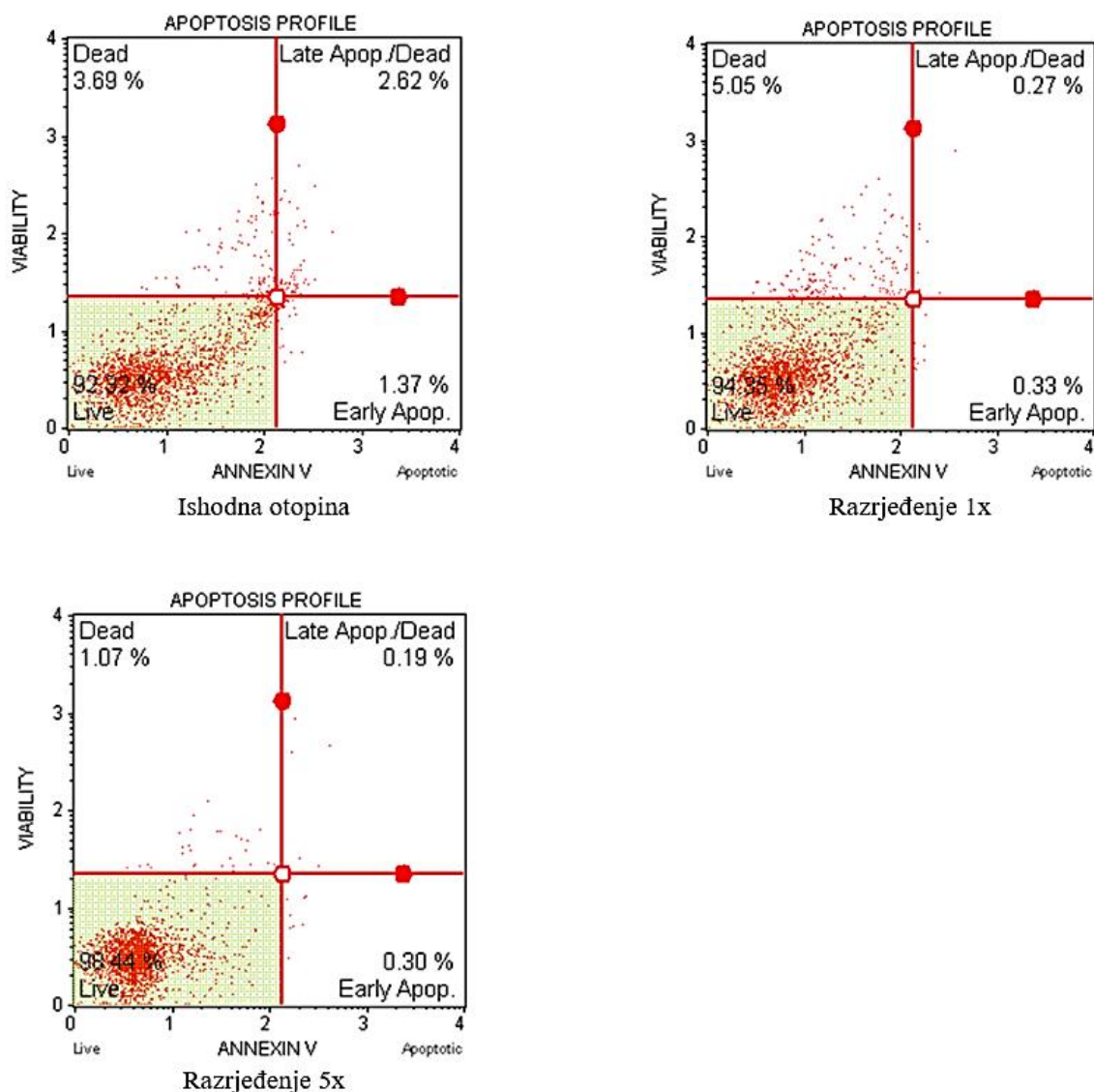
i 3x gdje je kod PES/CO\_20\_1W - tretirane tkanine nakon 1 ciklusa pranja došlo do povećanja vijabilnosti stanica u odnosu na ista razrjeđenja ishodne otopine dobivene iz tkanine PES/CO. Kada pak promatramo rezultate za PES/CO\_20\_10W tkaninu (impregniranu s kitozanom) uočava se povećanje vijabilnosti u odnosu na ista razrjeđenja ishodnih otopina dobivenih iz tkanina PES/CO i PES/CO\_20\_1W. Mogući razlog tome je utjecaj broja pranja na impregnirane kemikalije (npr. kitozan) koje se tijekom češćeg pranja ispiru te se time smanjuje njihov potencijalni citotoksični učinak.

