

# Modeli za ispitivanje dermalne toksičnosti

---

**Račić, Nikolina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:618830>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-08**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Nikolina Račić**  
0058216849

**MODELI ZA ISPITIVANJE DERMALNE  
TOKSIČNOSTI**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Osnove toksikologije

**Mentor:** dr. sc. Marina Miletić

**Zagreb, 2022.**



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

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za toksikologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

## Modeli za ispitivanje dermalne toksičnosti

Nikolina Račić, 0058216849

**Sažetak:** Bolničke infekcije značajan su zdravstveni problem koji povećava morbiditet i mortalitet bolesnika te se u što većoj mjeri nastoji reducirati prisutnost patogenih mikroorganizama u bolničkom okruženju. Sprječavanje rasta bakterija i gljivica pogotovo na tekstilu namijenjenom za bolnice postao je jedan od novih izazova za čovjeka. Tekstil dolazi u izravni kontakt s kožom pa je važno ispitati potencijalni toksični utjecaj antimikrobno obrađenog tekstila na kožu. Korištena je HaCaT stanična linija humanih keratinocita te je primijenjena *MTT* metoda 72 sata nakon tretmana. Rezultati su pokazali kako sva ispitana razrijeđenja kao i ishodna otopina dobivena ekstrakcijom antimikrobno obrađene pamuk/poliester tkanine smanjuju proliferaciju i vijabilnost HaCaT stanica. Također, primijećeno je kako tekstil koji je više puta opran uzrokuje manje smanjenje vijabilnosti i proliferacije stanica, vjerojatno zbog ispiranja antimikrobnog agensa kojim je tekstilija tretirana.

**Ključne riječi:** antimikrobno obrađene tekstilije, HaCaT stanice, *MTT* metoda, dermalna apsorpcija

**Rad sadrži:** 33 stranice, 13 slika, 2 tablice, 35 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** dr. sc. Marina Miletić

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

**Datum obrane:** 16. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Toxicology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Nutrition

**Models for skin toxicity testing**

**Nikolina Račić, 0058216849**

**Abstract:** Hospital infections are a significant health problem that increases patient's morbidity and mortality, and efforts are being made to reduce the presence of pathogenic microorganisms in the hospital environment as much as possible. Preventing the growth of bacteria and fungi, especially on textiles intended for hospitals, has become one of the new challenges. Textile comes into direct contact with the skin, so it is important to examine the potential cytotoxic impact of antimicrobial treated textiles on the skin. The HaCaT cell line of human keratinocytes was used and the MTT method was applied 72 hours after the treatment. The results showed that all tested dilutions as well as the initial solution obtained by extraction of antimicrobial treated cotton/polyester fabric reduce the proliferation and viability of HaCaT cells. Also, it was observed that textiles that have been washed several times cause a smaller decrease in cell viability and proliferation, probably due to the washing off the antimicrobial agent with which the textile was treated.

**Keywords:** antimicrobial textiles, HaCaT cells, MTT method, dermal absorption

**Thesis contains:** 33 pages, 13 figures, 2 tables, 35 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** PhD Marina Miletić, Scientific Assistant

**Technical support and assistance:** PhD Ivana Kmetič, Full Professor

**Thesis defended:** September 16<sup>th</sup> 2022

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. STRUKTURA I BIOLOŠKE FUNKCIJE KOŽE .....	2
2.1.1. EPIDERMA.....	2
2.1.2. DERMA .....	5
2.1.3. HIPODERMA .....	5
2.2. DERMALNA APSORPCIJA .....	5
2.3. <i>IN VITRO</i> TESTOVI TOKSIČNOSTI.....	6
2.3.1. ALTERNATIVNI MODELI U ISPITIVANJIMA DERMALNE TOKSIČNOSTI.....	7
2.4. ANTIMIKROBNO OBRADENE TEKSTILIJE.....	12
2.4.1. AKTIVNI ANTIMIKROBNI AGENSI.....	12
2.4.2. ANTIMIKROBNA OBRADA TEKSTILNIH MATERIJALA.....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>19</b>
3.1. MATERIJALI .....	19
3.1.1. BIOLOŠKI MATERIJAL .....	19
3.1.2. TEKSTILIJE.....	19
3.1.3. KEMIKALIJE.....	19
3.1.4. OTOPINE .....	20
3.1.5. OPREMA I UREĐAJI .....	20
3.2. METODE .....	21
3.2.1. UZGOJ STANIČNE LINIJE HUMANIH KERATINOCITA (HaCAT).....	21
3.2.2. PRIPREMA TEKUĆIH EKSTRAKATA TEKSTILIJA .....	21
3.2.3. ODREĐIVANJE VIJABILNOSTI STANICA <i>MTT</i> METODOM.....	22
3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....	23
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>24</b>

4.1. UČINAK EKSTRAKATA IZOLIRANIH IZ POLIESTER/PAMUK TEKSTILIJA NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU HACAT STANIČNE LINIJE ODREĐEN <i>MTT</i> METODOM.....	24
4.2. UČINAK EKSTRAKATA IZOLIRANIH IZ POLIESTER/PAMUK TEKSTILIJA TRETIRANIH KITOZANOM NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU HACAT STANIČNE LINIJE ODREĐEN <i>MTT</i> METODOM.....	25
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>29</b>
<b>6. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>30</b>

## 1. UVOD

Koža je složeno višeslojno tkivo velike površine izložene okolini te je stoga kontinuirano izložena ksenobioticima (npr. plinovi, otapala). Međutim, zbog svoje višeslojne strukture predstavlja barijeru za apsorpciju spojeva kojima je svakodnevno izložena (Kmetič, 2016).

Svjetska potrošnja vlakana (sintetskih i prirodnih) značajno je porasla posljednjih nekoliko desetljeća. Tehnološki napredak primjene tekstila najviše se prepoznaje u odjevnim proizvodima, ali i u drugim industrijama kao što su proizvodnja ambalaže za hranu, kućnog namještaja, automobilskog tekstila, filtera za zrak, sustava za pročišćavanje vode, sustava za toplinsku i mehaničku zaštitu, sportske opreme i medicinskih uređaja (Morais i sur., 2016).

Rast mikroorganizama, posebno bakterija i gljivica, na tekstilu tijekom upotrebe i skladištenja negativno utječe na osobu koja dolazi u kontakt s tim tekstilom, ali i na sam tekstil. Potreba potrošača za higijenski pogodnom odjećom potakla je veliku potražnju za antimikrobnim tekstilom (Gao i Cranston, 2008). Antimikrobna obrada mora biti učinkovita prema širokom spektru mikroorganizama, pri tome ne smije biti toksična za korisnika tekstila i ne smije uzrokovati alergije, iritacije ili preosjetljivost. Također, trebala bi biti otporna na opetovano pranje, kemijsko čišćenje i glačanje te ne smije ugroziti kvalitetu ili izgled tekstila (Periolatto i sur., 2017). Antimikrobni agensi mogu djelovati kao biostatici ili biocidi te se mogu dodatno kategorizirati na temelju ciljanog mikroorganizma pa tako razlikujemo antibakterijsku, antivirusnu i antifungalnu obradu (Gulati i sur., 2021). Najčešće upotrebljavani antimikrobni agensi su metali i soli metala, kvaterni amonijevi spojevi (engl. *Quaternary Ammonium Compounds*, QAC), polihekzametilen bigvanid (PHMB), triklosan, kitozan, *N*-halamin, peroksikiselina, boje, pigmenti, nanočestice i razni prirodni spojevi (Ibrahim i sur., 2021). U antimikrobnoj obradi tekstilija korištenih u ovom završnom radu upotrebljen je kitozan, deacetilirani derivat hitina.

Zbog brojnih razloga *in vivo* ispitivanja dermalne apsorpcije su rijetka te se razvijaju različiti alternativni (*in vitro*) modeli poput kultura stanica, a koje se odnose na laboratorijske metode koje omogućuju rast eukariotskih ili prokariotskih stanica u fiziološkim uvjetima (Schaefer i sur., 2008; O'Hare i Atterwill, 1995).

