

Ispitivanje učinka kationiziranih i antimikrobno obrađenih tekstilija na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanične linije

Holetić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:381248>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported/Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 3.0](#)

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, veljača 2020.

Ivana Holetić

1050/N

**ISPITIVANJE UČINKA
KATIONIZIRANIH I
ANTIMIKROBNO OBRAĐENIH
TEKSTILIJA NA VIJABILNOST I
PROLIFERACIJU HaCaT STANIČNE
LINIJE**

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

ZAHVALA

Ovim putem bih se zahvalila mentorici doc. dr. sc. Teuti Murati na stručnom vodstvu i vjetru u leđa te izv. prof. dr. sc. Ivani Kmetič i mag. ing. Marini Miletić na pomoći i savjetima prilikom 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 UČINKA KATIONIZIRANIH I ANTIMIKROBNO OBRADENIH TEKSTILIJA NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU HaCaT STANIČNE LINIJE

Ivana Holetić, 1050/N

Sažetak: Zbog povećane bakterijske rezistencije se javila potreba za razvojem antimikrobno obrađenih tekstilija koje bi se koristile u bolnicama i zdravstvenim ustanovama. Međutim, antimikrobne tvari koje se koriste za obradu tekstilija se moraju pokazati sigurnima za ljudsku upotrebu. S obzirom da se radi o tekstilijama, prvi sustav koji dolazi u kontakt s antimikrobnim agensom je koža. Stoga se mora osigurati da neće biti toksičan za kožu te da neće izazivati alergije i iritacije. U ovom radu je ispitana potencijalna toksičnost tvari kojima su impregnirane tekstilije koristeći staničnu liniju humanih keratinocita HaCaT. *MTT* metoda je korištena u svrhu određivanja potencijalnog negativnog učinka tvari na proliferaciju i staničnu vijabilnost. Uočena je manja citotoksičnost kod tekstilija koje su oprane 10 puta u odnosu na one samo jednom isprane, pretpostavlja se zbog ispiranja potencijalno toksičnih tvari s tekstilije. Kako bi se odredio udio živih, mrtvih te rano i kasno apoptotičnih stanica korištena je metoda protočne citometrije.

Ključne riječi: HaCaT, kitozan, *MTT* metoda, protočna citometrija, antimikrobno obrađene tekstilije

Rad sadrži: 43 stranice, 7 slika, 5 tablica, 68 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc.dr.sc. Teuta Murati

Pomoć pri izradi: izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetič
Marina Miletić, mag.ing., asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 28. veljače, 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

THE EFFECTS OF CATIONIZED AND ANTIMICROBIAL PROCESSED TEXTILES ON THE VIABILITY AND PROLIFERATION OF HaCaT CELL LINE

Ivana Holetić, 1050/N

Abstract: Due to increased bacterial resistance, there was a need for the development of antimicrobial processed textiles for use in hospitals and healthcare facilities. However, antimicrobials used in textile processing must be safe for human use. Since the skin is first system that comes in contact with an antimicrobial agent impregnated in textile, it must be ensured that they will not cause dermal toxicity, allergies or irritations. In this work, the potential toxicity of textile impregnated substances using HaCaT cell line - human keratinocytes was examined. The *MTT* method was used to determine potential negative effect of substance on proliferation and cell viability. It was observed that textiles that were washed 10 times were more toxic than the rinsed ones, presumably due to the leaching of potentially toxic substances from the textile. Flow cytometry was used to determine the percentage of living, dead, and early and late apoptotic cells.

Keywords: HaCaT, chitosan, *MTT* method, flow cytometry, antimicrobial processed textiles

Thesis contains: 43 pages, 7 figures, 5 tables, 68 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Teuta Murati, Assistant Professor

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

Reviewers:

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

Thesis defended: February 28, 2020

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. STANIČNE KULTURE | 2 |
| 2.1.1. Primarne stanične linije..... | 3 |
| 2.1.2. Konačne i kontinuirane stanične linije..... | 3 |
| 2.1.2.1. Stanične kulture u suspenziji..... | 5 |
| 2.1.2.2. Stanične kulture u monosloju..... | 5 |
| 2.2. UZGOJ I PRIMJENA STANIČNIH LINIJA | 7 |
| 2.2.1. Medij i serum za uzgoj životinjskih staničnih linija | 8 |
| 2.2.2. Primjena životinjskih staničnih linija..... | 10 |
| 2.3. TESTOVI CITOTOKSIČNOSTI | 11 |
| 2.3.1. <i>In vitro</i> testovi toksičnosti..... | 11 |
| 2.4. TEKSTILIJE TRETIRANE ANTIMIKROBNIM AGENSIMA | 12 |
| 2.4.1. Antimikrobni agensi..... | 13 |
| 2.4.1.1. Kitozan | 14 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 17 |
| 3.1. MATERIJALI | 17 |
| 3.1.1. Biološki materijal | 17 |
| 3.1.2. Tekstilije..... | 17 |
| 3.1.3. Kemikalije | 19 |
| 3.1.4. Otopine i puferi | 19 |
| 3.1.5. Oprema i uređaji..... | 21 |
| 3.2. METODE RADA | 22 |
| 3.2.1. Uzgoj monoslojne HaCaT stanične linije | 22 |
| 3.2.2. Priprema tekućih ekstrakata tekstilija | 23 |
| 3.2.3. Određivanje citotoksičnosti antimikrobnih tvari kojima su impregnirane tekstilije <i>MTT</i> metodom..... | 24 |
| 3.2.3.1. Priprema stanica za određivanje stanične vijabilnosti <i>MTT</i> metodom..... | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.3.2. Postupak određivanja vijabilnosti stanica MTT metodom | 25 |
| 3.2.4. Određivanje citotoksičnosti antimikrobnih tvari kojima su impregnirane tekstilije metodom protočne citometrije | 25 |
| 3.2.4.1. Priprema stanica za metodu protočne citometrije | 26 |
| 3.2.4.2. Postupak određivanja načina staničnog odumiranja | 27 |
| 3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA | 28 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 29 |
| 4.1. UČINAK EKSTRAKATA IZOLIRANIH IZ TEKSTILIJA KOJE SU TRETIRANE ANTIMIKROBNIM AGENSOM NA VIJABILNOST HaCaT STANIČNE LINIJE ODREĐEN MTT METODOM | 29 |
| 4.2. UČINAK EKSTRAKATA IZOLIRANIH IZ TEKSTILIJA KOJE SU TRETIRANE ANTIMIKROBNIM AGENSOM NA VIJABILNOST HaCaT STANIČNE LINIJE ODREĐEN METODOM PROTOČNE CITOMETRIJE..... | 33 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 38 |
| 6. LITERATURA..... | 39 |

1. UVOD

Osim u modnoj industriji, tekstilije su našle svoju primjenu u pročišćavanju otpadnih voda, u prehrambenoj inustriji prilikom pakiranja hrane, proizvodnji filtera, itd. Također, imaju važan utjecaj na sportsku i vojnu izvedbu te se razvijaju tekstilije s raznim svojstvima kao što je neutraliziranje neugodnog mirisa znoja. Osim navedenih, uočena je sve veća važnost tekstilija u bolnicama i zdravstvenim institucijama. Koriste se kao pomoć pri zarastanju rana te liječenju pojedinih stanja (atopijski dermatitis) (Hilgenberg i sur., 2016). Međutim, tekstilije su zbog svojih svojstava, kao što su velika površina i sposobnost zadržavanja vode, dobar medij za rast raznih mikroorganizama kao što su gljivice i bakterije (Gao i Cranston, 2008). Kako bi se spriječila bakterijska kontaminacija te kako bi higijenski standardi bili u korak s vremenom, počelo se razmišljati o razvoju antimikrobno tretiranih tekstilija.

Kao antimikrobni agens za tretiranje tekstilija se koristi kitozan, kationski polisaharid koji se dobiva deacetilacijom hitina izoliranog iz egzoskeleta rakova ili staničnih stijenki gljiva. Ovaj linearni polisaharid se sastoji od dvije monomerne jedinice, D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina, koje su povezane β -1,4-glikozidnom vezom (Wiegand i sur., 2010). Posjeduje biološka svojstva kao što je antitumorski učinak (No i sur., 2002), djeluje kao hemostatik (Rao i Sharma, 1997), ima pozitivan učinak na zacjeljivanje rana (Diegelmann i sur., 1996). Također, pokazuje antimikrobnu aktivnost prema širokom spektru mikroorganizama kao što su gljivice, alge i neke vrste bakterija inhibirajući njihov rast (No i sur., 2002; Seyfarth i sur., 2008).

Cilj ovog rada je preliminarno ispitati potencijalnu citotoksičnost kationiziranih i antimikrobno obrađenih tekstilija. Antimikrobno tretirane tekstilije su zaprimljene s Tekstilno-tehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Radi se o pamučnim tekstilijama koje se razlikuju po načinu obrade i broju pranja. Kao testni sustav koristiti će se HaCaT stanična linija humanih keratinocita, a učinak antimikrobno tretiranih tekstilija na vijabilnost i proliferaciju stanica utvrditi će se *MTT* metodom i metodom protočne citometrije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. STANIČNE KULTURE

Kultivacija stanica označava skup procesa koji uključuju izolaciju stanica iz organizma (*in vivo*) te njihov uzgoj u kontroliranim uvjetima (*in vitro*) (Hudu i sur., 2016). Taj postupak datira s početka 20. stoljeća, a razvijen je kako bi se mogla bolje proučiti svojstva stanica *in vitro*. Primarno su to bile kulture tkiva iz kojih su se koristile stanice koje su migrirale iz tkivne nakupine i nastavile svoj rast na hranjivoj podlozi. Prva kultivirana kontinuirana stanična linija je L929 koja je izolirana iz L-stanica miša 1943. godine. Pasažiranje se najprije provodilo mehanički, tj. stanice su se mehanički odvajale od podloge te se napokon 50-ih godina dvadesetog stoljeća uvodi tripsinizacija. Dulbecco opisuje postupak kako se pomoću tripsina monoslojne stanice mogu lako odvojiti od podloge za rast te na taj način olakšava manipulaciju stanicama i razvijanje staničnih linija. Različiti organizmi su se koristili za izolaciju animalnih stanica - žabe, embrij kokoši, ribe, međutim, dominantu ulogu su preuzeli miševi, jer uz genetsku stabilnost pokazuju svojstvo jednostavnog uspostavljanja kontinuiranih staničnih linija. 1952. godine je uspostavljena prva kontinuirana humana stanična linija - HeLa koja je dobivena iz stanica raka cerviksa, koja se i danas koristi u brojnim istraživanjima zahvaljujući svojoj izdržljivosti i proliferacijskoj sposobnosti. Osim njih, uspostavljene su i brojne druge humane stanične linije kao što su stanična linija epidermalnih keratinocita, stanična linija bronhijalnog epitela i vaskularnog endotela te brojne druge (Freshney, 2005).

Primjena staničnih kultura omogućuje nam kontrolu fizikalno-kemijskih čimbenika (pH, temperatura, osmotski tlak, omjer O₂ i CO₂) te fizioloških uvjeta (medij i serum), koji unatoč tome što ne mogu uvijek biti točno definirani, mogu se održavati relativno konstantnima. Prednosti korištenja staničnih kultura su osim kontrole fizikalno-kemijskih i fizioloških čimbenika, i kontrola mikrookoliša, homogenost stanične linije, jednostavna citološka i imunološka karakterizacija, smanjeno korištenje životinjskih modela. Kao i svaka eksperimentalna metoda, i ova ima svoje nedostatke, a to su: potrebna stručnost za rukovanje stanicama (sterilni uvjeti, mogućnost kemijske i mikrobiološke kontaminacije), kontrola radnih uvjeta (radnog mjesta, inkubatora, odlaganje toksičnog otpada), cijena (oprema laboratorija i nabava svih potrebnih materijala), genetska nestabilnost stanica (heterogenost, varijabilnost), fenotipska nestabilnost stanica (dediferencijacija, adaptacija, selektivni rast), otežana identifikacija vrste stanica (markeri nisu uvijek izloženi, mikrookoliš utječe na histologiju i citologiju)(Freshney, 2005).

2.1.1. Primarne stanične linije

Primarna linija odnosi se na fazu nakon izolacije stanica iz tkiva, a prije prve subkultivacije. Nakon izolacije uzorka tkiva, primarna linija se može dobiti na dva načina: dopuštajući stanicama da slobodno migriraju iz tkivnih fragmenata na podlogu za rast ili usitnjavanje tkiva (mehanički ili enzimski) dok se ne dobije suspenzija stanica koje kasnije prijanjaju na podlogu za rast. Primarne kulture se izoliraju iz embrionalnih, diferenciranih ili tumorskih tkiva. Glavna prednost primarnih kultura je što zadržavaju specifična tkivna svojstva, tj. biokemijske i morfološke karakteristike izoliranih stanica su slične onima iz originalnog tkiva. Embrionalno tkivo ima bržu proliferaciju stanica u primarnoj kulturi za razliku od već diferenciranih tkiva (Arango i sur., 2013).

Usitnjavanje tkiva i uspostavljanje primarne kulture je najvažniji korak prilikom uspostavljanja stanične kulture. Rukovanje uzorcima tkiva te izolacija i uspostavljanje stanične kulture se provodi u aseptičkim uvjetima. Mehanička izolacija uključuje usitnjavanje tkiva pomoću pincete i škarića do fragmenata veličine 1 mm³ koji se zatim protiskuju kroz nekoliko sita čija se veličina pora postupno smanjuje dok se ne dobije suspenzija stanica. Mehaničkom izolacijom se prije dobije suspenzija stanica nego enzimskom izolacijom, no postoji mogućnost od mehaničkog oštećenja stanica. Mehanička izolacija stanica je pogodna za meka tkiva kao što su gušterača, jetra, mozak te meki humani i animalni tumori (Mitra i sur., 2013).

Enzimskoj disagregaciji prethodi mehaničko usitnjavanje tkiva, koje se potom tretira otopinom proteolitičkih enzima, ovisno o kojem tipu stanica se radi. Najčešće korišten proteolitički enzim je tripsin jer ga većina stanica jako dobro podnosi te je učinkovit za mnoga tkiva. Međutim, treba ograničiti vrijeme kojem su stanice izložene djelovanju tripsina kako ih ne bi oštetio. Eventualni zaostaci tkiva se filtriraju kroz sita. Najčešće korišteni enzimi uz tripsin su kolagenaza, elastaza, pronaza, dispaza, DNA-aza i hijaluronidaza, te se koriste samostalno ili u kombinaciji. Tripsin i pronaza daju najpotpuniju disagregaciju, no mogu uzrokovati oštećenje stanica, dok su kolagenaza i dispaza nježnije, međutim disagregacija je nepotpuna (Freshney, 2005).