#### **4.2. *In vitro* učinak potencijalno štetnih tvari kojima su impregnirane tekstilije na HaCaT staničnoj liniji određen metodom protočne citometrije**

Dva su u znanstvenoj literaturi najčešće spominjana tipa staničnog odumiranja, a to su - apoptoza i nekroza. Apoptoza ili programirana stanična smrt razlikuje se od nekroze po specifičnim događajima kao što su degradacija kromatina te gubitak staničnog volumena što se može povezati s raspadanjem citoskeleta. Neki od morfoloških znakova apoptoze uključuju stanično skupljanje, bubrenje membrane, nuklearnu kondenzaciju i fragmentaciju. Apoptozom se osigurava ravnoteža između stanične proliferacije i stanične smrti te ona igra regulatornu ulogu pri kontroliranju homeostaze u veličini staničnih populacija i tkiva (Kerr i sur., 1972; Vermes i sur., 2000). S druge strane, prilikom nekroze dolazi do gubitka integriteta membrane, nema kondenzacije kromatina, dolazi do dezintegracije organela, a sve završava potpunom lizom stanice (Schulze-Osthoff, 2008). Apoptoza čini sastavni dio normalnog fiziološkog procesa dok je nekroza samo pasivni rezultat oštećenja stanice (Kerr i sur., 1972).

*Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay Kit-om* moguće je kvantitativno analizirati 4 populacije stanica: žive stanice, stanice rane apoptoze, stanice kasne apoptoze i mrtve stanice. Ispitivanje se provodi na *Muse™ Cell Analyzeru*, a rezultati su prikazani na “*dot-plot*” dijagramima na kojima su vidljive subpopulacije živih, rano apoptotičnih, kasno apoptotičnih te mrtvih stanica (Schmidt i sur., 1992).

Slijede prikazi “*dot-plot*” dijagrama za različita razrjeđenja ishodne otopine dobivene iz tekstilije PES/CO [1x (1600  $\mu$ L I.O. + 1600  $\mu$ L SM) te 5x (100  $\mu$ L I.O. + 3100  $\mu$ L SM)] (Slika 7).



**Slika 7.** Prikaz reprezentativnih „dot-plot“ dijagrama dobivenih prilikom određivanja tipa stanične smrti primjenom *Muse<sup>TM</sup> Annexin V & Dead Cell Kit-a* nakon 48-satnog tretmana HaCaT stanica s različitim razrjeđenjima dobivenim ekstrakcijom iz PES/CO tkanine.

Iz prikazanih „dot-plot“ dijagrama može se uočiti da se povećanjem razrjeđenja udio živih stanica u kulturi značajno ne mijenja. Subpopulacija mrtvih – nekrotičnih stanica najveća je prilikom tretmana razrjeđenjem 1x (1600  $\mu$ L I.O. + 1600  $\mu$ L SM) te iznosi 5,05%. Kod razrjeđenja 5x (100  $\mu$ L I.O. + 3100  $\mu$ L SM) udio mrtvih stanica iznosi 1,07% što je manje od same ishodne otopine. Najveći udio stanica u ranoj apoptozi primjećujemo kod stanica tretiranih ishodnom otopinom.

Zaključujemo kako povećanjem razrjeđenja kojim su tretirane stanice ne dolazi do značajnije razlike u distribuciji stanica po pojedinim frakcijama – udjeli živih, mrtvih, rano i kasno apoptotičnih stanica nisu se značajnije promijenili s obzirom na razrjeđenje ishodne otopine.

Sve navedeno potvrđuju i rezultati prikazani u tablici 5.

**Tablica 5.** Postotak živih, ukupno apoptotičnih i mrtvih stanica nakon tretmana različitim razrjeđenjima ishodne otopine tkanine PES/CO. I.O. – ishodna otopina; 1x - 1600  $\mu$ L I.O. + 1600  $\mu$ L SM; 5x - 100  $\mu$ L I.O. + 3100  $\mu$ L SM. Prikazane su srednje vrijednosti dvaju mjerenja.