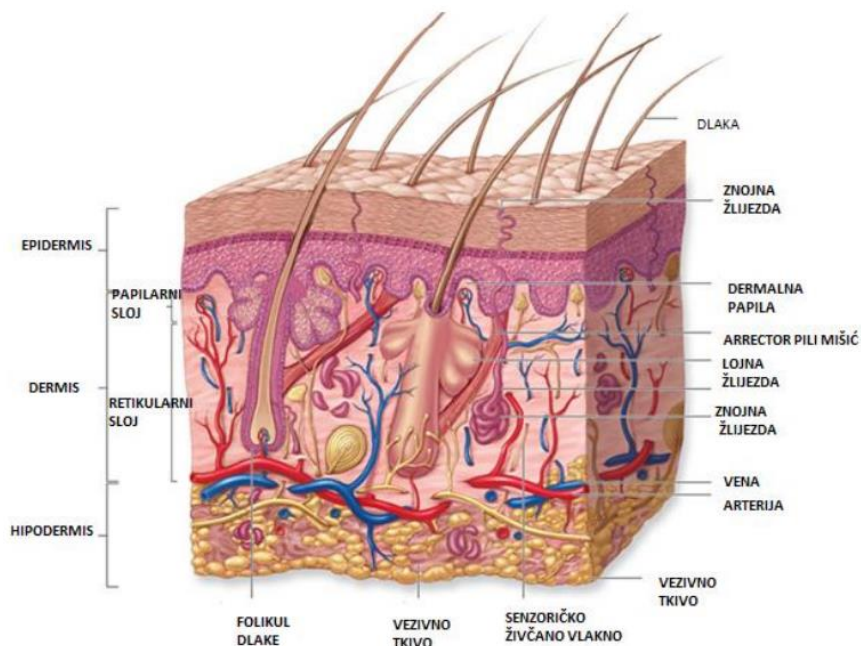
Cilj ovog rada je primjenom alternativnog test sustava HaCaT stanične linije humanih keratinocita te *in vitro* MTT metode ispitati citotoksičnost kitozanom obrađenih tekstilija (poliester/pamuk) koje se razlikuju prema broju pranja i kemijskoj obradi.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. STRUKTURA I BIOLOŠKE FUNKCIJE KOŽE

Koža (slika 1) je organ koji je u kontaktu s okolinom pa je njena anatomska građa od iznimne važnosti zbog razumijevanja funkcije barijere, prodiranja, apsorpcije i imunoloških uloga kao odgovora na vanjske agense (Monteiro-Riviere, 2010). Kožu sisavaca čine tri različita sloja: epiderma, derma i hipoderma te sebum (prirodno ulje koje prekriva kožu, omogućava zadržavanje vode u epidermi, ali nema mogućnost usporavanja penetracije ksenobiotika). Koža regulira proizvodnju sebuma te sadrži žlijezde lojnice koje luče taj sebum, sastavljen od lipida. Također, sadrži i žlijezde znojnice, koje su odgovorne za lučenje sekreta, ali sudjeluje i u biosintezi keratina, kolagena, melanina, lipida i ugljikohidrata, kao i u biotransformacijama ksenobiotika (Monteiro-Riviere, 2010).



Slika 1. Shematski prikaz građe kože (Grgurević, 2019)

#### 2.1.1. Epiderma

Epiderma je keratinizirani slojeviti pločasti epitel koji potječe iz ektoderma i čini krajnji vanjski sloj kože. Tanka je u područjima s gustim slojem dlaka, a deblja je u područjima bez dlake (Monteiro-Riviere, 2010).

Na samoj površini epiderme nalazi se sloj ljuštenja, odnosno disjunkcije, u kojem se keratinociti pojedinačno odvajaju i otpadaju te predstavljaju ograničenje za apsorpciju.

Stanice se obnavljaju iz temeljnog sloja tijekom cijelog života, a diobu stanica potiče epidermalni faktor rasta (Kmetič, 2016). Ljudska koža debela je 3 mm, a iako je epiderma debela samo 0,1 – 0,8 mm upravo ona pruža najveću otpornost za prodiranje toksikanata (Hodgson, 2010).

#### 2.1.1.1. Slojevi epiderme

Epiderma se sastoji od pet slojeva: *stratum corneum* (rožnati sloj), *stratum lucidum* (svijetli sloj), *stratum granulosum* (zrnati sloj), *stratum spinosum* (trnasti sloj) i *stratum basale* (bazalni sloj) (Hodgson, 2010; Monteiro-Riviere, 2010).

Bazalni sloj sastoji se od jednog sloja stupčastih stanica, koje su usidrene u bazalnu membranu pomoću hemidesmosoma. Neke bazalne stanice djeluju kao matične stanice i dijele se, a neke djeluju kao pričvršne stanice koje ostaju pričvršćene za bazalnu membranu (Monteiro-Riviere, 2010). Keratinizacija je proces kojim se bazalni sloj keratinocita diferencira dok migrira u neživi stratificirani rožnati sloj (*stratum corneum*).

Rožnati sloj je površinski sloj epiderme koji se sastoji od nekoliko slojeva korneocita, stanica koje su migrirale iz zrnatog sloja. Korneociti su mrtve, spljoštene keratinske niti poravnate u disulfidna umrežena mikrovlakna (Venus i sur., 2010). Debljina ovog sloja varira ovisno o dijelovima tijela na kojima se nalazi. Stanice rožnatog sloja su organizirane na način da su poslagane jedna na drugu i tvore okomite isprepletene stupove koji imaju oblik tetrakaidekaedra, što omogućava popunjavanje bez slobodnog međuprostora. Time se olakšava održavanje funkcije barijere kože. Rožnati sloj sadrži i međustanične lipidne komponente koje potječu iz lamelarnih granula zrnatog sloja, te su raspoređeni u lamelarne listove, koji čine barijeru epiderme. Svaka stanica rožnatog sloja je ugrađena u takav lipidni matriks te tvore strukturu popularno nazvanu strukturom „cigle i žbuke“ (Monteiro-Riviere, 2010).

Svijetli sloj sastoji se od tanke, prozirne zone između zrnatog i rožnatog sloja te je sastavni dio samo na područjima gdje je koža iznimno debela i bez dlaka, kao što su dlanovi i tabani. Sastoji se od 3 – 5 slojeva potpuno keratiniziranih spljoštenih mrtvih stanica te sadrži veliku količinu keratina i zadebljane plazma membrane i osigurava određen stupanj vodootpornosti kože (McLafferty i sur., 2012).

Zrnati sloj se sastoji od 3 – 5 slojeva spljoštenih keratinocita. U ovom sloju stanice prolaze kroz apoptozu (genetski programiranu staničnu smrt) i nisu u stanju obavljati bilo kakve metaboličke funkcije (McLafferty, 2012). Granule u ovom sloju sadrže strukturni protein profilagrin i polipeptid lorikrin, koji sudjeluju u keratinizaciji te imaju funkciju barijere.

Obilježje ovog sloja je prisutnost malih membranskih lamelarnih granula, organiziranih u paralelne hrpe. Njihov broj i veličina se povećavaju kretanjem prema staničnoj membrani stanica rožnatog sloja te predstavljaju primarnu komponentu barijere za kemijsku apsorpciju preko kože (Monteiro-Riviere, 2010).

Trnasti sloj je sloj poliedarskih stanica povezanih desmosomima, koji nastaje kada se stanice bazalnog sloja kreću prema površini. Pod mikroskopom ove stanice prepoznajemo kao „bodljike“, a unutar ovog sloja nalaze se i Langerhansove stanice (Venus i sur., 2010). U trnastom sloju se sintetizira involukrin, protein koji pruža strukturnu potporu stanicama te omogućava stanicama zaštitu od mikroorganizama i agenasa iz okoliša, ali nema ulogu u propusnosti same barijere (Monteiro-Riviere, 2010).

#### **2.1.1.2. Stanice epiderme**

Epiderma se sastoji od dviju vrsta stanica: keratinocita i nekeratinocita (melanociti, Merkelove stanice, Langerhansove stanice). Svaka od ovih vrsta stanica ima određenu ulogu pa tako melanociti služe za stvaranje pigmenta, Merkelove stanice za senzornu percepciju, a Langerhansove stanice imaju imunološku ulogu. Međutim, keratinociti su glavne stanice epiderme te se sastoje od filamentnih proteina i keratina (Monteiro-Riviere, 2010).

Melanociti su derivati neuralnog grebena te se nalaze na bazalnoj membrani i u bazalnom sloju epiderme. Proizvode granule pigmenta, melanosome, koje daju koži i kosi boju. Imaju važnu ulogu u zaštiti kože tako što štite jezgru epidermalnih stanica od ultraljubičastog zračenja (Baroni i sur., 2012).

Merkelove stanice su taktilne epiteloidne stanice koje se u malom broju nalaze u bazalnoj regiji epiderme, u koži bez dlake i s dlakom. Imaju dugu os koja ide paralelno s površinom kože te je okomita na stubaste bazalne epitelne stanice. Pomoću desmosoma, povezane su sa susjednim keratinocitima. Kada su povezane s aferentnim živčanim završetkom, nastaje kompleks taktilna epiteloidna stanica-neurit ili neinkapsulirano taktilno tjelešce. Ova područja obično se nazivaju taktilni diskovi dlake te oni mogu stimulirati rast keratinocita i funkcioniraju kao mehanoreceptori koji se sporo prilagođavaju dodiru (Monteiro-Riviere, 2010).

Langerhansove stanice, razvijene iz specijaliziranih dendritičkih stanica imunološkog sustava, nalaze se u trnastom sloju. Potječu iz crvene koštane srži, odakle migriraju u trnasti sloj (McLafferty, 2012). Najbrojnije su u epidermi, ali se nalaze i u folikulama dlake, žlijezdama lojnicama i apokrinim žlijezdama. Ove stanice su prisutne i u dermalnim limfnim žilama, limfnim čvorovima i u dermi. Jedinstvena karakteristika ovih stanica je prisutnost

karakterističnih granula u obliku štapića ili reketa poznate po nazivom Langerhansove stanične granule. Njihova primarna funkcija je da djeluju kao imunološke stanice (Monteiro-Riviere, 2010).