2.1.2. Konačne i kontinuirane stanične linije

Kada primarna kultura naraste toliko da zauzme cijelu površinu za rast i potroši dostupne hranjive tvari, potrebno ju je precijepiti na novu podlogu za rast te joj osigurati potrebne hranjive tvari. Na taj se način iz heterogene primarne kulture, koja sadrži brojne različite vrste stanica iz originalnog tkiva,

dobiva homogenija stanična kultura. Nakon prve subkultivacije, tj. nakon prvog pasažiranja, primarna kultura se naziva staničnom linijom. Stanice se sada mogu dalje umnožavati, mogu se okarakterizirati te pohraniti do sljedeće uporabe. Također, veći broj uniformiranih stanica otvara nova vrata za eksperimentalne mogućnosti (Freshney, 2002).

Proces subkultivacije se odvija na tjednoj bazi te može trajati čak nekoliko mjeseci te se sastoji od odvajanja stanice od podloge za rast i precjepljivanja u novi medij. Uzastopnim subkultiviranjem se razvija stanična linija koja može sadržavati nekoliko vrsta stanica, te se kontinuiranim rastom i razmnožavanjem neka stanična svojstva gube, dok se neka nova pojavljuju. Nakon nekoliko subkultivacija stanice mogu odumrijeti ili se transformirati (Mitra i sur., 2013).

Stanične linije s ograničenim životnim vijekom se nazivaju konačnim staničnim linijama. Imaju limitiran broj staničnih ciklusa, najčešće 20 do 80 puta se podijele prije odumiranja. Broj diobi ovisi o vrsti stanica, klonalnim varijacijama i o stanju kulture. Konačne stanične linije su normalne netransformirane stanice koje mogu biti euploidne ili diploidne. Rastu u monosloju pričvršćene na podlogu za rast, a kada zauzmu cijelu površinu za rast dolazi do kontaktne inhibicije. Takve stanice imaju visoke potrebe za serumom, karakterizira ih spor rast i nizak prinos (Freshney, 2002).

Ukoliko dođe do takve transformacije stanične linije *in vitro*, gdje je narušena kontrola staničnog rasta, stanice postaju besmrtno, govorimo o kontinuiranoj staničnoj liniji. Kontinuirane stanične linije su tumorogenične, mogu biti aneuploidne ili heteroploidne, uspješno se kloniraju te ne dolazi do kontaktne inhibicije. Mogu rasti ili u suspenziji ili u monosloju te zahtjevaju manje seruma od konačnih staničnih linija. Karakterizira ih brz rast i veliki prinos te je moguć gubitak specifičnih staničnih funkcija (Mitra i sur., 2013). Kontinuirane stanične linije se lakše održavaju, brže rastu, lakše se kloniraju, daju veći prinos te su prilagodljivije za rast u bezserumskom mediju (Freshney, 2005).

Ako odaberemo samo jednu vrstu stanica kloniranjem, fizičkim odvajanjem ili nekom drugom selektivnom tehnikom, iz stanične linije ili direktno iz primarne kulture, možemo dobiti staničnu liniju koja ima određena specifična stanična svojstva i markere koje zadržava i kroz daljnje diobe (Freshney, 2005).

2.1.2.1. Stanične kulture u suspenziji

Konačne stanične linije mogu rasti samo u monosloju, a da bi stanice mogle rasti u suspenziji moraju se transformirati tijekom procesa subkultivacije. Jedino stanice malignih tumora i hematopoetske stanice (jer se i *in vivo* nalaze u suspenziji, tj. krvnoj plazmi) izvorno mogu rasti u suspenziji (Yao i Asayama, 2017).

Stanice u suspenziji nisu ograničene površinom podloge za rast, nego mogu rasti neograničeno u cijelom volumenu jer ne dolazi do kontaktne inhibicije. Međutim, mora se osigurati uravnotežena izmjena plinova da bi se izbjeglo nakupljanje štetnih tvari, promjena pH ili osmotskog tlaka koji mogu negativno utjecati na rast stanica (Griffiths, 2000). Izmjena plinova i miješanje se osigurava ubacivanjem magnetskog štapića, a posuda sa stanicama se zatim postavi na magnetsku mješalicu koja okreće štapić.

Uzgoj staničnih kultura u suspenziji ima mnogobrojne prednosti, a glavna u odnosu na uzgoj stanica u monosloju je to što je jednostavnije precjepljivanje stanice u veće mjerilo. Naime, s obzirom da stanice ne rastu učvršćene za podlogu, nije potreban tretman tripsinom te se stoga stanice manje oštećuju. Stanice je dovoljno mehanički resuspendirati te prenijeti u odgovarajući volumen, ili razrijediti dodatkom medija na odgovarajuću koncentraciju. Također, nije potrebna česta zamjena medija te je jednostavno održavanje stanične kulture, stanice imaju kraću *lag* fazu te je visok prinos biomase (Freshney, 2005).

2.1.2.2. Stanične kulture u monosloju

Većina staničnih linija, kontinuirane i konačne, raste u monosloju učvršćene na podlogu za rast. Podloga za rast mora biti pogodna za vezanje stanica, jer tek kada se stanice vežu na nju, moguća je proliferacija. Stoga možemo reći da je vezivanje stanica na površinu podloge za rast ključan korak u uspostavljanju stanične linije. Na površini stanica sisavaca je nejednoliko raspoređen negativni naboj zbog kojeg se stanice lakše vežu na nabijenu površinu, neovisno je li pozitivno ili negativno nabijena, ali zato vezivanje ovisi o gustoći naboja (Van der Velden-de Groot, 1995). Za formiranje monosloja važne su interakcije između stanica i podloge za rast, kao i interakcije između samih stanica. Osim negativnog naboja na površini stanica, stanice luče proteine koji olakšavaju to vezanje, kao što su fibronektin, kolagen, laminin i dr. (Cooper, 2000). Fibronektin je glikoprotein odgovoran za specifično vezanje stanica na površinu, te se nalazi u serumu uz divalentne katione. Za veze među

stanicama su uključene dvije vrste molekula, CAM (engl. *Cell Adhesion Molecules* - neovisne o Ca^{2+}) i kadherini (ovisni o Ca^{2+}) (Albelda i Buck, 1990).

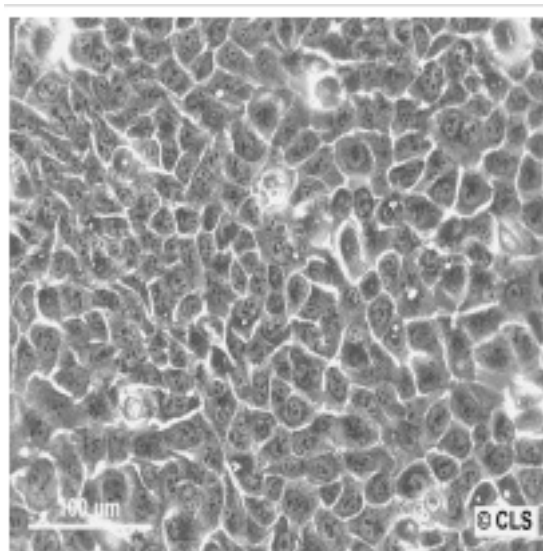
U laboratorijskoj praksi za uzgoj staničnih kultura najviše se koriste plastične T-boce koje su najčešće izrađene od polistirena koji se dodatno izlaže raznim fizičkim i kemijskim procesima kako bi se dobila nabijena površina. Također, površina T-boca se prevlači kolagenom ili želatinom (Adams, 1990) kako bi se pospješilo vezivanje stanica. Osim polistirena, za izradu plastičnih boca uz dodatnu obradu, se koriste polietilen, polikarbonat, PVC, teflon, celofan, acetat celuloza i dr. (Griffiths, 1990). Osim plastičnih materijala, staklene i metalne površine također mogu biti pogodne podloge za rast stanicama. Prvi korak u precjepljivanju monoslojnih staničnih kultura je uklanjanje medija nakon kojeg slijedi odvajanje stanica od podloge za rast pomoću tripsina, a nakon nekoliko minuta slijedi resuspendiranje stanica u novom mediju. Osim T-boca, za uzgoj stanica se mogu koristiti multiwell ploče, petrijeve zdjelice i roller boce, čija je cijela površina dostupna za rast stanica zahvaljujući rotaciji boce koja osigurava opskrbu stanica hranjivim tvarima i kisikom (Freshney, 2005).

Prednosti uzgoja stanica u monosloju su jednostavna izmjena medija, efikasnije izlučivanje produkata zbog vezivanja stanica na površinu boce, jednostavna perfuzija zbog imobiliziranosti stanica (Freshney, 2005).

HaCaT (slika 1), stanična linija humanih keratinocita, je prva epitelna stanična linija izolirana iz odraslog ljudskog organizma koja pokazuje sposobnost spontane *in vitro* transformacije istovremeno zadržavajući normalna diferencijacijska svojstva i strukturu nakon transplantacije *in vivo* (Boukamp i sur., 1988). Do 1988. godine se transformacija humanih keratinocita uspješno provodila jedino infekcijom simian virusom-40 (SV40) ili transfekcijom izolirane DNA iz SV40. Boukamp i suradnici su 1988. godine kirurški uzeli uzorak kože s gornjeg dijela leđa 62-godišnjeg muškog pacijenta (Boukamp i sur., 1988). Kako bi se stanice izolirale, s kože je odstranjeno što je više bilo moguće masnog tkiva i dermisa, nakon čega je usitnjena na komadiće veličine 1 cm^2 . Uzorci kože su ostavljeni u 0,2 % otopini tripsina u PBS-u bez Mg^+ i Ca^{2+} na $4\text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 24-72 h (ovisno o debljini kože). Stanice primarne kulture su uzgajane na 37 ili $38,5\text{ }^\circ\text{C}$ u inkubatoru s kontroliranom atmosferom koju čine 5 % CO_2 i 95 % zraka, nakon čega su prenesene na ploču u medij bogat Ca^{2+} u koncentraciji od $1,5 \times 10^5$, ali s obzirom da su najbolja proliferacijska svojstva primarne kulture postignuta u mediju s niskom koncentracijom Ca^{2+} , 5 dana nakon precjepljivanja je 6 staničnih kultura prebačeno u medij s nižom koncentracijom Ca^{2+} (0,2 mM) te se uzgoj nastavio na temperaturi od $38,5\text{ }^\circ\text{C}$. Prva subkultivacija nije bila moguća rutinskim metodama (EDTA/tripsin) nego su se mehanički morale odvojiti od podloge za rast. Nakon prve subkultivacije, sljedeća pasažiranja su se provodila

normalnom tripsinizacijom, ali je proliferacija ovisila o gustoći stanica. Nakon četvrtog pasaža proliferacija više nije bila ovisna o gustoći stanica. Epitelna svojstva stanica potvrđena su imunofluorescencijom s antitijelima za keratin i citokeratin. Nakon dužeg uzgoja proliferacija HaCaT stanica više nije ovisila o okolišnim uvjetima uzgoja, stanice su postale autonomne i moguće je kloniranje (Boukamp i sur., 1988).

Provedeno je više od 140 pasažiranja tijekom kojih je došlo do transformacije fenotipa *in vitro*, stanice su postale besmrtno, tj. razvila se kontinuirana stanična linija koja ima mogućnost kloniranja na čvrstom i polučvrstom mediju, stanice su aneuploidne, nisu tumorogenične ni invazivne *in vivo*, a zadržale su kromosomske markere koji ukazuju na njihovo podrijetlo koje je dodatno potvrđeno DNA *fingerprint* analizom (Boukamp i sur., 1988).



Slika 1. HaCaT stanična linija (CLS, 2019)

2.2. UZGOJ I PRIMJENA STANIČNIH LINIJA

Uzgoj staničnih linija iziskuje mnoštvo znanja i stručnosti kako bi se stanicama osigurali prikladni uvjeti za rast jer su vrlo osjetljive na promjene u svojoj okolini. Potrebno im je pružiti uvjete što sličnije onima *in vivo*. Rukovanje stanicama i njihov uzgoj se moraju provoditi u aseptičkim uvjetima kako bi se spriječila kontaminacija. Najvažniji je izbor medija i seruma, te treba voditi računa o ostalim čimbenicima kao što su temperatura, pH, parcijalni tlakovi otopljenog O₂ i CO₂, koji se razlikuju za pojedine kulture (Arango i sur., 2013). Animalne stanice rastu u inkubatoru u kontroliranoj atmosferi s 95 % zraka i 5 % CO₂ i na temperaturi od 34-37 °C (Freshney, 2005). Optimalni pH za rast stanica je 7,4, a kada je niži od 6,8 djeluje inhibitory na proliferaciju većine staničnih kultura. Kako bi se osigurala adekvatna pH vrijednost u mediju se koriste puferi, najčešće

bikarbonatni pufer. Osmotski tlak medija mora biti što sličniji osmotskom tlaku fiziološke otopine, osmolalnost ljudske plazme iznosi 290 mosmol kg⁻¹, stoga su mediji koji se najčešće koriste osmolalnosti od 260 - 320 mosmol kg⁻¹ (Butler, 2004).

Kako bi se pohranile, stanične kulture se smrzavaju u eksponencijalnoj fazi rasta i čuvaju se na niskim temperaturama u hladnjacima ili u spremnicima s tekućim dušikom na temperaturi od -196 °C. U medij za smrzavanje se osim seruma (10 %) i medija (80 %) dodaje 10 % krioprezervansa kao što su DMSO, glicerol, metil acetamid, metanol, etilen glikol, kako bi se smanjilo oštećenje stanica prilikom smrzavanja. Da bi preživljenje bilo što veće, preporučeno je sporo smrzavanje stanica, idealno je 1 °C po minuti, te brzo odmrzavanje u inkubatoru (Wolf, 2010).