(%)	I.O.	1x	5x
Žive stanice	92,705	94,655	98,545
Ukupne apoptotične stanice	3,870	0,595	0,335
Mrtve stanice	3,430	4,755	1,120

Podaci u literaturi na ovu tematiku su nedostatni. Međutim, protočna citometrija, odnosno *Muse Cell Analyser* koristan je alat koji je poslužio Zhao i suradnicima (2013) kako bi procijenili staničnu smrt humanih keratinocita uzrokovanu anorganskim arsenom. Krajnji cilj bio je vidjeti na koji način kurkumin može zaštititi HaCaT stanice od citotoksičnog djelovanja arsena te prikazati njegov protektivni učinak. Izloženost anorganskom arsenu može dovesti do raznih kožnih oboljenja, uključujući hiperkeratozu te rak kože. Stanice keratinocita tretirane su različitim koncentracijama kurkumina te se nakon 6 sati dodao  $iAs^{3+}$ . Mjerenje se provodilo *Muse Cell Analyser-om* te su analizirane apoptotične i nekrotične stanice. Mjerenje je pokazalo kako izloženost 30  $\mu$ M  $iAs^{3+}$  tijekom 20 sati drastično povećava postotak apoptotičnih stanica dok dodatak 2,5  $\mu$ M ili 5  $\mu$ M kurkumina reducira apoptotičnu staničnu smrt.

Mammone i suradnici (2000) koristili su ovu metodu kako bi razlikovali apoptotične i nekrotične puteve kod HaCaT stanica uzrokovane UVB zračenjem. Rezultati su pokazali kako UVB zračenje inducira apoptozu pri niskim dozama, ali uzrokuje nekrozu kod većih doza.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Stanična linija humanih keratinocita (HaCaT), uz primjenu *MTT* metode te protočne citometrije, pokazala se kao zadovoljavajući alternativni test sustav za praćenje toksičnosti kationiziranih i antimikrobno obrađenih tekstilija.
2. Statistički značajno smanjenje proliferacije u odnosu na kontrolni uzorak ( $p < 0,001$ ) određeno *MTT* metodom nakon 72 h utvrđeno je kod ishodne otopine kao i kod svih razrjeđenja (1x – 5x) dobivenih iz ishodne otopine tvari koja je pripravljena ekstrakcijom PES/CO tkanine.
3. Statistički značajno smanjenje proliferacije u odnosu na kontrolni uzorak ( $p < 0,001$ ) određeno *MTT* metodom nakon 72 h utvrđeno je kod svih razrjeđenja (1x – 5x) dobivenih iz ishodne otopine tvari kojim je impregnirana tekstilija HIP\_PES/CO\_20\_1W.
4. Statistički značajno smanjenje stanične vijabilnosti u odnosu na kontrolu uočeno je samo za ishodnu otopinu ( $p < 0,001$ ) tvari kojim je impregnirana tekstilija HIP\_PES/CO\_20\_10W.
5. Metodom protočne citometrije utvrđeno je da se nakon 48-satnog tretmana HaCaT stanica s različitim razrjeđenjima ishodne otopine dobivene ekstrakcijom iz PES/CO tkanine udjeli živih, mrtvih, rano i kasno apoptotičnih stanica nisu se značajnije promijenili s obzirom na razrjeđenje ishodne otopine.

## 6. LITERATURA

- Abcam (2017) Introduction to flow cytometry, <<https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>>. Pristupljeno 26. lipnja 2019.
- Adams, R. L. P. (1990) Cell culture for biochemists, U: *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Vol 8.*, 2. izd. (Burdon, R. H., van Knippenberg, P. H., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 50-55.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) Molecular biology of the cell, 4. izd., Garland Science, New York.
- Atterwill, C. K. (1995) Alternative method of assessing toxicity. U: *In Vitro Toxicity Testing Protocols, Vol 43* (O'Hare, S., Atterwill, C.K., ured.), Humana Press, Totowa, New Jersey, str. 1-9.
- Bellich, B., D'Agostino, I., Semeraro, S., Gamini, A., Cesaro, A. (2016) „The Good, the Bad and the Ugly“ of chitosans. *Mar. Drugs* **14**, 99.
- Bischof Vukušić, S., Flinčec Grgac, S., Katović, D. (2007) Antimikrobna modifikacija tekstilija i problematika metoda ispitivanja. *Tekstil: časopis za tekstilnu tehnologiju i konfekciju* **56**, 36-49.
- Boukamp, P., Petrussevka, 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**, 761-771.
- Burnett-Boothroyd, S. C., McCarthy B. J. (2011) Antimicrobial treatments of textiles for hygiene and infection control applications: an industrial perspective. U: *Textiles for hygiene and Infection Control* (McCarthy, B. J., ured.), Woodhead Publishing, Sawston/Cambridge, str. 196-209.
- Carter, M., Shieh, J. (2015) *Research Techniques in Neuroscience*, 2. izd., Academic Press, London.
- Cooper, G. M. (2000) *The Cell - a Molecular Approach*, 2. izd., ASM Press Washington.
- Deyrieux, A. F., Wilson, V. G. (2007) *In vitro* culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology* **52**, 77-83.
- Dolez, P. I., Benaddi, H. (2018) Toxicity testing of textiles, U: *Advanced Characterization and Testing of Textiles* (Dolez, P., Vermeersch O., Izquierdo, V., ured.), Woodhead Publishing, Sawston/Cambridge, str. 151-188.