### **2.1.2. Derma**

Epidermalno-dermalni spoj, odnosno bazalna membrana razdvaja epidermu i dermu. Derma varira u debljini pa može biti debljine manje od 1 mm (npr. na kopcima), ali i preko 5 mm (npr. na leđima). To je čvrst i otporan sloj, koji pruža zaštitu od mehaničkih ozljeda te ima specifičnu strukturu. Papilarna derma je gornji tanki sloj koji se nalazi ispod epidermalnog grebena. Sljedeći, dublji sloj je retikularna derma. Budući da je derma vezivno tkivo, sastoji se od stanica, osnovne tvari i vlakana. Osnovna tvar su polisaharidi i proteini koji međudjeluju kako bi proizveli higroskopne makromolekule proteoglikana. Fibroblasti sintetiziraju vlakna kolagena i elastina, koja mijenjaju svoja svojstva starenjem (Venus i sur., 2010). U dermi se uz fibroblaste, nalaze i mastociti te makrofagi, ali i žlijezde znojnice, lojne žlijezde, folikule dlaka i mišići. Također, u dermi se nalazi i široka mreža kapilara koja ima utjecaj na regulaciju tjelesne temperature (Monteiro-Riviere, 2010).

### **2.1.3. Hipoderma**

Hipoderma, odnosno potkožni sloj najdublji je sloj kože i sastoji se od rahlog vezivnog tkiva i masti. U ovom sloju nalazi se oko 50 % tjelesne masti. Kao i derma, sadrži krvne i limfne žile te živčane stanice (Abd i sur., 2016). Funkcija hipoderme je učvrstiti dermu za mišić ili kost. Elastičan raspored kolagenskih i elastičnih vlakana omogućuje fleksibilnost kože i slobodno kretanje temeljne strukture (Monteiro-Riviere, 2010).

## **2.2. DERMALNA APSORPCIJA**

Dermalna apsorpcija može se definirati kao apsorpcija ispitivane kemikalije putem kože pasivnom difuzijom kada su koža i kemikalija u izravnom kontaktu, a koristi se za procjenu sustavne izloženosti i rizika (Ng i Yeong, 2019).

Na dermalnu apsorpciju utječu brojni biološki čimbenici poput anatomije, fiziologije i biokemije kože (Hodgson, 2004). Iako je koža kontinuirano izložena ksenobioticima poput plinova, različitih otapala i tvari u otopinama, svojom strukturom predstavlja barijeru za apsorpciju. Epiderma je neprokrvljeni sloj kože, dok je derma prokrvljena i stoga daleko propusnija. Međutim, u koži se nalaze i žlijezde lojnice te folikule korijena dlake, koje također

omogućavaju penetraciju toksikanta (Kmetič, 2016).

Većina toksikanata prodire pasivnom difuzijom niz koncentracijski gradijent. Pokretačku silu predstavlja gradijent koncentracije kroz membranu, a proces se nastavlja do ostvarivanja ravnoteže, iako u stvarnosti uvijek postoje kretanja dok je neto tok jednak nuli. Na kraju, koncentracije toksikanata s obje strane su jednake (Hodgson, 2004). Uz liposolubilne spojeve, kroz kožu se mogu apsorbirati i male polarne molekule poput hidrazina te na taj način mogu uzrokovati i sistemske i lokalnu toksičnost. Na dermalnu apsorpciju utječu različiti faktori poput vlažnosti, temperature i oštećenja vanjskog sloja epiderme (dovodi do povećane apsorpcije) te organska otapala (uklanjaju izlučevine lojnih žlijezdi čime olakšavaju resorpciju tvari), dok otopine detergenata pospješuju penetraciju. Apsorpcija također ovisi i o debljini epiderme na anatomskom području (najdeblja na dlanovima i tabanima) te je unos toksikanta ovisan i o mjestu prodiranja (Kmetič, 2016).

### **2.3. *IN VITRO* TESTOVI TOKSIČNOSTI**

Da bi se poboljšala znanstvena osnova trenutnih postupaka procjene rizika, potrebno je bolje razumijevanje mehanizama toksičnosti izazvanih kemikalijama. *In vitro* modeli ispitivanja istraživaču pružaju veću kontrolu nad varijablama, a relativno je jednostavno, jeftino i učinkovito (Jain i sur., 2018). *In vitro* ispitivanje toksičnosti trebalo bi se temeljiti na modelima koji su relevantni za određenu vrstu. Razvoj testa zahtijeva dobro definirane spojeve čija se toksičnost treba ispitati s visokokvalitetnim *in vivo* podacima te odgovarajući stanični sustav koji oponaša ključne događaje za koje je poznato da se javljaju *in vivo* (O'Hare i Atterwill, 1995).

*In vitro* stanična kultura obećavajuća je i trenutno najuspješnija alternativa upotrebi životinja. Izolirane stanice, tkiva i organi mogu se pripremiti i održavati u kulturi metodama koje čuvaju svojstva i karakteristike tih stanica, tkiva i organa (Krishna i sur., 2014). Kulture stanica odnose se na laboratorijske metode koje omogućuju rast eukariotskih ili prokariotskih stanica u fiziološkim uvjetima. Podrijetlo vuku iz 20. st. kada su korištene za proučavanje rasta i sazrijevanja tkiva, biologije virusa, razvoja cjepiva, otkrivanje uloge gena u bolesnih i zdravih pojedinaca te za proizvodnju biofarmaceutika (Segeritz i Vallier, 2017).

Stanične kulture uzgojene u laboratoriju mogu se klasificirati u tri skupine: (i) primarne, (ii) transformirane i (iii) matične. Primarne kulture stanice su one koje se izravno izoliraju iz tkiva, npr. fibroblasti dobiveni biopsijom kože ili hepatociti iz eksplantata jetre. Mnoga istraživanja se provode upravo na primarnim kulturama stanica obzirom da su one dobri predstavnici tkiva

od kojih potječu. Međutim, primarne kulture stanica su okarakterizirane kao konačne budući da njihova proliferacija prestaje nakon ograničenog broja staničnih dioba. Transformirane kulture stanice stvaraju se prirodno ili genetskom manipulacijom. Upotreba transformiranih, besmrtnih staničnih kultura omogućuje brzu stopu staničnog rasta te stabilne uvjete za održavanje i kloniranje. Međutim, njihov izmijenjeni genotip može rezultirati kariotipskim abnormalnostima i nefiziološkim fenotipovima. Matične stanice imaju sposobnost diferencijacije u niz drugih staničnih tipova, a svojstvo samo-obnavljanja omogućava dugotrajno održavanje u *in vitro* uvjetima. Takve stanice često djeluju kao fiziološki relevantni predstavnici *in vivo* mehanizama (Segeritz i Vallier, 2017).

Većina staničnih linija i primarnih staničnih kultura raste kao stanični sloj jedne debljine, odnosno rastu u monosloju pričvršćeni na staklo ili posebno obrađene plastične podloge (ATTC, 2022). Podloga za pričvršćivanje obično je modificirana polistirenom te nosi naboj. Medij za održavanje i rast sadrži soli i glukozu, obično i bikarbonatni pufer zbog kojeg se kulture održavaju u atmosferi s 5 – 10 % CO<sub>2</sub> pri određenoj temperaturi i vlazi u inkubatoru. Također, mnoge stanice zahtijevaju serum za optimalni rast, a sadrži proteine, inzulin, transferin i ostale čimbenike rasta (Hodgson, 2010). Kako bi kulture bile zdrave i aktivno rasle, potrebno ih je redovito subkultivirati. Najčešće metode subkultivacije uključuju prekid međustaničnih veza i veza između stanica i supstrata upotrebom proteolitičkih enzima kao što su tripsin ili kolagenaza. Tako se stanice disociraju u suspenziju, a potom se razrjeđuju i prenose u posude za svježju kulturu (ATTC, 2022).

Najčešće metode *in vitro* testova toksičnosti su *Kenacid Blue* kojom se određuje sadržaj ukupnih staničnih proteina mjerenjem intenziteta obojenja stanica *Coomassie Brilliant Blue R-250* bojom koja prolazi kroz staničnu membranu i veže se na stanične proteine (Soloneski i Larramendy, 2021), *Neutral Red* koja se temelji na sposobnosti živih stanica da vežu kationsku boju koja se akumulira u lizosomima (Ates i sur., 2017), *Trypan Blue* kojom se određuje udio vijabilnih stanica u staničnoj kulturi, a temelji se na ulasku plave boje u mrtve stanice (Strober, 2019) te *MTT* metoda koja se temelji na mjerenju aktivnosti mitohondrijskih enzima (Solenski i Larramendy, 2021). Od navedenih *in vitro* metoda, u ovome radu koristila se *MTT* metoda.