2.2.1. Medij i serum za uzgoj životinjskih staničnih linija

Tekući medij je izvor hranjivih tvari potrebnih stanicama za proliferaciju. U počecima su se koristili prirodni mediji od pilećih embrija, limfe i seruma, no proizašla je potreba za sintetskim medijima koji su točno kemijski definirani. Sastav medija ovisi o vrsti stanica koje će se uzgajati, koncentracije svih sastojaka moraju biti točno definirane kako bi se osigurao osmotski tlak jednak onom u fiziološkoj otopini, jer u protivnom dolazi do odumiranja stanica (Yao i Asayama, 2017).

Postoji mnogo standardnih medija koji su razvijeni za rast određenih staničnih tipova, poput: BME (engl. *Basal Medium Eagle's*), EMEM (engl. *Eagle's Minimum Essential Medium*), DMEM (engl. *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) koji sadrži 4 puta veću koncentraciju aminokiselina i vitamina od BME, GMEM (engl. *Glasgow's Modification of Eagle's Medium*) koji sadrži dva puta veću koncentraciju aminokiselina i vitamina od BME (Butler, 2004).

Strogo definirani sastav medija osigurava stanicama potreban pH i osmolalnost. Medij sadrži (Alberts i sur., 2002; Butler, 2004; Freshney, 2005):

- ugljikohidrate - u većini medija je glukoza glavni izvor energije i prekursora za biosinteze (put pentoza fosfata). Uz glukozu još se koriste galaktoza, maltoza i fruktoza;
- aminokiseline - medij sadrži esencijalne i neesencijalne aminokiseline kao prekursore u sintezi proteina u koncentraciji od 0,1-0,2 mM, dok se glutamina dodaje u koncentraciji od 2-4 mM. Osim sinteze proteina, glutamin ima ulogu prekursora za nastanak intermedijera citratnog ciklusa;
- vitamine - vitamini imaju ulogu enzimskih kofaktora te se dodaju u medij u niskim koncentracijama. Većini staničnih kultura su potrebni vitamini B skupine (nikotinamid,

pantotenska kiselina, piridoksin, riboflavin, tiamin, biotin i folna kiselina), dok se ostatak vitamina dobiva iz seruma;

- anorganske soli - kako bi animalne stanice mogle rasti potrebne su im soli koje sadrže Na^+ i K^+ (regulacija membranskog potencijala), Mg^{2+} i Ca^{2+} (kofaktori u adheziji), Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} . Osim održavanja osmotskog tlaka, anorganske soli imaju pufersku ulogu, a glavnu ulogu u tome imaju bikarbonati i CO_2 , kojeg osigurava inkubator u količini od 5-10 %;
- organske sastojke - sadrži molekule masnih kiselina, lipida, proteina, peptida;
- elemente u tragovima - sadrži selen koji uklanja slobodne radikale.

Serum je kompleksna smjesa malih i velikih biomolekula koje imaju različite fiziološke aktivnosti te se dodaje mediju za uzgoj u količini od 5-10 % kako bi se potaknuo i ubrzao stanični rast. Različiti tipovi stanica imaju različite potrebe za serumom, a najviše se koriste teleći, fetalni teleći, konjski i humani serum. Najčešće se koristi fetalni teleći serum (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS) zbog visokog sadržaja faktora rasta (Cartwright, 1994), a u najvećim količinama sadrži fetuin i biotin. Fetuin stabilizira labilne komponente i veže toksične tvari, dok biotin djeluje kao promotor rasta.

Iako sastav seruma nije točno kemijski definiran, poznato je da sadrži najvažnije osnovne hranjive tvari, hormone i faktore rasta te faktore pričvršćivanja i širenja, nespecifične zaštitne faktore protiv mehaničkih oštećenja, a odgovoran je za viskoznost i održavanje pH pufera, sadrži inhibitore proteaza te vezne proteine (albumin i transferin) te vitamine, minerale, hormone i lipide. Sastav seruma (Maurer, 1981; Freshney, 2005):

- proteini - glavni su sastojci seruma, iako je nepoznata njihova točna uloga. Većina ima ulogu nosača hormona, masnih kiselina i minerala. U serumu se najčešće nalaze albumini ($30\text{-}50 \text{ mg mL}^{-1}$, služe kao nosači minerala i lipidnih spojeva kao što su spolni hormoni, steroidi, fitokemikalije i ksenobiotici (Baker, 2002)), globulini, transferini (vežu na sebe željezo, što smanjuje njegovu bioraspoloživost i toksičnost (Guilbert i Iscove, 1976), fibronektin (djeluje kao adhezivni faktor) i α -1-antitripsin (inhibitor proteaza);
- specifični faktori rasta - potiču staničnu proliferaciju. Najviše se koriste PDGF (engl. *Platelet-Derived Growth Factor*), FGFs (engl. *Fibroblast Growth Factors*), EGF (engl. *Epidermal Growth Factor*), VEGF (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*), IGF-I i IGF-II (engl. *Insulin-like Growth Factors*), IL-1, IL-6;
- hormoni - inzulin, trijodtironin, tiroksin, hidrokortizon;
- vitamini - vitamin A te folati;

- minerali - prisutni su u tragovima; bakar, željezo, cink, kalcij, kloridi, kalij, fosfati, natrij, selen, mangan, molibden, kobalt, vanadij;
- metaboliti i hranjive tvari - sadrži razne hranjive sastojke i intermedijere metabolizma; aminokiseline, glukozu, ketokiseline i dr.;
- lipidi - prisutni su u malim količinama, najčešće vezani na proteine (npr. albumin); kolesterol, masne kiseline, fosfolipidi, etanolamin, fosfoetanolamin te linolna i oleinska kiselina;
- inhibitori - TGF- β i frakcija γ -globulina.

Unatoč brojnim prednostima, uporaba seruma ima svojih nedostataka. Naime, serum za većinu stanica nije fiziološka tekućina s obzirom da se ne nalazi u izvornom tkivu. Serum može sadržavati neadekvatne količine specifičnih faktora rasta te čak može biti citotoksičan za neke tipove stanica. U serumu se mogu naći poliamin oksidaze koje u reakciji s poliaminima mogu dati citotoksične poliaminaldehide (Ali-Osman i Maurer, 1983). Prilikom upotrebe seruma, veći je rizik od kontaminacije plijesnima, mikoplazmama i virusima. Nastoji se smanjiti upotreba seruma prilikom kultivacije životinjskih stanica, te se umjesto seruma koriste obogaćeni *serum-free* mediji, koji u sebi sadrže hormone i faktore rasta. Ne mogu sve stanice rasti u takvom mediju, one zahtijevaju posebnu prilagodbu te je stoga vrlo važno obratiti pozornost na odabir staničnih kultura pogodnih za *serum-free* medij (Brunner i sur., 2010).

2.2.2. Primjena životinjskih staničnih linija

Glavni razlozi za razvoj i upotrebu staničnih kultura leže u proizvodnji antivirusnih cjepiva te proučavanju i razumjevanju tumora. Razlog tome je što nam stanične linije pomažu da poblizje upoznamo razne unutarstanične mehanizme (replikacija i transkripcija DNA, sinteza proteina, metabolizam ksenobiotika, protok molekula unutar stanice, i sl.), međustanične interakcije i interakcije s okolišem (kinetika stanične proliferacije, stanična adhezija i pokretljivost, citotoksičnost, kancerogeneza, i sl.), sintezu i sekreciju staničnih metabolita (i njihova moguća primjena u biotehnologiji) te nam omogućava analizu genoma u normalnim i promjenjenim uvjetima (Freshney, 2005).

Također, sve veći naglasak se stavlja na etičnost te se upotrebom staničnih linija broj životinja korištenih u ispitivanjima time značajno smanjuje (Freshney, 2005).

2.3. TESTOVI CITOTOKSIČNOSTI

Obavezno je testiranje toksičnosti za tvari kojima su izložni ljudski i životinjski organizmi, kao što su lijekovi, prehrambeni aditivi, pesticidi, kozmetički pripravci, kontaminanti iz okoliša, i dr. Citotoksičnost se primarno odnosi na potencijal tvari da uzrokuje staničnu smrt (Eisenbrand i sur., 2002). Testovi citotoksičnosti su razvijeni kako bi se odredila toksičnost raznih tvari na stanice, bilo kvantitativno ili kvalitativno te služe kao alat za probir prije nego što se krene u opsežnije testove toksičnosti koji uključuju životinjske modele. Testovi citotoksičnosti uključuju pristupe zasnovane na računalnim modelima te *in vitro* testove toksičnosti koji nam pomažu bolje razumjeti i predvidjeti učinak raznih tvari na organizam (Eisenbrand i sur., 2002).

2.3.1. *In vitro* testovi toksičnosti

In vitro testovi su alternativni testovi toksičnosti koji se mogu provoditi na mikroorganizmima ili prirmarnim staničnim kulturama, staničnim linijama i kulturama tkiva i organa. Koriste se za istraživanja molekularnih, staničnih i fizioloških mehanizama toksičnosti izazvanih raznim kemikalijama koje se *in vivo* ne mogu vidjeti (Kniewald i sur., 2005). Upotrebljavaju se za ispitivanje iritacije, kancerogenosti, mutagenosti, neurotoksičnosti, nefrotoksičnosti, citotoksičnosti, imunotoksičnosti, reproduktivne i endokrine toksičnosti te toksičnosti na ciljne organe.

Prednosti uporabe *in vitro* testova toksičnosti su visok stupanj standardizacije, moguće simultano i/ili ponovljeno uzimanje uzoraka, smanjuju ili potpuno zamjenjuju upotrebu životinjskih modela, provode se rutinski i brzo, nastaje manja količina toksičnog otpada te su jeftiniji od *in vivo* testova (Fotakis i Timbrell, 2006). Neki od nedostataka *in vitro* testova su nedovoljna ili potpuna odsutnost metaboličke aktivacije u staničnim sustavima kao i izmjenjena svojstva stanica, mogućnost utjecaja ispitivane tvari na sastav medija za uzgoj (npr. promjena pH koja dovodi do pogrešnih rezultata), ispitivana tvar može reagirati sa sastojcima medija što utječe na dostupnost hranjivih tvari stanicama. Također nedostatak *in vitro* testova su nedostatak validacije i službenog vrednovanja (Atterwill, 1995).

No unatoč nedostacima, *in vitro* testovi su vrlo korisni jer su prikladni za ispitivanje toksičnosti tvari na humanim staničnim linijama, što nam može dati potpunije informacije nego prilikom provođenja testova toksičnosti na životinjskim staničnim linijama ili na *in vivo* životinjskim modelima.

Najznačajnije metode koje se koriste za određivanje citotoksičnosti su *MTT*, *Neutral Red*, *Kenacid Blue* te metoda protočne citometrije.

2.4. TEKSTILIJE TRETIRANE ANTIMIKROBNIM AGENSIMA

Tekstilije su već godinama vrlo važna sirovina, što u modnoj industriji, što u ostalim granama industrije kao što su pakiranje hrane, purifikacija vode, proizvodnja filtera, sportske opreme, medicinskih aparata te u održavanju zdravlja i higijene. Zbog svojih svojstava, kao što su velika površina i sposobnost zadržavanja vode, dobar su medij za rast raznih mikroorganizama kao što su gljivice i bakterije (Gao i Cranston, 2008). Rast mikroorganizama na tekstilijama ima razne neželjene učinke ne samo na tekstiliju, već i na korisnika, kao što su nakupljanje neugodnog mirisa, smanjenje mehaničke snage, mrlje i diskoloracije te veća mogućnost za kontaminaciju korisnika. Zdravstveni objekti, prije svega bolnice, su izloženi nekoliko opasnih bakterijskih vrsta (*E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*) te se razvoj tekstilija usmjerava u produkciju tekstilija koje će imati antimikrobni učinak (Santos Morais i sur., 2016).

Postoji nekoliko kemijskih i fizičkih načina kako postići da tekstilije imaju antimikrobna svojstva, a pogodan način ćemo izabrati ovisno o vrsti vlakana, sastavu, teksturi, površini tekstilije te o antimikrobnom agensu i njegovim svojstvima. Hoće li antimikrobna tekstilija djelovati difuzijom ili kontaktom ovisi o načinu apliciranja antimikrobnog agensa. Ukoliko želimo da antimikrobna tekstilija djeluje difuzijom, antimikrobni agens se aplicira u završnoj fazi proizvodnje na površinu materijala ili u polimerni matriks. Kako bi ispoljio svoje antimikrobno djelovanje migrira difuzijom s površine tekstilije u vanjski okoliš do mikroorganizama. Ukoliko se radi o ispoljavanju antimikrobnog učinka kontaktom, specifični antimikrobni agens se inkorporira u polimerni matriks sintetičke tekstilije te ima antimikrobno djelovanje tek kada mikroorganizam dođe do njega (Gupta i Bhaumik, 2007).

Odabir postupka kojim će se tretirati tekstilija kako bi dobila antimikrobna svojstva, osim o agensu i vrsti tekstilije, također ovisi o vrsti mikroorganizma. Živi mikroorganizam je zaštićen vanjskim slojem izgrađenim od polisaharida koji štiti stanicu od vanjskih uvjeta i održava integritet staničnih komponenti. Polupropusna stanična membrana koja oblaže organele, enzime i nukleinske kiseline se nalazi ispod vanjskog sloja. Rast i preživljavanje mikroorganizma ovise o staničnom integritetu i pravilnoj funkciji zaštitnih membrana (Ghai i Ghai, 2018).

Klasifikacija antimikrobnih agenasa se provodi ovisno o načinu kojim narušavaju stanični integritet i stanične funkcije. Razlikujemo biostatski i biocidni učinak antimikrobnih agenasa. Kod biostatskog učinka agenasa se radi samo o inhibiciji staničnog rasta, a ukoliko imaju sposobnost ubiti mikroorganizme, onda govorimo o biocidnom učinku (Ghai i Ghai, 2018).

2.4.1. Antimikrobni agensi

Većina antimikrobnih agenasa koji se koriste za tretiranje komercijalnih tekstilija ima biocidne učinke. Oni se različito ispoljavaju ovisno o kemijskoj strukturi i svojstvima te ovisno prema kojim ciljnim mjestima unutar stanice imaju afinitet. Može doći do inhibicije sinteze stanične stijenke bakterija, inhibicije funkcija stanične membrane koja je odgovorna za intracelularni i ekstracelularni protok, inhibicije sinteze proteina i staničnih enzima, inhibicije sinteze nukleinskih kiselina (DNA i RNA) te inhibicije ostalih metaboličkih procesa (npr. put folne kiseline) (Santos Morais i sur., 2016).