- 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.
- Ermolli, M., Manne, C., Pozzi, G., Serra, M. A., Clerici, L. A. (2000) Nickel, cobalt and chromium-induced cytotoxicity and intracellular accumulation in human hacaat keratinocytes. *Toxicology* **159**, 23-31.
- Fedoroff, S. (1977) Primary cultures, cell lines and cell strains: terminology and characteristics. U: *Cell, Tissue and Organ Cultures in Neurobiology* (Fedoroff, S., Hertz, L., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 265-286.
- Freshney, R. I. (2005) *Culture of Animal Cells – a Manual of Basic Technique*, 5. izd., JohnWiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Fusenig, N. E., Breitkreutz, D., Boukamp, P. (1991) Differentiation potential of Cancer Cells. U: *Human Cancer in Primary Culture, A Handbook* (Masters, J. R. W., ured.), Kluwer Academic, Dordrecht, str. 55-80.
- Gao, Y., Cranston, R. (2008) Recent advances in antimicrobial treatments of textiles. *Text. Res. J.* **78**, 60–72.
- Goy, R. C., De Britto, D., Assis, O. B. G. (2009) A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polimeros* **19**, 241–247.
- Griffiths, B. (2000) Scaling-up of animal cell cultures. U: *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 3. izd. (Masters, J. V. R., ured.), Oxford University Press, New York, str. 19 – 58.
- Gupta, D., Bhaumik, S. (2007) Antimicrobial treatments for textiles. *Indian. J. Fibre Text.* **32**, 254-263.
- Harifi, T., Montazer, M. (2017) Application of nanotechnology in sports clothing and flooring for enhanced sport activities, performance, efficiency and comfort: a review. *J. Ind. Textil.* **46**, 1147-1169.
- Hartung, T., Balls, M., Bardouille, C., Blanck, O., Coecke, S., Gstraunthaler, G., Lewis, D. (2002) Good cell culture practice. *ATLA* **30**, 407 – 414.
- Helander, I., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., Roller, S. (2001) Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **71**, 235–244.

- 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.
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K. (1996) A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 1518-1520.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257.
- Khajavi, R., Bahadoran, M. M. S., Bahador, A., Khosravi, A. (2013) Removal of microbes and air pollutants passing through nonwoven polypropylene filters by activated carbon and nanosilver colloidal layers. *J. Ind. Textil.* **42**, 219-230.
- 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.
- LO - Laboroptik GmbH (2010) Manufacturing laboratory equipment, <<http://www.lo-laboroptik.de/englisch/info/info.html>>. Pristupljeno 2. studenog 2019.
- López-García, J., Lehooký, M., Humpolíček, P., Sáha, P. (2014) HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. *J. Funct. Biomater.* **5**, 43-57.
- Lou, M. M., Zhu, B., Muhammad, I., Li, B., Xie, G. L., Wang, Y. L., Li, H. Y., Sun, G. C. (2011) Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen *Burkholderia seminalis*. *Carbohydr. Res.* **346**, 1294–1301.
- Mammone, T., Gan, D., Collins, D., Lockshin, R. A., Marenus, K., Maes, D. (2000) Successful separation of apoptosis and necrosis pathways in HaCaT keratinocyte cells induced by UVB irradiation. *Cell Biol. Toxicol.* **16**, 293-302.
- Mansfield, R. G. (2002, 01. veljača) Keeping it fresh: antimicrobial agents can be used in fibers and textiles to provide long lasting protection against microbial growth, <<https://www.textileworld.com/textile-world/nonwovens-technical-textiles/2002/02/keeping-it-fresh-3/>>. Pristupljeno 26. rujna 2019.