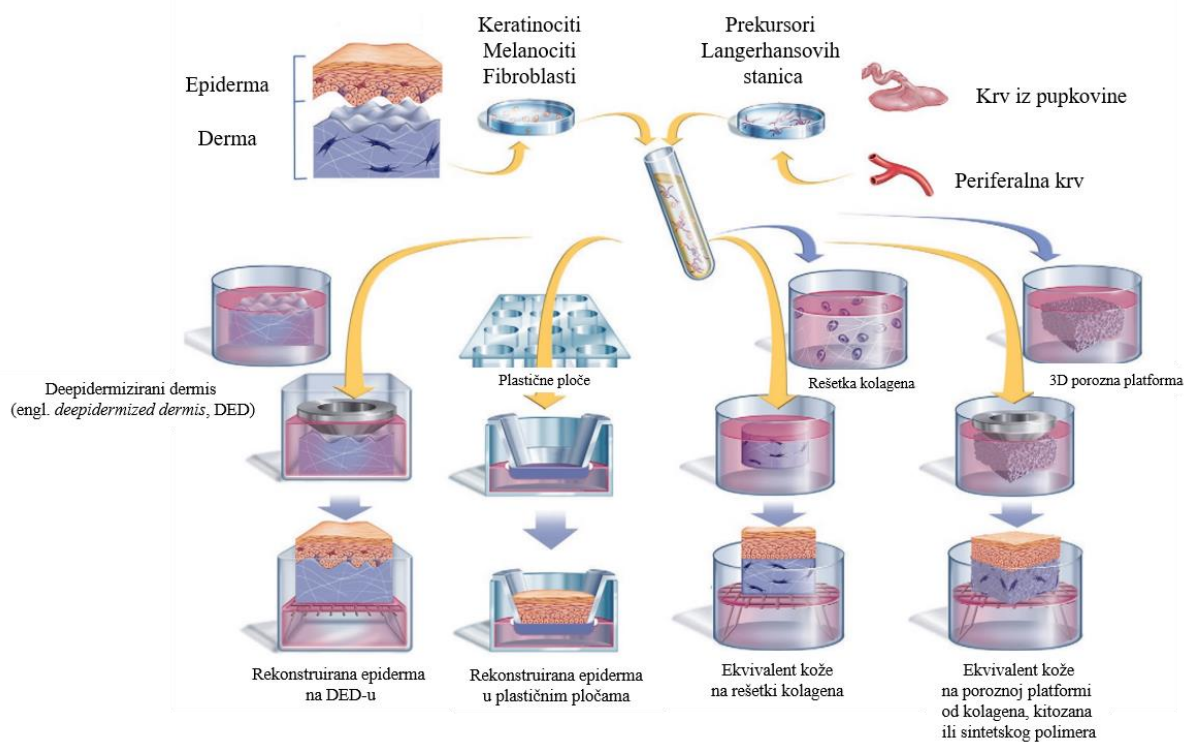
### **2.3.1. ALTERNATIVNI MODELI U ISPITIVANJIMA DERMALNE TOKSIČNOSTI**

Modeli za ispitivanje toksičnosti podrazumijevaju pristup kojim toksikolozi određuju toksičnost tvari, odnosno određuju odnos doze prema odgovoru, procjenjuju toksičnost na

laboratorijskim životinjama i provode naknadne statističke analize za kvantitativno određivanje toksičnosti (Stine i Brown, 2015). Alternativne metode ispitivanja razvijaju se u skladu s 3R modelom (*reduction, refinement, replacement*). Postoje razni modeli umjetne kože, dostupni su i epidermalni i dermalni sloj, dok je potkožni dio kože zanemaren (Schmidt i sur., 2020).

Svrha primjene *in vitro* testova u ispitivanjima dermalne toksičnosti je korištenjem nadražujućih i nenadražujućih kemikalija odrediti vrijeme i potrebnu koncentraciju toksikanta kojoj je površina kože izložena pri kojima će doći do iritacije. Poznati *in vitro* modeli kože uključuje normalne i besmrtno kulture keratinocita, fibroblasta i trodimenzionalne (3D) modele kože (Rogers i McDougal, 2002).

Zbog regulatornih promjena, predložene su različite alternative za zamjenu *in vivo* testova na životinjama. Uvedeno je nekoliko tehnologija za dizajniranje i razvoj bioloških (npr. modeli kože izvedeni iz dermalnih staničnih kultura) ili umjetnih (npr. platforme temeljene na sintetskim ili prirodnim biomaterijalima) modela kože koji oponašaju vrlo složenu i slojevitou strukturu ljudske kože (Yun i sur., 2018) (slika 2).



**Slika 2.** Različite vrste rekonstruiranih modela ovisno o podlozi i populaciji ugrađenih stanica (prema Pellevoisin i sur., 2018)

Prva regulatorno prihvaćena metoda koja koristi ljudski model jest *in vitro* test korozije kože

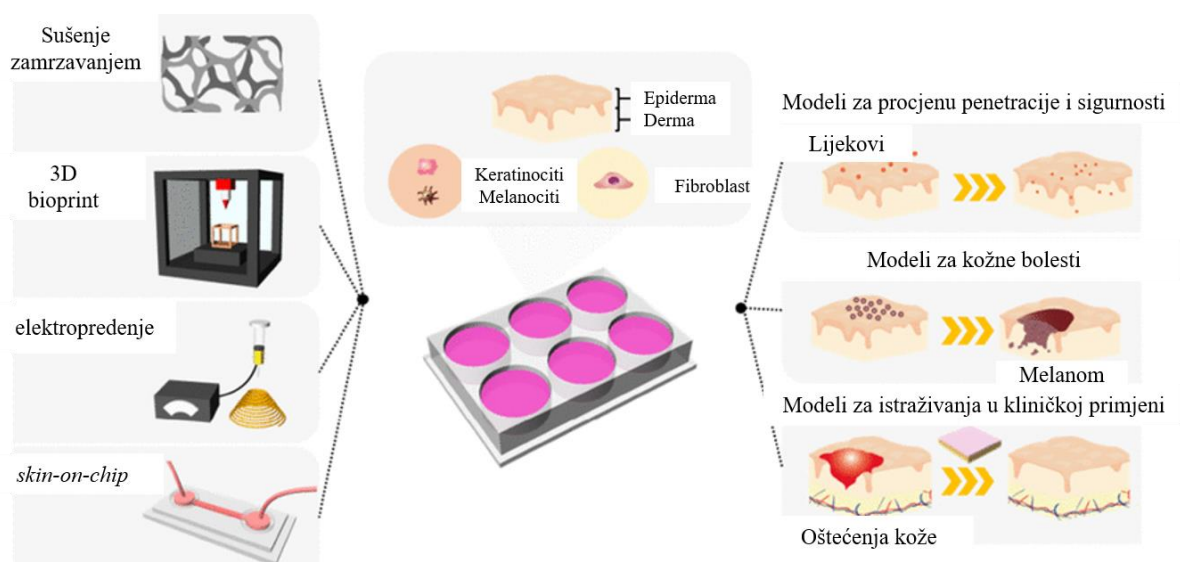
koji koristi model rekonstruirane ljudske epiderme (engl. *reconstructed human epidermis*, RhE). RhE se stvaraju iz netransformiranih ljudskih epidermalnih keratinocita koji tvore višeslojni, visoko diferencirani model ljudske epiderme. Sastoje se od organiziranih bazalnih, spinoznih i granularnih slojeva, a i višeslojnog rožnatog sloja koji sadrži raspoređene međustanične lamelarne lipidne slojeve analogne onima pronađenim u *in vivo* testovima (Kolle i Landsiedel, 2021). Ispitivanje iritacije kože pomoću RhE temelji se na činjenici da korozivne tvari i tvari koje nadražuju kožu izazivaju lokaliziranu traumu kao i kod iritacije kože u *in vivo* testovima. Nakon nanošenja ispitivane tvari na površinu rožnatog sloja rekonstruiranog tkiva, inducirana citotoksičnost mjeri se kolorimetrijskim testom. Citotoksičnost se izražava kao smanjenje aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze mjereno pomoću reducirane tetrazolijeve boje. Nakon ekstrakcije, određuje se optička gustoća spektrofotometrijski i uspoređuje s vrijednostima negativne kontrole kako bi se izrazila relativna vijabilnost tkiva. Ispitivane tvari koje smanjuju vijabilnost ispod graničnih vrijednosti identificirane su kao nadražujuće za kožu (Kolle i Landsiedel, 2021).

Kod ispitivanja dermalne toksičnosti potrebna je lokalna primjena na koži pa se glavni interes postavlja na određivanju razine ksenobiotika u koži, kako bi se mogla procijeniti dermalna bioraspoloživost i bioekvivalencija spojeva (Schaefer i sur., 2008). *In vitro* ispitivanja propusnosti kože baziraju se na odvajanju donorske i akceptorske komore pomoću membrane načinjene od prirodne kože ili bioinženjerskih materijala. Donorska komora može biti zatvorena ili otvorena pa to omogućava ispitivanje u različitim uvjetima. Otvoreni uvjeti dopuštaju razmjenu s okolinom, odnosno isparavanje i sušenje površine kože, dok zatvoreni uvjeti mogu dovesti do pretjerane hidratacije kože. Ovakva ispitivanja omogućavaju kontrolirane uvjete kao što su temperatura u određenom gradijentu, neometana difuzija, pH vrijednost, itd. Razina ksenobiotika unutar rožnatog sloja procjenjuje se uzorkovanjem pojedinačnih slojeva korneocita s ljepljivim filmom. Potom se ksenobiotik s trake ekstrahira i kvantificira prikladnom analitičkom metodom. Rezultati se prikazuju kao apsorbirana količina ksenobiotika rožnatog sloja po  $\text{cm}^2$  kože (Schaefer i sur., 2008).