Kao antimikrobni agensi se koriste različiti spojevi kao što su kvarterni amonijevi spojevi, triklozan, metali i metalne soli, boje, PHMB (poliheksametilen bigvanid), *N*-halamini te prirodni polimeri (kitozan) (Gao i Cranston, 2008). Od kvarternih amonijevih spojeva najčešće se koriste oni koji sadrže 12 do 18 ugljikovih atoma, a djeluju tako da nose pozitivan naboj na dušikovu atomu koji ima utjecaj na staničnu membranu i uzrokuje denaturaciju proteina (McDonnell i Russell, 1999). Triklozan (2,4,4'-trikloro-2'-hidroksifenil eter) djeluje protiv širokog spektra bakterija te nije ioniziran u otopini (Jones i sur., 2000). Djeluje tako što blokira biosintezu lipida i time inhibira mikrobni rast (Levy i sur., 1999). Od metala se najviše koristi srebro koje ima biocidalno djelovanje (Williams i sur, 2005), a mehanizam djelovanja se bazira na vezanju i inaktivaciji intracelularnih proteina (McDonnell i Russell, 1999) što za posljedicu ima staničnu smrt. Neke boje koje se koriste u tekstilnoj industriji pokazuju antimikrobnu aktivnost koja se može povećati pažljivim odabirom načina završne obrade tekstilije (Tsukada i sur., 2002). PHMB (poliheksametilen bigvanid) možemo naći pod komercijalnim imenom *Vantocil*, se koristi kao dezinfektant u prehrambenoj industriji i bazenima za plivanje (McDonnell i Russell, 1999). *N*-halamini su dezinfektanti širokog spektra, njihova antimikrobna aktivnost se zasniva na halaminskoj vezi (N-Cl) te se najčešće koriste u obradi vode (Worley i Williams, 1988).

Idealno sredstvo za antimikrobni tretman tekstilija mora zadovoljiti nekoliko faktora (Purwar i Joshi, 2004; Williams i sur., 2005):

- treba biti učinkovito prema širokom spektru bakterijskih i fungalnih vrsta, a istovremeno se pokazati sigurnim za korisnika (da nije toksičan i da ne izaziva iritacije i alergije). Tekstilije

tretirane antimikrobnim agensima moraju zadovoljiti testove citotoksičnosti, iritacije i preosjetljivosti prije plasiranja na tržište;

- završna obrada bi trebala biti izdržljiva prilikom klasičnog pranja, kemijskog čišćenja i peglanja;
- završna obrada ne bi trebala imati negativan učinak na kvalitetu i izgled tekstilije;
- završna obrada bi trebala biti u skladu s kemijskim procesima primijenjenima na tekstiliji, npr. bojanje ne smije proizvoditi tvari štetne za čovjeka i okoliš te mora biti isplativo;
- antimikrobna obrada ne bi smjela uzrokovati smrt nepatogenih bakterija na površini kože.

Dodatno, mora se voditi računa o tome da su mnogi mikroorganizmi skloni tome da postanu rezistentni, što se želi izbjeći (Santos Morais i sur., 2016).

2.4.1.1. Kitozan

Kitozan je kationski polisaharid koji se dobiva deacetilacijom hitina izoliranog iz egzoskeleta rakova ili staničnih stijenki gljiva. Ovaj linearni polisaharid se sastoji od dvije monomerne jedinice, D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina, koje su povezane β -1,4-glikozidnom vezom (slika 2). Kitozan kao pojam obuhvaća grupu polimera koji se razlikuju po molekularnoj masi, viskoznosti i stupnju deacetilacije (40-98 %) (Wiegand i sur., 2010).

Kitozan ima širok spektar upotrebe te se koristi u obradi otpadnih voda, proizvodnji papira, poljoprivredi, kozmetici, obradi hrane te kao biološki materijal za farmaceutsku i biotehnošku namjenu (Wiegand i sur., 2010). Posjeduje biološka svojstva kao što je antitumorski učinak (No i sur., 2002), djeluje kao hemostatik (Rao i Sharma, 1997), ima pozitivan učinak na zacjeljivanje rana (Diegelmann i sur., 1996). Također, pokazuje antimikrobnu aktivnost prema širokom spektru mikroorganizama kao što su gljivice, alge i neke vrste bakterija inhibirajući njihov rast (No i sur., 2002; Seyfarth i sur., 2008). Zbog antimikrobne aktivnosti se proučava njegova upotreba u medicinske svrhe te se najčešće koristi u tekstilijama od pamuka, poliesteru i vunjenih vlakana (Santos Morais i sur., 2016).

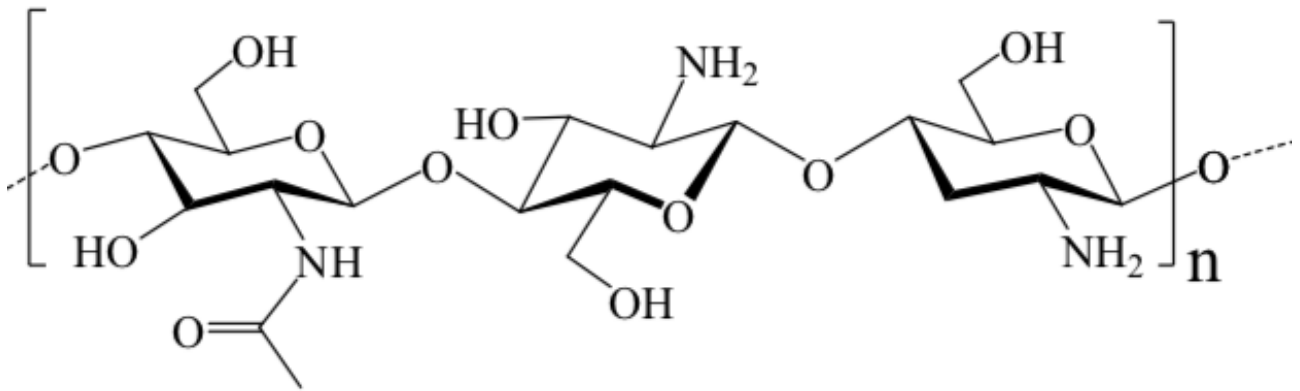
Nekoliko studija je prikupilo različite rezultate o učinku hitina i kitozana na vijabilnost i profileraciju humanih stanica. Neke studije potvrđuju stimulativni učinak (Chung i sur., 1994. su provodili istraživanje na F1000 staničnoj liniji humanih fibroblasta), dok neke, posve suprotno, potvrđuju inhibitorni učinak (Mori i sur., 1997. su koristili L929 liniju humanih fibroblasta, dok su Howling i sur., 2001. za svoje istraživanje koristili HaCaT staničnu liniju te humane fibroblaste). Također, postoje studije koje pokazuju da kitozan za sada nema dokazane učinke na vijabilnost i profileraciju

humanih stanica (Chatelet i sur., 2001. koriste fibroblaste i keratinocite, dok Okamoto i sur., 2002. koriste staničnu liniju HUVEC (engl. *Human Umbilical Vascular Endothelial Cells*)). Ovakvi rezultati se dijelom mogu objasniti time što su korišteni uzorci kitozana bili različitog kemijskog i fizikalnog sastava. Molekularna masa, stupanj deacetilacije, broj monomernih jedinica i indeks kristaliniteta utječu na viskoznost, sposobnost zadržavanja vode i gustoću naboja polimernog lanca (Kas, 1997; Singla i Chawla, 2001). Utjecaj kitozana na staničnu vijabilnost i proliferaciju ovisi o stupnju deacetilacije - što je stupanj deacetilacije manji, to je citotoksičnost kitozana veća (Chatelet i sur., 2001; Gillitzer i Goebeler, 2001).

Mehanizam antimikrobne aktivnosti se zasniva na konvertiranju amino skupine kitozana u amonijevu sol u razrijeđenoj otopini kiseline. Amonijeva sol tada stupa u interakcije s negativno nabijenom staničnom stijenkam mikroorganizma te narušava njena svojstva i integritet stanice (Chung i sur., 1998). Najveći utjecaj na antimikrobnu aktivnost kitozana ima molekularna masa kitozana. Kada se radi o otopini kitozana niske molekularne mase, kitozan penetrira staničnu stijenku mikroorganizma te se spaja s DNA, inhibira sintezu mRNA te posljedično sintezu proteina. Ukoliko se radi o otopini kitozana visoke molekularne mase, veća je gustoća pozitivnog naboja. U interakciji sa staničnom membranom, kitozan može uzrokovati promjenu permeabilnosti membrane, što za posljedicu može imati istjecanje staničnog sadržaja ili je pak blokiran prolaz esencijalnih tvari u stanicu (No i sur., 2002, Seyfarath i sur., 2008). Osim molekularne mase, antimikrobna aktivnost kitozana ovisi o stupnju polimerizacije i deacetilacije, o pH medija, temperaturi te o vrsti mikroorganizma (Chatelet i sur., 2001; No i sur., 2002; Seyfarath i sur., 2008.;).

Nedostatak primjene kitozana kao antimikrobnog sredstva za tekstilije je to što je teško njime rukovati, a njegova antimikrobna aktivnost uvelike ovisi o temperaturi i pH. Ovisno o temperaturi tijekom skladištenja može doći do promjene nekih specifičnih svojstava (molekularna masa, viskoznost) što utječe na njegovu antimikrobnu aktivnost. Također, pokazuje jači antibakterijski učinak u kiselim uvjetima, jer postaje polikation tek kada je pH otopine niži od pKa (6,3-6,5) (Santos Morais i sur., 2016).

Dobivanje kitozana se provodi postupkom alkalne hidrolize hitina, uslijed koje dolazi do N-deacetilacije i depolimerizacije. Implementacija kitozana na tekstilije se provodi postupkom mercerizacije, što uključuje namakanje tekstilije u koncentriranoj natrijevoj lužini. Kao surfaktant se koristi subitol MLF, natrijev hipofosfit kao katalizator, dok se felosan koristi kao sredstvo za vlaženje. Kao otapalo za kitozan i kao sredstvo za umrežavanje koristi se limunska kiselina, koja još dodatno sama pokazuje antimikrobna svojstva (Draczyński i sur., 2017).



Slika 2 Kitozan (Sahariah i Másson, 2017)

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

Za ispitivanje citotoksičnog učinka korištene su tekstilije načinjene od pamuka koje su prethodno tretirane antimikrobnim agensom u svrhu uporabe u bolnicama i sličnim zdravstvenim ustanovama. Impregnacija uzoraka tekstilija je provedena na Tekstilno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Kitozan se nanosi na uzorak tekstilije u dva koraka na džigeru:

1. Luženje i mercerizacija na 25 °C, uzorak tekstilije prolazi kroz kupku 10 puta

- Kupka sadrži 20 % NaOH i 8 g L⁻¹ Subitol MFL

2. Implementacija kitozana na 25 °C, uzorak tekstilije prolazi kroz kupku 10 puta

- Kupka sadrži 10 g L⁻¹ kitozana u prahu, 1 g L⁻¹ Felosan NOF, 65 g L⁻¹ SHP, 70 g L⁻¹ limunske kiseline

Nakon prvog koraka tekstilije se prvo ispiru vrućom, a zatim hladnom vodom, nakon čega se neutraliziraju octenom kiselinom (0,1 M) do pH vrijednosti 7. Nakon drugog koraka, tekstilije se nekoliko puta ispiru i stavljaju na sušenje. Proces sušenja i termokondenzacije se provode na rasteznom sušioniku marke Benz. Sušenje se odvija 2 min na 100 °C, a termokondenzacija se odvija 4 min na 150 °C.

Nakon provedenog sušenja i termokondenzacije, 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, tekstilije su podvrgnute sljedećim ciklusima održavanja; ispiranje (R), te ciklusima pranja (1, 5 i 10 puta). U tablici 1 se nalazi sastav ECE-fosfatnog deterdženta koji se koristio za pranje uzoraka tekstilija, a u tablici 2 se nalazi prikaz uzoraka tekstilija i način obrade.

Tablica 1. Sastav ECE-fosfatnog deterdženta (preuzeto s deklaracije proizvoda)

| Composition | Mass fraction % |
|---|------------------------|
| Linear sodium alkylbenzenesulfonate (mean length of alkane chain C _{11,5}) | 8,0 ± 0,02 |
| Ethoxylated tallow alcohol (14 EO) | 2,9± 0,02 |
| Sodium soap, chain length C ₁₂ – C ₁₆ : 13 % - 26 % C ₁₈ – C ₂₂ : 74 % - 87 % | 3,5 ± 0,02 |
| Sodium tripolyphosphate | 43,7 ± 0,02 |
| Sodium silicate (SiO ₂ :Na ₂ 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 |
| Total | 100 |

Uvjeti pranja:

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

Tablica 2. Prikaz uzoraka tekstilija i načini obrade

| Uzorak | Obrada |
|----------------------|--|
| CO | Netretirana pamučna tekstilija |
| HIP_CO_20_R | Tekstilija tretirana s 20 % NaOH i obrađena u kupelji s kitozanom, jednom isprana. |
| HIP_CO_20_10W | Tekstilija tretirana s 20 % NaOH i obrađena u kupelji s kitozanom, oprana 10 puta. |

3.1.3. Kemikalije

Korištene su sljedeće kemikalije tijekom rada:

- DMEM-HG, basic, CLS, Eppelheim, Njemačka
- FBS (fetalni goveđi serum), GIBCO, SAD
- 0,25 % tripsin-EDTA, GIBCO, SAD
- *Trypan blue* boja, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- *Muse Annexin V & Dead Cell Kit*, kat. Broj MCH 100105, Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Apsolutni etanol, Kemika, Zagreb
- Destilirana voda (dH₂O)
- DMSO (dimetil sulfoksid), Kemika, Zagreb
- PBS (engl. *Phosphate Buffer Saline*) pufer

3.1.4. Otopine i puferi

Sastav medija DMEM-HG prikazan je u tablici 3.

Tablica 3. Sastav medija DMEM-HG

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

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

| Sastojci | Količina |
|--------------------|----------|
| <i>Trypan blue</i> | 0,08 g |
| PBS pufer | 20 mL |

Nakon što se sastojci pomiješaju otopinu *Trypan blue* je potrebno profiltrirati.

Sastav ishodne otopine *MTT*:

| Sastojci | Količina |
|------------|----------|
| <i>MTT</i> | 25 g |
| PBS pufer | 5 mL |

Nakon što se sastojci pomiješaju otopinu je potrebno sterilno profiltrirati.