- Market research report (2019) Antimicrobial textile market by active agents (synthetic organic compounds, metal & metallic salts, bio-based), application (medical textiles, apparels, home textiles), fabric (cotton, polyester, and polyamide), and region - global forecast to 2024. <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/antimicrobial-textile-market-254286152.html>>. Pristupljeno 27. rujna 2019.
- Merck Millipore (2017) Muse Cell Analyzer, <<https://www.luminexcorp.com/muse-cell-analyzer/>>. Pristupljeno 18. lipnja 2019.
- Morais, D. S., Guedes, R. M., Lopes, M. A. (2016) Antimicrobial approaches for textiles: from research to market. *Materials* **9**, 498.
- Morales, M. E., Ruiz, M. A. (2016) Microencapsulation of probiotic cells: applications in nutraceutical and food industry. U: *Nutraceuticals*, 4. izd. (Grumezescu, A. M., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 627-668.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**, 55-63.
- Munoz-Price, L. S., Arheart, K. L., Mills, J. P., Cleary, T., Depascale, D., Jimenez, A., Fajardo-Aquino, Y., Coro, G., Birnbach, D. J., Lubarsky, D. A. (2012) Associations between bacterial contamination of health care workers' hands and contamination of white coats and scrubs. *Am. J. Infect. Control* **40**, 245–248.
- Muzzarelli, R., Tarsi, R., Filippini, O., Giovanetti, E., Biagini, G., Varaldo, P. E. (1990) Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 2019–2023.
- Purwar, R. (2018) Antimicrobial textiles. U: *The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology* (Ul-Islam, S., Butola, B. S., ured.), Woodhead Publishing, Sawston/Cambridge, str. 281-306.
- Qin, Y. (2009) Antimicrobial textile dressings in managing wound infection. U: *Advanced Textiles for Wound Care* (Rajendran, S., ured.), Wooden Publishing, Sawston/Cambridge, str. 179-197.
- Schaeffer, W. I. (1984) Usage of vertebrate, invertebrate and plant cells, tissue and organ culture terminology. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* **20**, 19-24.
- Schmidt, I., Krall, W. J., Uittenbogaart, C. H., Braun, J., Giorgi, J. V. (1992) Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry.* **13**, 204-208.

- Schulze-Osthoff, K. (2008) How cells die: Apoptosis and other cell death pathways. U: *Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation*, 4. izd. (Rode, H.-J., ured.), Roche Diagnostics GmbH, Frankenthal-Eppstein, str. 1-18.
- Siewerts, A. M., Klijn, J. G. M., Peters, H. A., Foekens, J. A. (1995) The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC<sub>50</sub>-values and cell survival. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **33**, 813-823.
- Strober, W. (2015) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **111**, A3.B.1-A3.B.3
- Sun, G. (2016) Introduction: development of antimicrobial textiles. U: *Antimicrobial Textiles* (Sun, G., ured.), Woodhead Publishing, Sawston/Cambridge, str. 1-3.
- Swicofil (1995) Introduction to chitin/chitosan. <<https://www.swicofil.com/commerce/products/chitin/277/introduction>>. Pristupljeno 16. rujna 2019.
- Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. (2000) Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods* **243**, 167–190.
- Wolf, J. B. (2010) Tissue Culture Methods. University of Maryland, Baltimore. <<https://userpages.umbc.edu/~jwolf/method5.htm>>. Pristupljeno 23. svibnja 2019.
- Yuichi, M., Toshiaki, T., Manabu, Y. (1993) Cytotoxicity test method. US Patent 5229288.
- 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.
- Zhao, R., Yang, B., Wang, L., Xue, P., Deng, B., Zhang, G., Jiang, S., Zhang, M., Liu, M., Pi, J., Guan, D. (2013) Curcumin Protects Human Keratinocytes against Inorganic Arsenite-Induced Acute Cytotoxicity through an NRF2-Dependent Mechanism. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

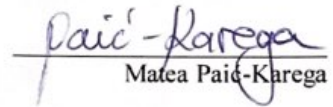
Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Matea Paić-Karega

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

  
Matea Paic-Karega