Napredni modeli kože temelje se na kolagenskoj matrici koja uključuje ljudske fibroblaste i epidermalni sloj sastavljen od ljudskih keratinocita. Uz stanične komponente kože, još jedan ključni aspekt u projektiranim modelima kože je predstavljanje strukture pune debljine ljudske kože. Složeni modeli ljudske kože s odgovarajućim sastavom stanica i strukturom matrice mogu se izraditi različitim tehnikama, kao što su sušenje zamrzavanjem (engl. *freeze-drying*), trodimenzionalni (3D) bioprint, elektropredenje (engl. *electrospinning*) i mikrofluidni sustavi



(slika 3)(Yun i sur., 2018).



**Slika 3.** Modeli umjetne kože za *in vitro* testiranja (prema Yun i sur., 2018)

Potkožni sloj ima važnu ulogu u skladištenju i metabolizmu ksenobiotika pa je tako ključan i u procjeni njihovog učinka na kožu. Za izgradnju umjetnog vezivnog tkiva – kolagena, obično se koriste hidrogelovi kao glavna proteinska komponenta izvanstaničnog matriksa. Međutim, fibroblasti kontrahiraju hidrogelove temeljene na kolagenu što rezultira gubitkom veze epidermalnog sloja sa stijenkom umetka čime se gubi funkcija barijere kože. Potkožni sloj izgrađen je od kolagenskog gela pomiješanog sa svježe izoliranim adipocitima i puferom za neutralizaciju. Dermalni sloj sastoji se od fibroblasta ugrađenih u kolagenski hidrogel te od pufera za neutralizaciju gela, postavlja se u jažice ploča te inkubira 24 h, sutradan su dobiveni keratinociti. Kultivacija cijelog troslojnog modela traje 15 dana (Schmidt i sur., 2020).

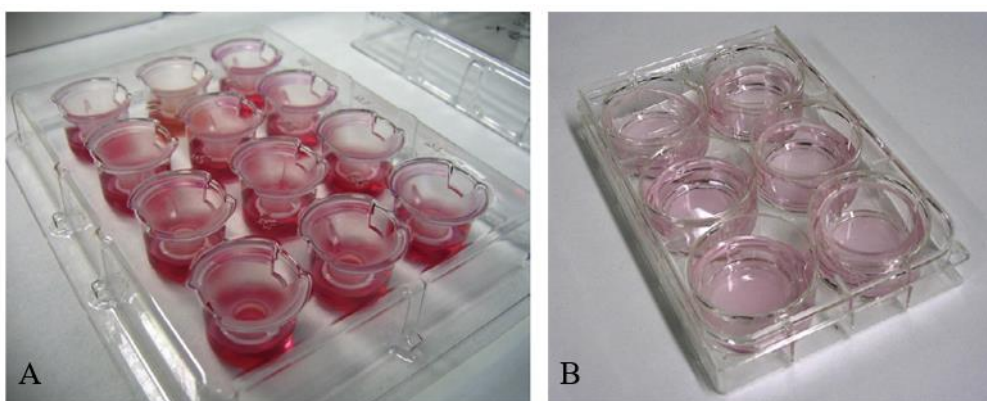
Pojam organoid odnosi se za opisivanje tkiva nalik organu koje sadrži više vrsta stanica, replicira funkcije organa i samostalno se sastavlja. Općenito se odnosi na organe koji se uzgajaju iz matičnih stanica pa oponašaju fetalnu i mladu kožu, ali nisu pogodni za modele ostarjele kože (Sutterby i sur., 2022).

Mikrofiziološki sustavi ili popularnije *organ-on-chip*, naziv su za modele organa složene strukture, koji imaju mogućnost oponašanja mikrookruženja prirodnog ljudskog tkiva. *Skin-on-chip* modeli uključuju interakcije stanica-stanica, stanica-matriks i stanica-okolina te simuliraju isporuku hranjivih tvari putem krvnih žila, uklanjanje otpadne tvari, uključuju različite stanice i rast stanica u 3D (Sutterby i sur., 2022).

Studije na dvodimenzionalnim (2D) stanicama datiraju još iz ranih 1900-ih te su ostali kao upotrebljavana metoda sve do danas. Podrazumijevaju izolaciju stanica iz tkiva ili korištenje

besmrtnih staničnih linija za proizvodnju prijanjajućih monoslojnih kultura keratinocita ili fibroblasta kao modela epiderme, odnosno derme. Supstrati izražavaju nefiziološka mehanička svojstva te je rast stanica ograničen na 2D, zbog čega se stanice spljošte i time se mijenja njihova morfologija i funkcije koje odstupaju od funkcije prirodnog tkiva. Studije na ovakvim stanicama imaju nisku moć predviđanja pa su uglavnom ograničene na studije citotoksičnosti, ali su neučinkovite u ispitivanju djelovanja ksenobiotika (Sutterby i sur., 2022).

Također, dolazi i do razvoja 3D *in vitro* modela testiranja. Karakterizirani su upotrebom tehnologije 3D *bioprinting*-a koja omogućava automatiziranu i naprednu proizvodnju. Ovim tehnologijama omogućen je razvoj više tipova stanica ljudske kože i biomaterijala s visokim stupnjem propusnosti i reproducibilnosti. Do danas, 3D modeli kožnog tkiva predstavljaju jedan od najrazvijenijih i najbolje istraženih *in vitro* modela nastalih inženjeringom te se koriste kao alternativni test sustav za testiranja u kozmetičkoj industriji (Ng i Yeong, 2019). 3D projektirani model kože pruža snažan alat ne samo za razumijevanje dermatologije za stanica-stanica, stanica-matriks i dermalno-epitelne interakcije, već i za procjenu sigurnosti novih formulacija lijekova ili kozmetičkih sastojaka (Yun i sur., 2018). Upotreba modela ljudskog tkiva omogućuje pouzdanije i točnije testiranje kozmetike, ali i provedbu raznih drugih toksikoloških istraživanja. Četiri ključne OECD (engl. *Organization for Economic Cooperation and Development*) testne smjernice (engl. *test guidelines*, TG) uključuju *in vitro* modele kožnog tkiva za ispitivanje: (i) dermalne apsorpcije (OECD TG 428), (ii) oštećenja kože nagrizanjem (OECD TG 431), (iii) kožne iritacije (OECD TG 439) te (iv) senzibilizacije (OECD TG 442D), a kao testni sustavi koriste se komercijalno dostupni *in vitro* 3D modeli (slika 4) poput EpiDerm™, EpiSkin™, SkinEthic™ Rhe, epiCS®, LabCyte EPI-Model, SkinEthic™ Rhe te KeratinoSens™ (Ng i Yeong, 2019).



**Slika 4.** Primjeri industrijskih rekonstruiranih 3D modela - (A) EpiSkin™, (B) SkinEthic™ Rhe (Pellevoisin i sur., 2018)

U ovom radu kao test sustav korištena je monoslojna kontinuirana stanična linija humanih keratinocita (HaCaT) koja se koristi za proučavanje epidermalne homeostaze i patofiziologije. HaCaT stanice lako je potaknuti na diferencijaciju u kulturi kako bi se mogle istražiti na biokemijskoj i molekularnoj razini. Pokazuju svojstva bazalnih stanica te odgovaraju na različite induktore diferencijacije kao što je  $Ca^{2+}$ . Tvore gotovo normalnu strukturu epitela te predstavljaju često upotrebljavan i vjerodostojan modelni sustav za provedbu analize diferencijacije keratinocita (Wilson, 2013).

Postoje i sintetski, umjetni, fantomski ili nebiološki modeli ljudske kože koji se odnose na materijale određene krutosti, elastičnosti, sposobnosti apsorpcije vode, pH, bubrenja i hrapavosti. Mogu se koristiti različiti materijali – tekućine, gelovi, elastomeri, epoksidne smole, metali i tekstil, međutim nijedan materijal ne replicira sve funkcionalne aspekte izvorne ljudske kože (Sutterby i sur., 2022).

## **2.4. ANTIMIKROBNO OBRAĐENE TEKSTILJE**

Svjetska potrošnja vlakana značajno je porasla od 1950-ih godina, a antimikrobno obrađeni tekstil koristi se u različitim područjima, od kućanstava do komercijalnih primjena, uključujući zračne filtre, ambalažu za hranu, zdravstvenu njegu, higijenu, medicinsku i sportsku odjeću, sustave za skladištenje, ventilaciju i pročišćavanje vode (Morais i sur., 2016).

Tijekom upotrebe i skladištenja na tekstilu dolazi do rasta mikroorganizama, posebno bakterija i gljivica, što negativno utječe i na osobu koja dolazi u kontakt s tim tekstilom, ali i na sam tekstil. Takvi mikroorganizmi se nalaze u okolini i brzo se vežu za tekstil, naročito u vlažnim i temperaturno povoljnim uvjetima. S druge strane, proteini u pamučnom tekstilu služe kao nutrijenti pri rastu mikroorganizama, za razliku od sintetskog tekstila, koji je otporniji na štetan učinak mikroorganizama zbog visoke hidrofobnosti (Gao i Cranston, 2008).