Sastav PBS (engl. *Phosphate Buffer Saline*) pufera, čija se pH vrijednost podešava na pH=7,4 dodatkom 5 M HCl:

| Sastojci | Količina |
|----------------------------------|------------|
| NaCl | 8 g |
| KCl | 0,2 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,44 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,24 g |
| dH ₂ O | Do 1000 mL |

3.1.5. Oprema i uređaji

Tijekom rada korištena je sljedeća oprema i uređaji:

- inkubator s kontroliranom atmosferom IR 1500, Automatic CO₂, 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 (engl. *Muse Cell Analyzer*), Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright-Line, Njemačka

- spektrofotometar Helios- γ , Thermo Electron Corporation, Velika Britanija
- analitička vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- precizna vaga, Mettler P1210, Zürich, Švicarska
- centrifuga Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija
- vibracijska mješalica, Tehnica Železniki, Slovenija
- hladnjak za čuvanje stanica na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, New Brunswick Scientific, Velika Britanija

3.2. METODE RADA

3.2.1. Uzgoj monoslojne HaCaT stanične linije

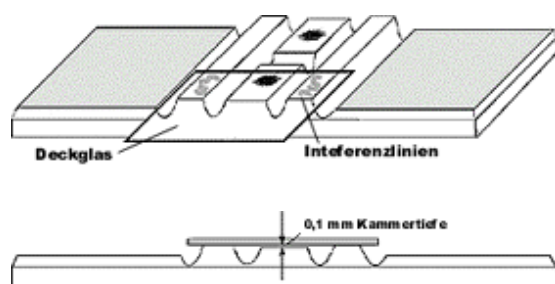
Stanice humanih keratinocita (HaCaT stanična linija) rastu u monosloju pričvršćene na podlogu za rast. Stanice se uzgajaju u T-bocama u strogo kontroliranim uvjetima u inkubatoru na temperaturi od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\text{ }\%$ CO_2 i $95\text{ }\%$ zraka. Tijekom subkultivacije sterilni se uvjeti postižu radom u laminaru. Morfologija i gustoća stanica se provjeravaju pomoću inverznog svjetlosnog mikroskopa. T-boca sa stanicama se prenosi u laminar te se odbacuje stari medij. S obzirom da HaCaT rastu pričvršćene za podlogu, prije same subkultivacije potrebno ih je odvojiti od površine T-boce za što se koristi otopina proteolitičkog enzima tripsina. Najprije se dodaje 1 mL tripsina kako bi se uklonili ostaci seruma koji sadrži inhibitor tripsina.. Potom se dodaje još 1 mL tripsina te se T-boca sa stanicama stavlja 5-10 minuta u inkubator kako bi tripsin odvojio stanice od podloge. Kada se stanice odvoje od podloge, u bocu se dodaje 9 mL medija za uzgoj s $10\text{ }\%$ FBS-a te se stanice resuspendiraju pipetom. 1 mL suspenzije stanica se uzima za brojanje pomoću Fuchs-Rosenthalove komorice, iz dobivenog broja se računa potrebni volumen stanica kako bi se postigla koncentracija od 1×10^5 st mL^{-1} . Izračunati volumen se uzima te se razrjeđuje do volumena od 10 mL .

Kada se ne koriste, HaCaT stanice se čuvaju na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u mediju za zamrzavanje koji se sastoji od $80\text{ }\%$ medija za uzgoj (DMEM-HG), $10\text{ }\%$ FBS-a i $10\text{ }\%$ DMSO-a koji djeluje kao krioperzervans tako da snizuje točku smrzavanja. Stanice se pohranjuju u logaritamskoj fazi rasta, a proces smrzavanja se odvija stupnjevito pri brzini od $1-3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ dok se ne postigne temperatura od $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Za određivanje broja živih stanica u suspenziji se koristi metoda koja se zove *Trypan Blue*. Nakon nanošenja na stanice *Trypan Blue* boja će se vezati na mrtve stanice zbog veće propusnosti stanične membrane. Žive stanice imaju netaknutu staničnu membranu koja ne zadržava boju, stoga one ostaju neobojane, dok mrtve stanice poprime plavu boju. Broj stanica se određuje vizualno, pomoću mikroskopa, gdje se vidi ukoliko je došlo do obojenja (Strober, 2015).

Broj stanica se određuje pomoću Fuchs-Rosenthalove komorice (slika 3) čija je dubina 0,2 mm, a površina 0,0625 mm². 20 µL smjese *Trypan Blue* boje i suspenzije stanica se nanese na komoricu. Fuchs-Rosenthalova komorica je podijeljena u 16 kvadratića, a broje se samo unutrašnja 4 kvadratića. Izračuna se srednja vrijednost izbrojenih stanica te se ukupan broj živih stanica računa prema sljedećoj formuli:

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



Slika 3. Fuchs-Rosenthalova komorica (LO-Laboroptik, 2019)

3.2.2. Priprema tekućih ekstrakata tekstilija

Uzorci tekstilija dimenzija 6 cm x 10 cm (dobiveni s Tekstilno-tehnološkog fakulteta) se stavljaju u Falcon epruvetu s 10 mL medija za uzgoj u koji je dodano 10 % FBS-a. Uzorak nakon toga ide 2 h na tresilicu pri sobnoj temperaturi nakon čega se uzorci premještaju u inkubator na 37 °C dodatnih 22 h. Za sljedeći korak je najprije potrebno izvaditi tekstil iz epruvete, zatim se otopina ekstrakta sterilno filtrira pomoću filtera čija je veličina pora 0,22 µm, a postupak se provodi u laminaru. Filtrat predstavlja ishodnu otopinu za rad, a nakon filtracije se ekstrakt razrjeđuje dodatkom otopine medija za uzgoj s 10 % seruma kako bi se dobila različita razrjeđenja otopine ekstrakta. U tablici 4 su prikazana razrjeđenja ishodnih otopina.

Tablica 4 Razrjeđenja ishodnih otopina

| Oznaka | Opis |
|--------|---|
| I.O. | Ishodna otopina |
| S.M. | Otopina serum-medija za uzgoj HaCaT stanične linije |
| 1x | 1600 μ L I.O. + 1600 μ L S.M |
| 2x | 800 μ L I.O. + 2400 μ L S.M |
| 3x | 400 μ L I.O. + 2800 μ L S.M |
| 4x | 200 μ L I.O. + 3000 μ L S.M |
| 5x | 100 μ L I.O. + 3100 μ L S.M |

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

Pomoću *MTT* metode se određuje sposobnost živih stanica da prevedu topljivu tetrazolijevu sol (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid, *MTT*) u netopljivi formazan. *MTT* prima elektron (reducira se) od oksidiranog supstrata (NADH, NADPH) zbog aktivnosti mitohondrijskih dehidrogenaza. Sol *MTT*-a se iz žute boje prevodi u ljubičaste kristale formazana koji se otapaju u organskom otapalu, nakon čega se intenzitet obojenja mjeri spektrofotometrijski na valnoj duljini od 570 nm i 630 nm (Atterwill, 1995). Kristali se otapaju pomoću DMSO-a (dimetil sulfoksid) te je količina kristala, odnosno intenzitet obojenja, proporcionalna metaboličkoj aktivnosti i broju stanica u uzorku (Siuwerts i sur., 1995). Jedino žive stanice mogu prevesti *MTT* u formazan te su rezultati istraživanja potvrdili kako su potrebne žive stanice s aktivnim mitohondrijima kako bi se dobio signal, tj. kako bi se *MTT* mogao prevesti u kristale formazana (Mosmann, 1983). Formazan ne može proći kroz staničnu membranu te se stoga nakuplja u živim stanicama.

Potrebna su preliminarna ispitivanja kako bi se odredio optimalan broj stanica, trajanje postupka te vrijeme inkubacije *MTT*-a. Mjerenje rasta stanica redukcijom *MTT*-a je u korelaciji sa staničnim proteinima i brojem živih stanica (Atterwill, 1995) stoga se ova metoda koristi za praćenje stanične proliferacije i citotoksičnosti (Mosmann, 1983).

MTT metoda je brza, sveobuhvatna, precizna i visoko reproducibilna metoda. Osjetljiva je i usporediva s ostalim *in vitro* metodama za procjenu citotoksičnosti. MTT se u otopini može čuvati i do nekoliko tjedana na tamnom mjestu pri temperaturi od 4 °C, a da ne dođe do promjene apsorpcijskog spektra. Međutim, nedostaci ove metode su to što ne razlikuje citostatsko i citocidno djelovanje, rezultati se moraju prikazati kao postotak apsorbancije uzorka u odnosu na kontrolu te test pokazuje najmanju efikasnost kada se provodi u mediju u kojem su stanice rasle nekoliko dana. No unatoč nedostacima, MTT metodi se daje prednost nad drugim testovima (Atterwill, 1995).

3.2.3.1. Priprema stanica za određivanje stanične vijabilnosti MTT metodom

Rukovanje stanicama se provodi u aseptičkim uvjetima koji se osiguravaju radom u laminaru. Uzgoj staničnih linija se odvija u T-bocama, dok se za potrebe određivanja stanične vijabilnosti MTT metodom stanice naciepljuju u jažice *multiwell* ploča s 96 jažica. Nanosi se 200 µL suspenzije HaCaT stanica u koncentraciji 1×10^5 st mL⁻¹ po jažici. 24h nakon naciepljivanja, stanice se tretiraju različitim razrjeđenjima ishodne otopine ekstrakta tekstilija na način da se iz jažica izbacij medij za ugoj, a potom dodaje po 200 µL pripremljenog razrjeđenja ekstrakta tekstilija (tablica 4) te se kao kontrola koriste stanice koje su rasle u mediju za uzgoj. Nakon tretmana ekstraktom tekstilija stanice se inkubiraju tijekom 72 h u inkubatoru pri kontroliranoj atmosferi od 5 % CO₂, 95 % zraka i temperaturi od 37 °C.

3.2.3.2. Postupak određivanja vijabilnosti stanica MTT metodom

Nakon 72 h inkubacije HaCaT stanica, u svaku jažicu na *multiwell* ploči dodaje se 20 µL stock otopine MTT-a, nakon čega slijedi inkubacija od 4 h pri temperaturi od 37 °C u sterilnim uvjetima. Nakon inkubacije se iz jažica oprezno uklanja medij, pazeci da se ne uklone i kristali formazana. Kristali formazana se otapaju pomoću DMSO-a, dodajući volumen od 200 µL po jažici. Intenzitet obojenja se mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm u odnosu na slijepu probu (medij za uzgoj i FBS).

3.2.4. Određivanje citotoksičnosti antimikrobnih tvari kojima su impregnirane tekstilije metodom protočne citometrije

Protočna citometrija je metoda koja se zasniva na laserskoj tehnologiji. Princip metode je označavanje stanica različitim fluorescentnim ligandima koji se specifično vežu za stanične dijelove. Otopina koja

sadrži označene stanice prolazi u kapilari kroz laserski snop. Označena stanica apsorbira zračenje te dolazi do fluorescencije koju detektira *software*. Ovisno o količini apsorbiranog zračenja i smjeru rasipa laserskih zraka tijekom prolaska kroz stanicu, protočna citometrija nam omogućava da istovremeno promatramo više različitih parametara staničnog sadržaja (Abcam, 2017). To nam je posebno korisno prilikom proučavanja načina stanične smrti.

Nekroza je oblik stanične smrti te je gotovo uvijek patološki uzrokovana (bakterije, virusi, fungi, paraziti). Postoje dva glavna tipa nekroze- tekuća nekroza, gdje mrtve stanice i tkivo postaju tekuća viskozna masa, te koagulativna nekroza, gdje se održava normalan oblik staničnog sadržaja čak i nekoliko dana nakon odumiranja (Adigun i sur., 2017). Apoptoza se odnosi na proces programirane stanične smrti. Apoptoza nam je vrlo važan regulatorni mehanizam u procesu rasta i proliferacije stanica (Willey, 1993). Stanica reagira na specifične podražaje tako što započinje razne unutarstanične procese koji rezultiraju karakterističnim fiziološkim promjenama. Neke od tih promjena su izbacivanje fosfatidil-serina (PS) na površinu stanice, degradacija specifičnih staničnih proteina, kompaktiranje i fragmentiranje kromatina, te gubitak integriteta stanične membrane u kasnijoj fazi (Millipore Corporation, 2012).

Muse cell analyzer je uređaj koji nam omogućava jednostavnu primjenu metode protočne citometrije te nam služi za kvantitativnu analizu mrtvih i živih stanica, te stanica u ranoj ili kasnoj apoptozi. Također se bazira na detektiranju fluorescencije - *Muse cell analyzer* kit koristi *Annexin V* za označavanje apoptotičnih stanica, dok se za oznaku mrtvih stanica koristi marker koji djeluje kao indikator integriteta i strukture stanične membrane. *Annexin V* je kalcij-ovisan fosfolipid-vezujući protein te se koristi zbog svog visokog afiniteta prema fosfatidil-serinu (PS). S obzirom da se u ranoj fazi apoptoze molekule PS izbacuju na površinu stanice, *Annexin V* se može lako vezati na površinu stanične membrane. (Millipore Corporation, 2012).

Software nam daje kvantitativne informacije u obliku koncentracije (st mL⁻¹) i postotka (%) živih i mrtvih stanica te stanica u ranoj i kasnoj fazi apoptoze.

3.2.4.1. Priprema stanica za metodu protočne citometrije

Kako bi se osigurali sterilni uvjeti rada, rukovanje stanicama se provodi u laminaru. S obzirom da stanice rastu u T-bocama za uzgoj, prvo ih je potrebno odvojiti od podloge pomoću tripsina, a zatim nacijepiti na *multiwell* ploče sa 6 jažica (4 mL stanične suspenzije u koncentraciji od 2 x 10⁴ st mL⁻¹). Nakon nacijepivanja slijedi 24 h inkubacije pri kontroliranoj atmosferi od 5 % CO₂, 95 % zraka i temperaturi od 37 °C. Po isteku 24 h, stanice se tretiraju različitim razrjeđenjima ishodne otopine

ekstrakta tekstilija te slijedi još 48 h inkubacije, nakon kojih su stanice pripremaju za provedbu metode protočne citometrije kojom će se odrediti udio apoptotičnih, nekrotičnih i živih stanica u staničnoj populaciji.