Povoljni za rast mikroorganizama su i prašina, znoj, zemlja, a štetan utjecaj može se kontrolirati antimikrobnom obradom tekstila koristeći široki spektar agensa ili ugradnjom agensa u sintetski tekstil. Štetan utjecaj predstavlja nepoželjne efekte koji se očituju kao nepoželjni miris, smanjenje mehaničke snage tkanine i povećanu učestalost kontaminacije. Potreba potrošača za higijenski pogodnom odjećom potakla je veliku potražnju za antimikrobnim tekstilom (Gao i Cranston, 2008).

### **2.4.1. AKTIVNI ANTIMIKROBNI AGENSI**

Antimikrobni agensi djeluju kao biostatici (inhibiraju rast mikroorganizama) ili biocidi (ubijaju

mikroorganizme). Idealna antimikrobna obrada tekstila treba zadovoljiti niz zahtjeva. Treba biti učinkovita protiv širokog spektra bakterija i gljivica, a da pritom ne predstavlja opasnost za potrošača. Također, mora biti otporna na pranje, suho čišćenje i vruće prešanje, pri čemu ne smije utjecati na kvalitetu i izgled samog tekstila te mora biti kompatibilna s kemijskim procesima kao što je npr. bojanje (Gao i Cranston, 2008).

Najčešće upotrebljavani antimikrobni agensi su metali i soli metala, kvaterni amonijevi spojevi (QAC), poliheksametilen bigvanid (PHMB), triklosan, kitozan, *N*-halamin, peroksikiselina, boje, pigmenti, nanočestice i razni prirodni spojevi (terpenoidi, lektini i polipeptidi, flavonoidi, kinoni, tanini, kumarini) (Ibrahim i sur., 2021; Morais i sur., 2016).

Metali te oksidi i soli metala, najčešće na bazi srebra, cinka ili kobalta, imaju snažan biocidni učinak zbog potencijala redukcije metala te selektivnosti atoma donora metala. Ovi spojevi vežu se na kisikove, dušikove ili sumporne donorske ligande prisutne u stanici mikroorganizma, čime izazivaju oksidacijski stres i oštećuju stanične proteine, lipide i DNA. Međutim, korištenje u komercijalne svrhe je spriječeno zbog ekonomskih, ekoloških i tehničkih razloga. Trajnost obrade nije duga ukoliko ne prethodi tretman tekstila plazmom, UV-om ili kiselinom. Dostupni komercijalni proizvodi uglavnom se temelje na srebru, u izoliranom obliku za doradu vlakana ili ugradnju u vlakno ili tkaninu (Periolatto i sur., 2017). Tijekom primjene srebro difundira na površinu vlakna i u prisutnosti vlage stvara ione srebra. Postupnim oslobađanjem postiže se dulje razdoblje biocidne aktivnosti, a brzina oslobađanja ovisi o kemijskim i fizikalnim karakteristikama vlakna i količini srebra u vlaknu (Gao i Cranston, 2008).

Agensi na bazi nanočestica primjenjuju se i na prirodnom i na sintetskom tekstilu. Nanočestice srebra, osim što posjeduju snažnu antimikrobnu aktivnost prema raznim mikroorganizmima, nemaju toksično djelovanje za humane stanice, imaju dugotrajnu postojanost i povećavaju sposobnost bojanja. Također su pokazali antivirusno djelovanje protiv virusa SARS-CoV-2, uzročnika bolesti COVID-19. Osim nanočestica srebra, koriste se još i nanočestice titana, kositra, cinka, zlata i bakra (Gulati, i sur., 2021).

Kvaterni amonijevi spojevi (QAC) nose pozitivan naboj na dušikovom atomu u otopini i obično su vezani na površinu anionskog vlakna ionskom interakcijom. U industriji se najviše koriste spojevi koji sadrže duge alkilne lance (C12-C18) i to uglavnom za pamuk, poliester, najlon i vunu. Antimikrobno djelovanje ovih spojeva ovisi o duljini alkilnog lanca, prisutnosti perfluorirane skupine i broju kationskih amonijevih skupina u molekuli. Djeluju protiv širokog spektra mikroorganizama, a njihovo antibakterijsko djelovanje temelji se na međudjelovanju

površinskih pozitivnih naboja i negativnih naboja stanične membrane s posljedičnim gubitkom permeabilnosti membrane te uzrokuje oštećenje staničnih membrana, denaturaciju proteina i inhibiciju proizvodnje DNA. Međutim, vrlo lako se ispiru s tekstilija pa im se brzo smanjuje koncentracija (Periolatto i sur., 2017; Morais i sur., 2016).

Vantocil je heterodisperzna smjesa poliheksametilen bigvanida (PHMB). Predstavlja jako baktericidno sredstvo s niskom toksičnošću te se uspješno koristi kao dezinficijens u industriji hrane i dezinfekciji bazena. Njegova upotreba je proširena na sintetska vlakna upotrebom smole i katalizatora. Također, može se izravno nanositi na pamuk pri sobnoj temperaturi i neutralnom pH. U svrhu obrade tekstila razvijaju se posebne vrste PHMB-a poput Reputex<sup>®</sup>-a (Gao i Cranston, 2008).

Triklosan (2,4,4'-trikloro-2'-hidroksidifenil eter) je antimikrobni agens širokog spektra djelovanja. Koristi se još od 1960. godine u raznim potrošačkim proizvodima, kao što su paste za zube, sapuni za ruke, dezodoransi, vodice za ispiranje usta, gelovi za tuširanje. Djeluje na način da inhibira rast bakterija blokiranjem biosinteze lipida. To je relativno mala molekula koja se može kombinirati s bojama ili nanositi nakon bojanja. Miješanjem taline ili polimerizacijom u suspenziji, triklosan se može ugraditi izravno u sintetske polimere. Rast mikroorganizama inhibira razbijanjem njihove stanične stijenke. Smanjenje njegovog djelovanja uočeno je nakon ponavljanog pranja tekstila tretiranog triklosanom, a veliku zabrinutost je uzrokovao zbog toga što se izlaganjem sunčevoj svjetlosti pretvara u 2,8-diklorodibenzo-*p*-dioksin (2,8-DCDD), kemikaliju srodnu drugim štetnim polikloriranim dioksinima (Ibrahim i sur., 2021).

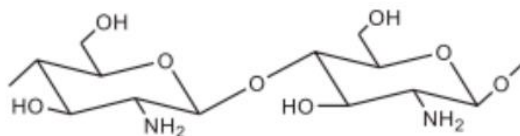
Za trajnu antimikrobnu obradu koriste se *N*-halaminski spojevi s klorom. To su dezinficijensi širokog spektra djelovanja koji se koriste u obradi vode, ali i proizvodnji antimikrobno obrađenih tekstilija. Njihova antimikrobna sposobnost pripisuje se oksidacijskim svojstvima veze N-Cl. Djelovanjem na mikroorganizam, N-Cl veza prelazi u N-H, a neaktivna tvar ponovno se puni klorom u otopini za izbjeljivanje tijekom pranja te se time stvara jaka i obnovljiva antimikrobna aktivnost. Međutim, obrada *N*-halaminom rezultira značajnom količinom adsorbiranog klora koji na površini tkanine uzrokuje kovalentno vezanje *N*-halamina. Adsorbirani halogen proizvodi neugodan miris i obezboji tekstiliju. Nevezani, zaostali klor uklanja se pomoću natrija s površine tkanine kako bi se spriječilo nepoželjno djelovanje (Gao i Cranston, 2008).

Peroksikiseline pretvaraju se u karboksilnu kiselinu tijekom antimikrobnog djelovanja, ali se mogu regenerirati reakcijom s oksidansom. Neka sintetska bojila koja se koriste u tekstilnoj

industriji, npr. metalna bojila, pokazuju antimikrobno djelovanje. Stoga se bojanje i antimikrobna obrada tekstilija mogu izvoditi istovremeno (Gao i Cranston, 2008).

Mnoge prirodne aktivne tvari koriste se u razvoju antimikrobno obrađenih tkanina. Primjenjuju se biljni ekstrakti, eterična ulja i životinjski proizvodi. Koriste se prirodni spojevi poput ciklodekstrina, cikličkog oligosaharida koji ima hidrofilnu površinu i lipofilnu unutrašnjost. U primjeni proizvodnje antimikrobno obrađenih tekstilija uz ciklodekstrin koriste se i njegovi derivati ( $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ - ciklodekstrin) (Gulati, i sur., 2021).

Kitozan (slika 5) je deacetilirani derivat hitina te je korišten u antimikrobnoj obradi tekstilija korištenih u ovom završnom radu. Među antimikrobnim sredstvima prirodnog podrijetla, kitozan i njegovi derivati predstavljaju najučinkovitiji prirodni antimikrobni agens na tržištu. S obzirom na prirodno podrijetlo, on je biorazgradiv, biokompatibilan, netoksičan i nekancerogen, odnosno ekološki prihvatljiv. Ima svojstvo stvaranja filma i premaza kada se izlije iz kiselih vodenih otopina organskih materijala, a pokazuje i snažno antimikrobno djelovanje protiv širokog spektra mikroorganizama (Periolatto i sur., 2017).



**Slika 5.** Kitozan (Morais i sur., 2016)

Na antimikrobno djelovanje utječu intrinzični čimbenici i uvjeti u okolini kao što su molekulska masa, stupanj polimerizacije, deacetilacija, pH medija i vrsta mikroorganizma. Smatra se i baktericidom i bakteriostatikom, a najprihvatljiviji mehanizam djelovanja temeljen je na elektrostatskim interakcijama između pozitivno nabijenih skupina kitozana i negativno nabijenih staničnih membrana mikroorganizama. Uzrokuje promjene u svojstvima membrane, propusnosti stijenke, inhibira rast te uzrokuje istjecanje unutarstaničnih elektrolita. Drugi predloženi mehanizam temelji se na vezanju kitozana na DNA mikroorganizma, čime se inhibira mRNA i sinteza proteina. Njegova primjena je većinom u pakiranju hrane i jestivih filmova, u biomedicinskim i farmaceutskim područjima, kozmetici, dermatološkom području, te proizvodnji papira i tekstila (Periolatto i sur., 2017). Snažan, ali kratkotrajan antimikroban učinak uočen je nakon tretmana pamuka te je njegova izdržljivost poboljšana pomoću kemikalija umreženih u pamuk i postignuta je postojanost do 50 pranja. Također, može se presti u vlakna, ali takva njegova primjena je ograničena na medicinsku upotrebu (Gao i Cranston, 2008).

#### 2.4.2. ANTIMIKROBNA OBRADA TEKSTILNIH MATERIJALA

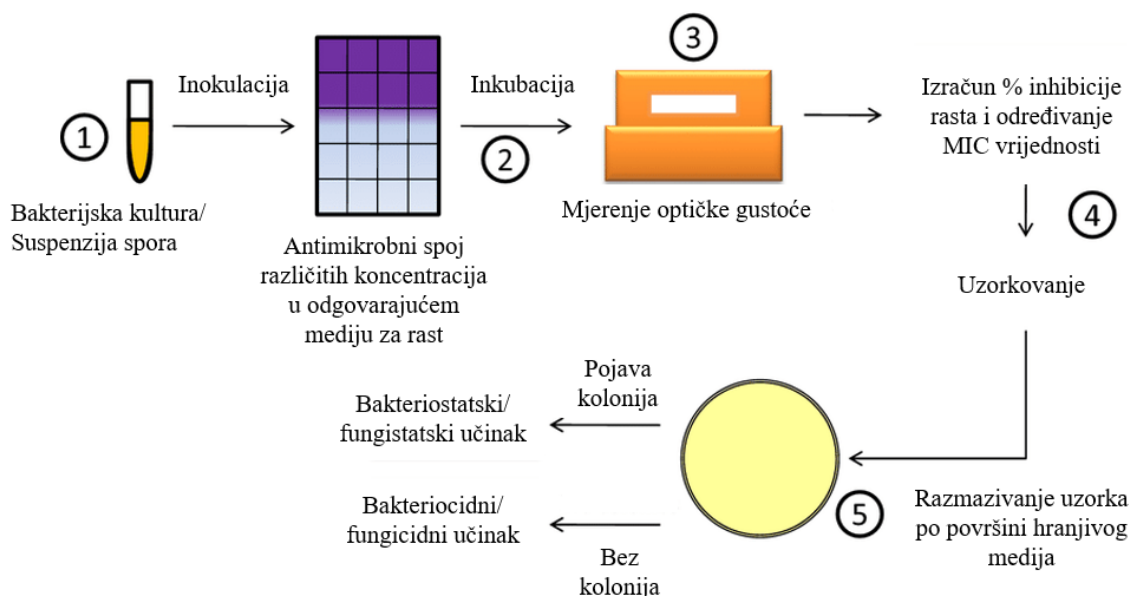
Antimikrobni agensi i njihova ugradnja u tekstilije ovisi o vrsti tekstilnih materijala i vlakana. Neki pristupi se temelje na uporabi specifičnih antimikrobnih agensa koji se u slučaju sintetskih vlakana mogu ugraditi u polimernu matricu, a mogu se dodavati i na površinu materijala u završnoj fazi. Ovisno o korištenom pristupu, antimikrobno obrađena tekstilija može djelovati kontaktom i/ili difuzijom. U slučaju kontakta, agens djeluje isključivo ukoliko mikroorganizam dođe u kontakt s vlaknom, dok u slučaju difuzije agens je na površini vlakna ili u polimernoj matrici te s tekstila migrira na vanjski medij kako bi djelovao na mikroorganizme (Morais i sur., 2016).

Ovisno o tretmanu i korištenom antimikrobnom agensu, antimikrobno obrađena tkanina može biti tkanina namijenjena korištenju nakon ispiranja, ali može biti namijenjena i za korištenje bez ispiranja, a ovisno o mehanizmu može djelovati kao biocid ili biostatik. Biocidi i biostatici mogu se dodatno kategorizirati na temelju ciljanog mikroorganizma pa tako razlikujemo antibakterijsku, antivirusnu i antifungalnu obradu. Za odjeću je poželjnije biostatsko djelovanje jer se njime ne uništava prirodna bakterijska flora kože, a biocidno djelovanje pogodnije je za medicinsku i ekološku primjenu. Većina zaraznih bolesti izravno je povezana s bakterijskim i gljivičnim biofilmom, a antimikrobna obrada tekstilija može spriječiti stvaranje biofilma i smanjiti opasnost od infekcije (Gulati i sur., 2021).

Apsorpcijske ili kvantitativne metode daju vrijednost antimikrobne aktivnosti na temelju smanjenja rasta bakterija. Međutim, one zahtijevaju više vremena i materijala nego kvalitativne metode. U kvantitativnim metodama mali volumen bakterijskog inokuluma stavlja se u izravan kontakt s uzorcima tkanine omogućujući apsorpciju cijele tekućine. Nakon inkubacije, bakterije iz tkanine se eluiraju, a ukupni broj bakterija se određuje serijskim razrjeđivanjem. Antimikrobna aktivnost može se izraziti kao postotak smanjenja u odnosu na kontrolu (Pinho i sur., 2011).

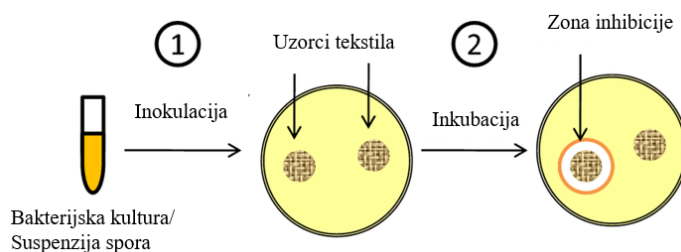
Antibakterijsko djelovanje aktivnog agensa može se ispitati različitim metodama koje predlaže Institut za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI). Metoda razrjeđivanja u epruveti (slika 6) je najkonvencionalnija, najučinkovitija i najpouzdanija metoda, a temelji se na mjerenju optičke gustoće. Vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije (engl. *minimum inhibitory concentration*, MIC) definirana je kao najniža koncentracija koja može inhibirati rast ispitivanih bakterijskih sojeva. Metoda

razrjeđivanja u epruveti može se isto tako koristiti za izračun inhibitorne koncentracije, što je važan čimbenik za procjenu učinkovitosti antimikrobnih agensa (Gulati i sur., 2021).



**Slika 6.** Metoda razrjeđivanja u mikroeprevetama za procjenu antimikrobnog potencijala djelatne tvari: (1) bakterijska kultura ili suspenzija spora testnih organizama s poznatom koncentracijom stanica/spora, (2) antimikrobni spoj različitih koncentracija u steriliziranom mediju za rast zajedno s odgovarajućim pozitivnim i negativnim kontrolama, (3) mjerenje vizualnog rasta ili optičke gustoće nakon inkubacije, (4) izračun  $IC_{50}$  (engl. *inhibitory concentration*), (5) potvrda bakteriostatskog/fungistatskog ili bakteriocidnog/fungicidnog učinka antimikrobnog spoja (prema Gulati i sur., 2021)

Antimikrobna svojstva tekstilija mogu biti određena pomoću *fabric disc difuzion* testa (slika 7). Kružni disk uzorka tekstilije je postavljen na inokuliranu površinu agara te se nakon postavljanja uzorka tekstilije pojavljuje zona inhibicije koja potvrđuje antimikrobno djelovanje uzorka.