3.2.4.2. Postupak određivanja načina staničnog odumiranja

Nakon 48 h inkubacije, prvi korak je uklanjanje medija te se zatim dodaje 500 μL tripsina da bi se stanice odvojile od podloge za rast. Potrebno je pričekati nekoliko minuta da bi tripsin djelovao te se vraća 500 μL prije uklonjenog seruma za uzgoj kako bismo dobili staničnu suspenziju iz koje uzimamo 100 μL uzorka. Potrebno je pomiješati 100 μL uzorka s 100 μL *MuseTM Annexin V & Dead Cell Kita* (kat. br. MCH100105) nakon čega dobivena otopina ide 20 min na inkubaciju. Inkubacija se provodi u mraku pri sobnoj temperaturi. *MuseTM Cell Analyzer* je uređaj pomoću kojeg možemo subpopulaciju živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica. Na ekranu nam se pokazuje *dot-plot* dijagram koji nam istovremeno prikazuje udio pojedine subpopulacije kao postotak (%) od ukupne populacije (Millipore Corporation, 2012).

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_x

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

N = ukupni broj uzoraka u skupini

x_i = pojedinačne vrijednosti uzoraka

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

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{x_1}^2 + S_{x_2}^2}}$$

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

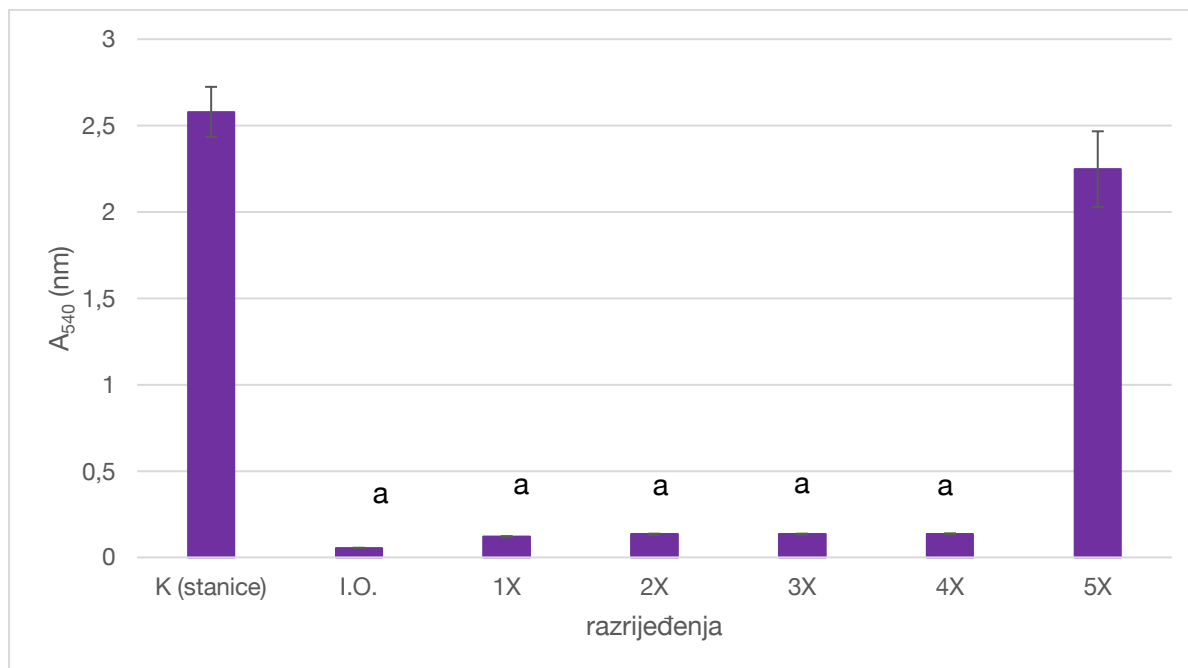
4. REZULTATI I RASPRAVA

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

Antimikrobne tekstilije se mogu koristiti kao pomoć pri zacjeljivanju rana, pomoć u kontroli bakterijskih infekcija te smanjenju neugodnih mirisa u sportu i vojsci. Učinak antimikrobnih tekstilija ovisi o vrsti antimikrobnog agensa, njegovoj koncentraciji te načinu aplikacije na tekstil. Najčešće korišteni spojevi su srebro, kvarterni amonijevi spojevi, cink piriton i triklosan. Upotreba triklosana je sve manja zbog utjecaja na okoliš i ljudsko zdravlje. Antimikrobni agensi djeluju štetno na bakterijske stanice, a s obzirom da je koža prva u direktnom kontaktu s antimikrobno obrađenim tekstilijama, potrebno je potvrditi da neće doći do oštećenja i iritacija kože. Postoji nekoliko validiranih metoda za određivanje biološke sigurnosti tekstilija: *in vitro* test citotoksičnosti (DIN EN ISO 10993-5), test kožnih iritacija (DIN EN ISO 10993-10), ali prije toga je potrebno napraviti procjenu rizika, odrediti potencijalnu genotoksičnost, kancerogenost i reproduktivnu toksičnost (Hilgenberg i sur., 2016).

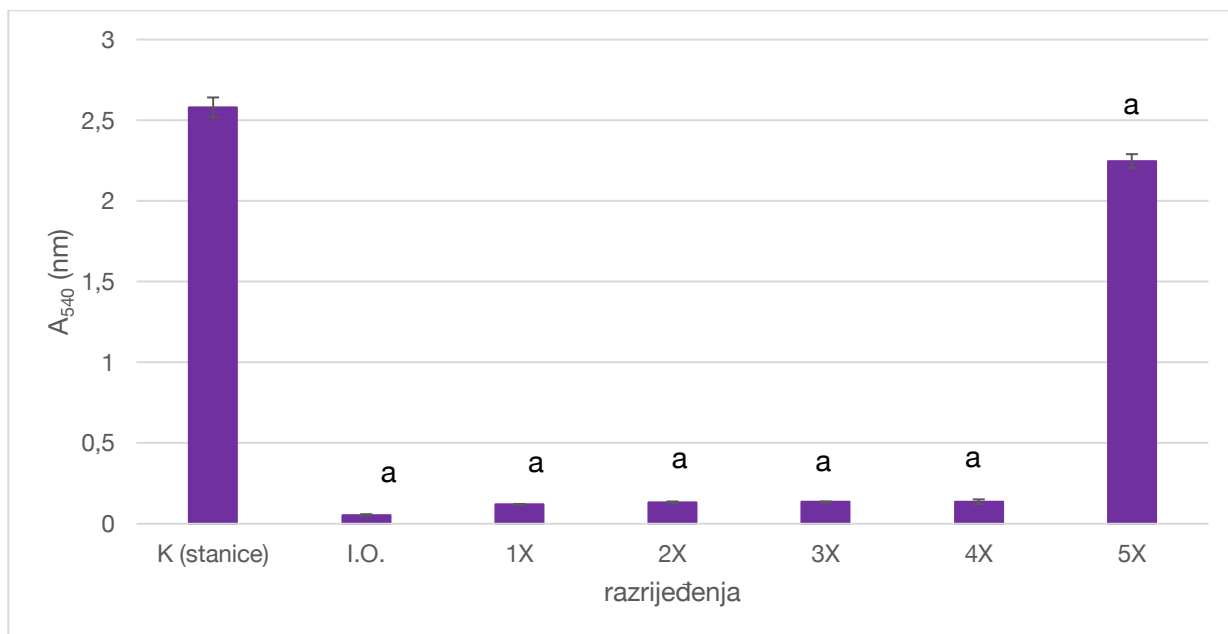
Citotoksični učinak različitih razrjeđenja (1x - 5x) ishodne otopine CO (netretirana pamučna tekstilija), HIP_CO_20_R (pamučna tekstilija - luženje s 20 %-tnom otopinom NaOH, jednom isprana, obrađena s: 10 g L⁻¹ kitozana, 70 g L⁻¹ limunske kiseline, 65 g L⁻¹ natrijev hipofosfit pentahidrata, 1 g L⁻¹ felosan NOP) i HIP_CO_20_10W (pamučna tekstilija - luženje s 20 %-tnom otopinom NaOH, oprana 10 puta, obrađena s: 10 g L⁻¹ kitozana, 70 g L⁻¹ limunske kiseline, 65 g L⁻¹ natrijev hipofosfit pentahidrata, 1 g L⁻¹ felosan NOP) na proliferaciju i vijabilnost HaCaT stanica je određen *MTT* metodom 72 h nakon tretmana stanica.

Učinak različitih razrjeđenja (1x - 5x) ishodne otopine (I.O.) (pripremljena namakanjem 60 cm² netretirane pamučne tekstilije u 10 mL medija za uzgoj) na proliferaciju i vijabilnost HaCaT stanica određena *MTT* metodom 72 h nakon tretmana stanica prikazan je na slici 4. Primjećeno je statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje vijabilnosti stanica kod uzoraka tretiranih nerazrjeđenom ishodnom otopinom (I.O.) netretirane pamučne tekstilije te razrjeđenjima od 1x - 4x u odnosu na kontrolni uzorak (netretirane stanice). Kod uzorka tretiranog otopinom razrjeđenom 5x primjećeno je povećanje vijabilnosti stanica u odnosu na vijabilnost stanica tretiranih manjim razrjeđenjima ishodne otopine, te je vijabilnost iznosila 87,15 % u odnosu na kontrolni uzorak.



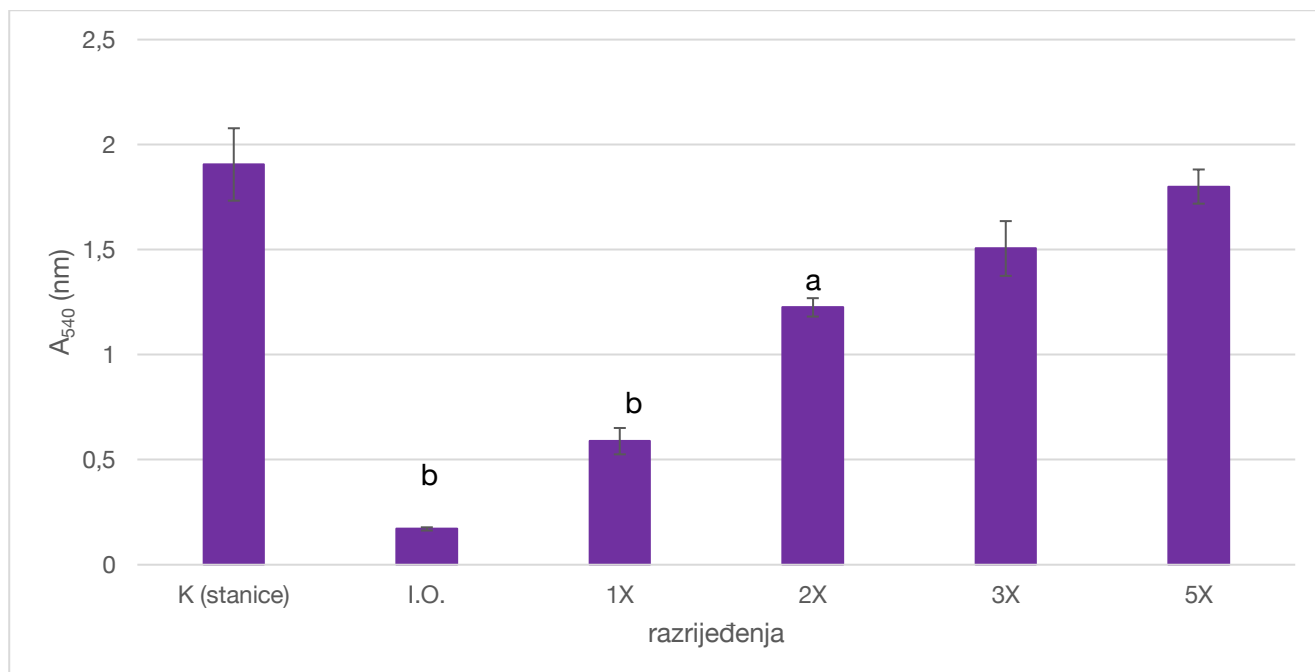
Slika 4. Vijabilnost HaCaT stanica 72 h nakon tretmana različitim razrjeđenjima ishodne otopine (I.O.) (pripremljena namakanjem 60 cm² netretirane pamučne tekstilije u 10 mL medija za uzgoj) u odnosu na kontrolni uzorak (K(stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$

Iz rezultata na slici 5 koja prikazuje vijabilnost HaCaT stanica određena *MTT* metodom 72 h nakon tretmana različitim razrjeđenjima ishodne otopine (I.O.) tretirane i jednom isprane pamučne HIP_CO_20_R tekstilije vidljivo je da je proliferacija i vijabilnost tretiranih stanica niža u odnosu na kontrolni uzorak. Kod svih uzoraka/razrjeđenja uočeno je statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu. Kod najvećeg razrjeđenja ishodne otopine (5x) je primjećen porast stanične vijabilnosti u odnosu na manja razrjeđenja.



Slika 5. Vijabilnost HaCaT stanica 72 h nakon tretmana različitim razrjeđenjima ishodne otopine (I.O.) tretirane i jednom isprane HIP_CO_20_R tekstilije u odnosu na kontrolni uzorak (K(stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$

Učinak na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica određen *MTT* metodom 72 h nakon tretmana različitim razrjeđenjima ishodne otopine (I.O.) tretirane i deset puta oprane HIP_CO_20_10W pamučne tekstilije je prikazan na slici 6. Statistički značajno smanjenje vijabilnosti uočeno je za ishodnu otopinu (I.O.) ($p < 0,001$) i za razrjeđenje 1x ($p < 0,001$) i 2x ($p < 0,01$). Kod uzorka tretiranog otopinama razrjeđenim 3x i 5x primjećeno je povećanje vijabilnosti stanica u odnosu na vijabilnost stanica tretiranih manjim razrjeđenjima ishodne otopine, te je vijabilnost iznosila 79,01 % u odnosu na kontrolni uzorak za otopinu razrjeđenu 3x i 94,48 % u odnosu na kontrolni uzorak za otopinu razrjeđenu 5x.



Slika 6. Vijabilnost HaCaT stanica 72 h nakon tretmana različitim razrijeđenjima ishodne otopine (I.O.) tretirane, 10 puta oprane, HIP_CO_20_10W tekstilije u odnosu na kontrolni uzorak (K(stanice)) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,01$, ^b $p < 0,001$

Nedostaje literaturnih izvora koji se bave istraživanjima sličnim ovome. Ipak, postoje brojna istraživanja koja koriste HaCaT staničnu liniju kao testni sustav, proučavajući vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanične linije pod utjecajem raznih ksenobiotika. *MTT* metoda se pokazala pogodnom za ovakav tip istraživanja zbog jednostavnosti i brzine te se rezultati mogu uspoređivati s drugim istraživanjima. Njome su se koristili Nzengue i suradnici (2008) prilikom proučavanja oksidacijskog stresa i oštećenja DNA uzrokovanog kadmijem na HaCaT staničnoj liniji. Poznato je da kadmij osim rijeka i jezera zagađuje atmosferu, a prvi organ koji dolazi u doticaj s toksikantima iz okoliša je koža, a osim toga UV zračenje može povećati toksičnost kadmija u stanicama kože (Jourdan i sur., 2002). Mehanizam toksičnog djelovanja kadmija ovisi o tipu stanica, ali većinom, kadmij djeluje indirektno (npr. smanjena vijabilnost stanica radi smanjenja antioksidacijskog kapaciteta zbog vezanja kadmija na tiolne skupine (glutacion i proteini)). Pomoću rezultata dobivenih *MTT* metodom uspjeli su dobiti nužne vrijednosti za nastavak studije: LD₁₀ (15 μM), LD₁₅ (50 μM) i LD₃₀ (100 μM) nakon 24 h inkubacije te LD₅₀ (100 μM) nakon 48 h inkubacije, koje nam daju podatke o koncentraciji ksenobiotika koja uzrokuje smrt 10 %, 15 %, 30 % i 50 % stanica.

Surfaktanti ili površinski aktivne tvari se nalaze u brojnim kremama, losionima, kozmetičkim proizvodima, šamponima, gelovima za tuširanje, itd. Kako smo njima svakodnevno okruženi, a koža je prvi sustav koji se s njima susreće, mora se osigurati da ne uzrokuju iritacije i oštećenja kože i očiju. Sanchez i suradnici (2005) su ispitivali potencijalnu toksičnost i negativni učinak derivata lizina na vijabilnost HaCaT stanične linije, a kako bi provjerili staničnu vijabilnost koristili su *MTT* i *Neutral Red in vitro* metode. Obje metode su pokazale slične IC_{50} vrijednosti za sve derivate lizina te za 3 komercijalna surfaktanta koji su se koristili kao kontrola. IC_{50} vrijednosti su pokazale manju toksičnost derivata lizina u usporedbi s 3 komercijalna surfaktanta.

Uspoređujući dobivene rezultate za različite uzorke ispitanih pamučnih tekstilija, primjećujemo da vijabilnost stanica tretiranih različitim razrjeđenjima ishodne otopine dobivene iz netretirane pamučne tekstilije (CO) i vijabilnost stanica tretiranih različitim razrjeđenjima ishodne otopine kitozanom obrađene tekstilije koja je jednom isprana (HIP_CO_20_R) prate sličan trend. Statistički značajno smanjena vijabilnost stanica primjećena je kod uzoraka tretiranih s I.O, 1x - 4x razrjeđenja ishodne otopine za obje ispitane tekstilije, dok je kod razrjeđenja od 5x došlo do povećanja vijabilnosti u odnosu na I.O. i manja razrjeđenja, ali i dalje je vijabilnost stanica niža od kontrole (netretiranih stanica). Međutim, rezultati za uzorak tekstilije HIP_CO_20_10W (tekstilija obrađena kitozanom i oprana 10 puta) se nešto više razlikuju. Prilikom ispitivanja vijabilnosti stanica tretiranih nerazrjeđenom I.O. te razrjeđenjima 1x i 2x uzorka tekstilije HIP_CO_20_10W, primjećeno je statistički značajno smanjenje stanične vijabilnosti u odnosu na kontrolu, dok je pri većim razrjeđenjima smanjenje vijabilnosti također manje u odnosu na kontrolu, ali ipak smanjenje nije statistički značajno. Mogući uzrok tome je smanjenje citotoksičnog učinka kitozana koji se pranjem (10 puta) ispire iz tekstilije, odnosno pranje može utjecati na smanjenje impregnacije tekstilije kitozanom..

4.2. UČINAK EKSTRAKATA IZOLIRANIH IZ TEKSTILIJA KOJE SU TRETIRANE ANTIMIKROBNIM AGENSOM NA VIJABILNOST HaCaT STANIČNE LINIJE ODREĐEN METODOM PROTOČNE CITOMETRIJE

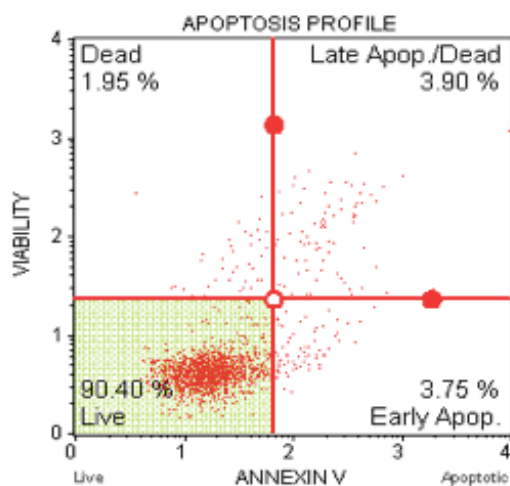
Znanstvenici razlikuju dva glavna načina staničnog odumiranja – apoptozu i nekrozu. Nekroza je oblik stanične smrti koji je gotovo uvijek patološki uzrokovan (virusi, bakterije, fungi, paraziti) te završava istjecanjem staničnog sadržaja. Apoptoza se odnosi na proces programirane stanične smrti te predstavlja vrlo važan regulatorni mehanizam u procesu rasta i proliferacije stanica (Willey, 1993). Prilikom apoptoze dolazi do degradacije staničnih proteina, kompaktiranja i fragmentiranja

kromatina, prebacivanja fosfatidil-serina (PS) na površinu stanice u ranoj fazi apoptoze, dok u kasnijoj fazi dolazi do gubitka integriteta stanične membrane.

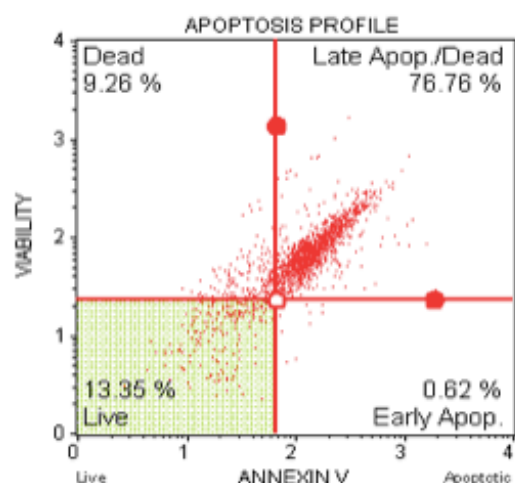
Muse cell analyzer je uređaj koji nam omogućava jednostavnu primjenu metode protočne citometrije te nam služi za kvantitativnu analizu mrtvih i živih stanica, te stanica u ranoj ili kasnoj apoptozi. Za označavanje apoptotičnih stanica se koristi *Annexin V*, kalcij-ovisan fosfolipid-vezujući protein, zbog svog visokog afiniteta prema fosfatidil-serinu (PS) (Millipore Corporation, 2012).

Na slici 7 su prikazani rezultati dobiveni metodom protočne citometrije pomoću *Muse™ Cell Analyzer*-a u obliku *dot-plot* dijagrama. Rezultati su dobiveni 48 h nakon tretmana HaCaT stanica s različitim razrjeđenjima dobivenih ekstrakcijom netretirane pamučne tekstilije (CO). Na dijagramu možemo razlučiti subpopulaciju živih (donji lijevi kvadrant), rano apoptotičnih (donji desni kvadrant), kasno apoptotičnih (gornji desni kvadrant) i mrtvih stanica (gornji lijevi kvadrant). Na slici 7.a su prikazani rezultati metode protočne citometrije za kontrolni uzorak (netretirane stanice, rasle u mediju za uzgoj u kontroliranim uvjetima). Slika 7.b je reprezentativni *dot-plot* dijagram stanica tretiranih nerazrjeđenom ishodnom otopinom (I.O.) dobivenom iz netretirane pamučne tekstilije. Slika 7.c daje prikaz rezultata dobivenih nakon tretmana HaCaT stanica s razrjeđenjem ishodne otopine 1x (1600 μ L I.O. + 1600 μ L medija za uzgoj), a slika 7.d razrjeđenjem ishodne otopine 5x (100 μ L I.O. + 3100 μ L medija za uzgoj).

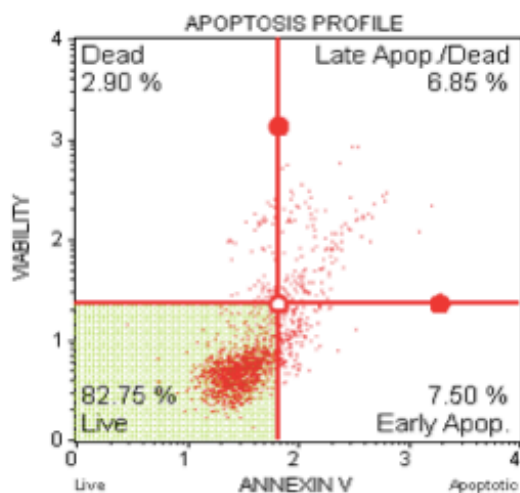
Iz reprezentativnih *dot-plot* dijagrama vidljivo je da je subpopulacija živih stanica najmanja, a mrtvih (nekrotičnih) stanica i ukupnih apoptotičnih stanica najveća prilikom tretmana HaCaT stanica nerazrjeđenom ishodnom otopinom dobivenom ekstrakcijom iz netretirane pamučne tekstilije (slika 7). To potvrđuju i rezultati srednjih vrijednosti dvaju provedenih mjerenja prikazani u tablici 5 (12,1 % živih, 8,16 % mrtvih i 79,75 % ukupnih apoptotičnih stanica nakon tretmana HaCaT stanica I.O. dobivenom ekstrakcijom iz netretirane pamučne tekstilije). Udio živih stanica 48 h nakon tretmana stanica razrjeđenjem 5x iznosi 92,92 %, što je otprilike jednako udjelu živih stanica u kontrolnom uzorku-netretiranim stanicama (91,15 %). Udio živih stanica u uzorcima tretiranim s ishodnom otopinom dobivenom ekstrakcijom netretirane pamučne tekstilije i razrjeđenjem 1x iznose 12,1 % odnosno 83,55 (Tablica 5). Također, najveći udio ukupnih apoptotičnih stanica (79,745 %), kao i udio mrtvih stanica (8,155 %) zabilježen je prilikom tretmana HaCaT stanica ishodnom otopinom dobivenom ekstrakcijom netretirane pamučne tekstilije, dok se njihov udio smanjuje tretmanom stanica s 1x razrjeđenom ishodnom otopinom, odnosno još više 5x razrjeđenom (Slika 7, Tablica 5).



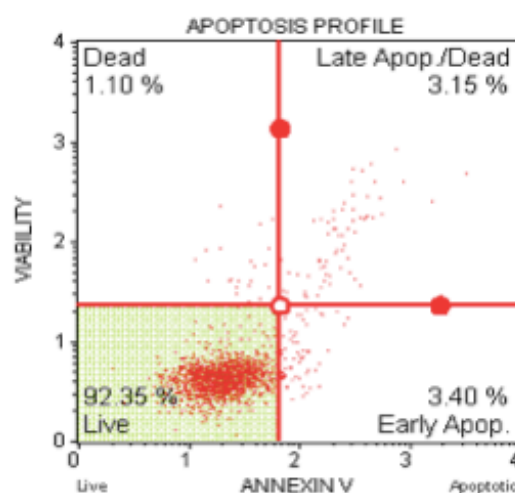
a) Intaktna kontrola



b) Ishodna otopina



c) Razrjeđenje 1x



d) Razrjeđenje 5x

Slika 7. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami dobiveni metodom protočne citometrije pomoću *Muse™ Cell Analyzer-a* i *Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a*, 48 h nakon tretiranja HaCaT stanica različitim razrjeđenjima dobivenima ekstrakcijom iz netretirane pamučne tekstilije (CO).

Tablica 5. Postotak živih, mrtvih te ukupnih apoptotičnih stanica 48 sati nakon tretmana HaCaT stanica različitim razrjeđenjima ishodne otopine netretirane pamučne tekstilije izražen kao srednja vrijednost dvaju mjerenja. K (kontrola, netretirane stanice), I.O. (ishodna otopina), 1x (1600 μ L I.O. + 1600 μ L medija za uzgoj), 5x (100 μ L I.O. + 3100 μ L medija za ugoj).

| % | K | I.O. | 1x | 5x |
|----------------------------|-------|--------|--------|--------|
| Žive stanice | 91,15 | 12,1 | 83,55 | 92,925 |
| Ukupne apoptotične stanice | 7,175 | 79,745 | 14,325 | 6,225 |
| Mrtve stanice | 1,675 | 8,155 | 2,125 | 0,85 |

Istraživanja koja se bave ovom tematikom je relativno malo, iako metoda protočne citometrije nije novost. D'Antò i suradnici (2012) koristili su tu metodu kako bi odredili utjecaj NiCl₂ na staničnu smrt i vijabilnost HaCaT stanične linije. Učinak se pratio nakon 24 h, 48 h i 72 h od tretmana stanica NiCl₂ te se za označavanje apoptotičnih stanica koristio *Annexin V*⁺. Kao što je bilo očekivano, citotoksičnost NiCl₂ je ovisna o vremenu izloženosti te o koncentraciji. Nakon 24 h od tretmana udio živih stanica se smanjuje s 85 % na 60 % već pri koncentraciji NiCl₂ od 1 mM, pri koncentraciji od 2mM udio živih stanica je oko 55 %, dok je pri koncentraciji od 5 mM oko 20 %. 48 h nakon tretmana udio živih stanica se smanjuje sa 78 % na 40 % pri koncentraciji NiCl₂ od 1 mM, pri koncentraciji od 2mM udio živih stanica je oko 30 %, dok pri koncentraciji od 5 mM gotovo uopće nema živih stanica. 72 h nakon tretmana s NiCl₂ pri koncentraciji od 1 mM udio živih stanica je oko 10 %, pri koncentraciji od 2 mM udio živih stanica je oko 5 %, dok pri koncentraciji od 5 mM nema više živih stanica.

Wiegand i suradnici (2010) su ispitivali *in vitro* učinak kitozana različite molekularne mase, ali sličnog stupnja deacetilacije, na vijabilnost i proliferaciju humanih keratinocita (HaCaT). Koristili su metodu koja se bazira na detekciji svjetla koje se emitira prilikom reakcije ATP-a s luciferazom i *D*-luciferinom (količina svjetla je proporcionalna koncentraciji ATP-a). Ispitivali su oligosaharid kitozana (mase 5 kDa i koncentracije 0,5 % i 1 %) i kitozan 1130 (mase 120 kDa i koncentracije 0,5 % i 1 %) te *N*-acetil-*D*-glukozamin kao kontrolu. *N*-acetil-*D*-glukozamin nije pokazao negativan učinak na staničnu vijabilnost, dok su uzorci kitozana pokazali negativni učinak na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica. Utjecaj kitozana na HaCaT stanice ovisi o vremenu inkubacije, koncentraciji i molekularnoj masi. Kitozan 1130 je doveo do znatnog smanjenja vijabilnih stanica već 2 h nakon inkubacije u obje ispitane koncentracije, dok je oligosaharid kitozana uzrokovao znatno veću inhibiciju proliferacije 24 h (40 %) i 48 h (50 %) nakon inkubacije kod koncentracije 1 %, dok

otopina s 0,5 % kitozana skoro nije imala nikakav učinak na stanice. Oba uzorka kitozana su inducirala HaCaT stanice na lučenje IL-6 i IL-8. Kao odgovor na citotoksične tvari, stanice često luče inflamatorne citokine, kao što su IL-6 i IL-8, pomoću kojih komuniciraju s ostalim stanicama. Također, djelovali su pozitivno na aktivaciju efektornih kaspaza 3 i 7 (kaspaze su skupina specijaliziranih proteaza koje imaju ključnu ulogu u apoptozi).

5. ZAKLJUČCI

1. Za određivanje toksičnosti kationiziranih i antimikrobno obrađenih tekstilija metodama *MTT* i protočnom citometrijom HaCaT stanična linija se pokazala kao dobar alternativni test sustav.
2. Statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje proliferacije i vijabilnosti HaCaT stanica u odnosu na kontrolu (netretirane stanice) za ishodnu otopinu i razrjeđenja (1x - 4x) ishodne otopine dobivene ekstrakcijom netretirane pamučne tekstilije (CO) utvrđeno je *MTT* metodom 72 h nakon tretmana HaCaT stanica.
3. Statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje proliferacije i vijabilnosti HaCaT stanica u odnosu na kontrolu (netretirane stanice) za ishodnu otopinu i za sva ispitana razrjeđenja (1x - 5x) ishodne otopine dobivene ekstrakcijom obrađene, jednom isprane pamučne tekstilije (HIP_CO_20_R) utvrđeno je *MTT* metodom 72 h nakon tretmana HaCaT stanica.
4. Statistički značajno smanjenje proliferacije i vijabilnosti HaCaT stanica u odnosu na kontrolu (netretirane stanice) za ishodnu otopinu ($p < 0,001$) i za razrjeđenja 1x ($p < 0,001$) i 2x ($p < 0,01$). ishodne otopine dobivene ekstrakcijom obrađene, 10 puta oprane pamučne tekstilije (HIP_CO_20_10W) utvrđeno je *MTT* metodom 72 h nakon tretmana HaCaT stanica.
5. Metodom protočne citometrije utvrđeno je da 48 h nakon tretmana HaCaT stanica različitim razrjeđenjima ishodne otopine dobivene ekstrakcijom netretirane pamučne tekstilije (CO) subpopulacija živih stanica je najmanja, a udio mrtvih (nekrotičnih) stanica i ukupnih apoptotičnih stanica najveći prilikom tretmana nerazrjeđenom ishodnom otopinom u odnosu na kontrolni uzorak (netretirane stanice).

6. LITERATURA

- Abcam (2017) Introduction to flow cytometry, <<https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry#Antibody%20staining>>. Pristupljeno 26. srpnja 2019.
- Adams, R.L.P. (1990) Cell culture for biochemists, U: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 2. izd. (Burdon, R.H., van Knippenberg, P.H., ured.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, str. 35-55.
- Adigun, R., Basit, H., Murray, J. (2017) Necrosis, cell (liquefactive, coagulative, caseous, fat, fibrinoid, and gangrenous). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430935/>>. Pristupljeno 5. prosinca 2019.
- Albelda, S.M., Buck, C.A. (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J.* **4**), 2868-2880.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) Molecular Biology of the Cell, 4. izd., Garland Science, New York.
- Ali-Osman, F. I Maurer, H.R. (1983) Stimulation of clonal tumor cell growth *in vitro* by inhibiting the serum polyamine oxidase activity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **106**, 17-20.
- Arango, M.T., Quintero-Ronderos, P., Castiblanco, J., Montoya-Ortiz, G. (2013) Cell culture and cell analysis. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459464/>>. Pristupljeno 17. prosinca 2019.
- Atterwill, C.K. (1995) Alternative method of assessing toxicity. U: *In Vitro Toxicity Testing Protocols* (O'Hare, S., Atterwill, C.K., ured.), Humana Press, Totowa, New Jersey, str. 1-9.
- Baker, M. E. (2002) Albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates. *J. Endocrinol.* **175**, 121-127.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**, 762-771.
- Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W., Gstraunthaler, G. (2010) The serum-free media interactive online database. *ALTEX-Altern. Anim. Ex.* **27**, 53-62.
- Butler, M. (2004) Animal Cell Culture and Technology, 2. izd., Garland Science/Bios Scientific Publishers, New York.
- Cartwright, T. (1994) Animal Cells as Bioreactors, Cambridge University Press, New York.
- Chatelet, C., Damour, O., Domard, A. (2001) Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* **22**, 261-268.

- Chung, L.Y., Schmidt, R.J., Hamlyn, P.F., Sager, A.M., Andrews, A.M., Turner, T.D. (1994) Biocompatibility of potential wound management products: fungal mycelia as a source of chiti/chitosan and their effect on the proliferation on human F1000 fibroblasts in culture. *J. Biomed. Mater Res.* **28**, 462-469.
- Chung, Y.S., Lee, K.K., Kim, J.W. (1998) Durable press and antimicrobial finishing of cotton fabrics with a citric acid and chitosan treatment. *Text. Res. J.* **68**, 772-775.
- CLS (2019) HaCaT. CLS - Cell Lines Service, <
< <https://clsgmbh.de/artikeldet.php?sprachnr=2&sid=0kh5sjs23n31cbvp4t3b4m6sp1&proid=800>>.Pristupljeno 24. travnja 2019.
- Cooper, G.M. (2000) The Cell - a Molecular Approach, 2. izd., ASM Press, Washington.
- D'Antò, V., Valletta, R., Amato, M., Schweickl, H., Simeone, M., Paduano, S., Spagnuolo, G. (2012) Effect of nickel chloride on cell proliferation. *Open Dent. J.* **6**, 177-181.
- Diegelmann, R.F., Dunn, J.D., Lindbald, W.J., Cohen, I.K. (1996) Analysis of the effects of chitosan on inflammation, angiogenesis, fibroplasia, and collagen deposition in polyvinyl alcohol sponge implants in rat wounds. *Wound Rep. Reg.* **4**, 48-52.
- Draczyński, Z., Flinčec Grgac, S., Dekanić, T., Tarbuk, A., Boguń, M. (2017) Implementation of chitosan into cotton fabric. *Tekstilec.* **60**, 296-301.
- 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.
- Fotakis, G., Timbrell, J.A. (2006) *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* **160**, 171-177.
- Freshney, R.I. (2002) Cell line provenance. *Cytotechnology* **39**, 55-67.
- Freshney, R.I. (2005) Culture of Animal Cells – a Manual of Basic Technique, 5. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Gao, Y., Cranston, R. (2008) Recent advances in antimicrobial treatments of textiles. *Text. Res. J.* **78**, 60-72.
- Ghai, I., Ghai, S. (2018) Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infect. Drug Resist.* **11**, 523-530.
- Gillitzer, R., Goebeler, M. (2001) Chemokines in cutaneous wound healing. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 513-521.
- Griffiths, B. (1990) Perfusion system for cell culture. U: Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology (Lubiniecki, A. S., ured.), Marcel Dekker Inc, New York, str. 169-188.

- 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.
- Guilbert, L.J., Iscove, N.N. (1976) Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. *Nature* **263**, 594-595.
- Gupta, D., Bhaumik, S. (2007) Antimicrobial treatments for textiles. *Indian J. Fibre Text.* **32**, 254-263.
- Hilgenberg, B., Prange, A., Vossebein, L. (2016) Testing and regulation of antimicrobial textiles. U: *Antimicrobial Textile*, Elsevier Ltd., Amsterdam, str. 7-18.
- Howling, G.I., Dettmar, P.W., Goddard, P.A., Hampson, F.C., Dornish, M., Wood, E.J. (2001) The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes *in vitro*. *Biomaterials* **22**, 2959-2966.
- 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.
- ISO 10993-5:2009, Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity.
- Jones, R.D., Jampani, H.B., Newman, J.L., Lees, A.S. (2000) Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am. J. Infect. Contr.* **28**, 184-196.
- Jourdan, E., Emonet-Piccardi, N., Didier, C., Beani, J.C., Favier, A., Richard, M.J. (2002) Effects of cadmium and zinc on solar-simulated light-irradiated cells: potential role of zinc-metallothionein in zinc-induced genoprotection. *Arch. Biochem. Biophys.* **405**, 170-177.
- Kas, H.S. (1997) Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate systems. *J. Microencap.* **14**, 689-711.
- Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **56**, 195-204.
- Levy, C.W., Roujeinikova, A., Sedelnikova, S., Baker, P.J., Stuitj, A.R., Slabas, A.R., Rice, D.W., Rafferty, J.B. (1999) Molecular basis of triclosan activity. *Nature* **398**, 383-384.
- LO - Laboroptik GmbH (2019) Manufacturing laboratory equipment, <<http://www.lolaboroptik.de/englisch/info/info.html>> Pristupljeno 24. travnja 2019.
- Maurer, H.R. (1981) Potential pitfalls of [³H]thymidine techniques to measure cell proliferation. *Cell Tissue Kinet.* **14**, 111-120.
- McDonnell, G., Russell, A.D. (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 147-179.

- Millipore Corporation (2012) Muse™ Cell Analyzer User's Guide, <<http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/instruments/muse/Muse%20Cell%20Analyzer%20-%200500-3115.pdf>>. Pristupljeno 23. prosinca 2019.
- Mitra, A., Mishra, L., Li, S. (2013) Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends Biotechnol.* **31**, 347-354.
- Mori, T., Okumura, M., Matsuura, M., Ueno, K., Tokura, S., Okamoto, Y., Miniami, S., Fujinaga, T. (1997) Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials* **18**, 947-951.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., Meyers, S.P. (2002) Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol.* **74**, 65-72.
- Nzengue, Y., Steiman, R., Garrel, C., Lefèbvre, E., Guiraud, P. (2008) Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: Role of glutathione in the resistance to cadmium. *Toxicology* **243**, 193-206.
- Okamoto, Y., Watanabe, M., Miyatake, K., Morimoto, M., Shigemasa, Y., Miniami, S. (2002) Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on migrations of fibroblasts and vascular endothelium. *Biomaterials* **23**, 1975-1979.
- Purwar, R., Joshi, M. (2004) Recent developments in antimicrobial finishing of textiles - a review. *AATCC Review* **4**, 22-26.
- Rao, S.B., Sharma, S.P. (1997) Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J. Biomed. Mater. Res.* **34**, 21-28.
- Sahariah, P., Másson, M., (2017) Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure-activity relationship, *Biomacromolecules*, **18**, 3846-3868.
- Sanchez, L., Mitjans, M., Infante, M.R., Vinardell, M.P. (2005) Potential irritation of lysine derivative surfactants by hemolysis and HaCaT cell viability. *Toxicol. Lett.* **161**, 53-60.
- Santos Morais, D., Guedes, R.M., Ascensão Lopes, M. (2016) Antimicrobial Approaches for Textiles: From Research to Market. *Materials* **9**, 498-519.
- Seyfarth, F., Schliemann, S., Elsner, P., Hipler, U.-C. (2008) Antifungal effect of high- and low- molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida Krusei* and *Candida glabrata*. *Int. J. Pharmaceut.* **353**, 139-148.
- Siuwerts, A.M., Klijin, 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 characteristic, IC₅₀ values and cell survival. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **33**, 813-823.
- Singla, A.K., Chawla, M. (2001) Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an up-date. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**, 1047-1067.
 - Strober, W. (2015) Trypan Blue exclusion test of cells viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **111**, A3.B.1-A3.B.3.
 - Tsukada, M., Kato, H., Wilson, D., Shin, B.S., Arai, T., Murakami, R., Freddi, G. (2002) Production of antimicrobially active silk proteins by use of metal-containing dyestuffs. *J. Appl. Polymer Sci.* **86**, 1181-1188.
 - Yao, T., Asayama, Y. (2017) Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod. Med. Biol.* **16**, 99-117.
 - Van der Velden-de Groot, C.A.M. (1995) Microcarrier technology, present status and perspective. *Cytotechnology* **18**, 51-56.
 - Wiegand, C., Winter, D., Hipler, U.-C. (2010) Molecular-weight-dependent toxic effects of chitosan on the human keratinocyte cell line HaCaT. *Skin Pharmacol. Physiol.* **23**, 164-170.
 - Willey, A.H. (1993) Apoptosis. *Br. J. Cancer* **67**, 205-208.
 - Williams, J.F., Halosource, V., Cho, U. (2005) Antimicrobial functions for synthetic fibers: recent developments. *Aatcc Review* **5**, 17-21.
 - Wolf, J.B. (2010) Tissue Culture Methods. University of Maryland, Baltimore. <<https://userpages.umbc.edu/~jwolf/method5.htm>>. Pristupljeno 13. srpnja 2019.
 - Worley, S.D., Williams, D.E. (1988) Halamine Water Disinfectants. *CRC Crit. Rev. Environ. Contr.* **18**, 133-175.

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.

Ivana Holetić