**Slika 7.** Ispitivanje difuzije diska na tkanini: (1) širenje ispitne bakterijske kulture ili suspenzije spora na hranjivom mediju i postavljanje kružnog diska uzorka tkanina, (2) mjerenje zone inhibicije nakon inkubacije (prema Gulati i sur., 2021)

Filamentne gljive smatraju se organizmima koji najviše oštećuju tekstil zbog sposobnosti rasta na velikom broju prirodnih podloga. Tekstilije u čijoj antimikrobnoj obradi su uključeni



silicijev dioksid, srebro i ugljik uzrokuju značajnu inhibiciju u rastu spomenutih gljiva. Osnovni postupak za određivanje antivirusnog agensa uključuje tretiranje virusa ispitivanim agensom te inkubaciju s virusno osjetljivim stanicama. Većina tekstilija koje imaju intrinzična antimikrobna svojstva općenito pripadaju tipu tkanina namijenjenih primjeni bez ispiranja. Ovaj test se provodi jednostavnim namakanjem tekstilije u destiliranu vodu ili pranjem s otopinom deterdženta s neionskim surfaktantom. Uzorak se više puta ispiri ili pere kako bi se utvrdilo ispiranje antimikrobnog agensa. Sintetska vlakna, kao što su akril, najlon, poliester, polipropilen i tetrafluoroetilen mogu imati antimikrobna svojstva, koja se dodatno mogu poboljšati tretmanom s antimikrobnim agensima (Gulati i sur., 2021).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. BIOLOŠKI MATERIJAL

Od biološkog materijala u radu je korištena HaCaT stanična linija humanih keratinocita.

##### 3.1.2. TEKSTILIJE

U radu su korištene tekstilije – mješavina poliester/pamuka (PES/CO) namijenjene upotrebi u bolničkom okruženju (Tablica 1). Postupci obrade tkanina provedeni su na Tekstilno-tehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Dio tkanina tretiran je s 8 % NaOH i obrađen u kupelji s kitozonom te oprane jedan, pet ili deset puta. Kitozan se nanosi na uzorak tekstilije u dva koraka na džigeru: 1) luženje i mercerizacija na 25 °C , prolazak kroz kupku koja sadrži 8 % NaOH i 8 g L<sup>-1</sup> Subitol MFL; 2) implementacija kitozana na 25 °C, prolazak kroz drugu kupku koja sadrži 10 g L<sup>-1</sup> kitozana u prahu; 1 g L<sup>-1</sup> Felosan NOF; 68 g L<sup>-1</sup> SHP; 70 g L<sup>-1</sup> limunske kiseline.

**Tablica 1.** Uzorci tekstilija dobiveni s Tekstilno-tehnološkog fakulteta i način njihove obrade:

Uzorak	Opis obrade
ST_PES/CO	netretirana poliester/pamuk tkanina
ST_PES/CO_5W	netretirana poliester/pamuk tkanina poslije 5 ciklusa održavanja
PES/CO_8%_1W	poliester/pamuk tkanina tretirana s 8 % NaOH i obrađena u kupelji s kitozonom poslije 1 ciklusa održavanja
PES/CO_8%_5W	poliester/pamuk tkanina tretirana s 8 % NaOH i obrađena u kupelji s kitozonom poslije 5 ciklusa održavanja
PES/CO_8%_10W	poliester/pamuk tkanina tretirana s 8 % NaOH i obrađena u kupelji s kitozonom poslije 10 ciklusa održavanja

##### 3.1.3. KEMIKALIJE

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), Sigma-Aldrich, St.Luis, SAD
- *Heat Inactivated Fetal Bovine Serum* (FBS), GIBCO, Life Tehnologies, SAD
- 0.25 % *Trypsin-EDTA*, Sigma-Aldrich, St.Luis, SAD

- apsolutni etanol, Alkaloid, Skoplje, Makedonija
- DMSO (dimetilsulfoksid), Kemika, Zagreb
- boja *Trypan Blue*, Sigma-Aldrich, St.Luis, SAD
- *MTT*, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Subitol MFL
- Felosan NOF
- Natrijev hipofosfit pentahidrat (SHP)
- ECE-fosfatni detergent

#### **3.1.4. OTOPINE**

##### Ishodna otopina *MTT*

*MTT* 25 mg

PBS 5 mL

- sterilno profiltrirati

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

*Trypan Blue* 0,08 g

PBS pufer 20 mL

- profiltrirati

#### **3.1.5. OPREMA I UREĐAJI**

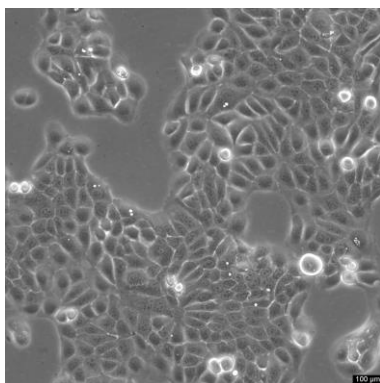
U radu je korištena sljedeća oprema:

- komora za sterilan rad (laminar); Twin 30, Gelaire Flow Laboratories, Velika Britanija
- inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub>; IR 1500, Automatic CO<sub>2</sub>, Flow Laboratories, Velika Britanija
- čitač mikrotitarskih pločica; model LKB 5060-006, LKB Vertriebs GmbH, Beč, Austrija
- inverzni mikroskop; Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- svjetlosni mikroskop; LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- analitička vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- tehnička vaga, Mettler P1210, Zürich, Švicarska
- sterilni filteri (promjer filtra 15 mm; promjer pora 0.22 μm)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. UZGOJ STANIČNE LINIJE HUMANIH KERATINOCITA (HaCaT)

U ispitivanju citotoksičnosti odabranih tkanina korištene su HaCaT stanice humanih keratinocita (slika 8) koje rastu u monosloju. Prije rada s navedenim stanicama potrebno je provesti njihovu kultivaciju. Stanice su uzgajane u DMEM mediju s dodatkom 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS) u T-bocama u uvjetima modificirane atmosfere (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % zraka) na 37 °C. Manipulacija stanicama zahtijeva sterilne uvjete, stoga se sav rad sa stanicama provodio u komori za sterilan rad, odnosno laminaru. HaCaT stanična linija raste u monosloju pa su se stanice prije prenošenja u veće mjerilo odvajale od površine T-boce pomoću tripsina. Stanice su se brojale u Fuchs-Rosenthal-ovoj komorici *Trypan Blue* metodom te se suspenzija stanica razrjeđivala dodatkom svježeg medija za uzgoj.



Slika 8. HaCaT – stanična linija humanih keratinocita (CLS, 2022)

### 3.2.2. PRIPREMA TEKUĆIH EKSTRAKATA TEKSTILIJA

Uzorci tekstilija veličine 60 cm<sup>2</sup> stavljaju se sat vremena u laminar pod UV svjetlo. Nakon toga se stavljaju u epruvetu u 10 mL DMEM-a koji sadrži 10 % FBS-a. Tako pripremljeni uzorci ostavljaju se 2 h na sobnoj temperaturi, a zatim se premještaju u inkubator preko noći na temperaturu od 37 °C. Nakon 24 h uzorak tekstilije izvadi se iz epruvete te se otopina sterilno filtrira 3 puta kroz filter veličine pora 0,22 µm. Takav filtrat predstavlja ishodnu otopinu (I.O.) koju koristimo za pripremu razrjeđenja dodatkom DMEM-a s 10 % FBS-a. Razrjeđenja ishodnih otopina prikazana su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Razrjeđenja ishodnih otopina

<b>RAZRJEĐENJE</b>	<b>I.O. + SM</b>
<b>2X</b>	1600 $\mu$ L I.O. + 1600 $\mu$ L SM
<b>4X</b>	800 $\mu$ L I.O. + 2400 $\mu$ L SM
<b>8X</b>	400 $\mu$ L I.O. + 2800 $\mu$ L SM
<b>16X</b>	200 $\mu$ L I.O. + 3000 $\mu$ L SM
<b>32X</b>	100 $\mu$ L I.O. + 3100 $\mu$ L SM

I.O. – ishodna otopina; SM – serum/medij

### **3.2.3. ODREĐIVANJE VIJABILNOSTI STANICA *MTT* METODOM**

Djelovanje potencijalno štetnih tvari kojima su tekstilije impregnirane na proliferaciju HaCaT stanica prati se naciepljivanjem po 200  $\mu$ L suspenzije HaCaT stanica u koncentraciji  $1 \times 10^5$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj u bunariće na mikrotitrskoj ploči (*96-well*). Nakon 24 h uklanja se medij u kojem su stanice rasle te se stanice tretiraju s po 200  $\mu$ L različitih razrjeđenja ekstrakata testnih tekstilija. Također, prati se i rast u kontrolnom uzorku stanica – stanice u svježem mediju za uzgoj uz dodatak seruma. Nakon inkubacije u trajanju od 72 h vijabilnost stanica se provjerava spektrofotometrijski provedbom *MTT* metode. 20  $\mu$ L *MTT*-a dodaje se u jažice na mikrotitrskoj ploči te se stanice inkubiraju tri sata na 37 °C. Nakon završetka inkubacije, otopina se vadi iz jažica te se dodaje 200  $\mu$ L DMSO-a kako bi se otopili nastali kristali formazana. Intenzitet nastalog ljubičastog obojenja otopine određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 540 nm u odnosu na slijepu probu.

### 3.3. OBRADA PODATAKA

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

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

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

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

N = ukupni broj uzoraka u skupini

$x_i$  = pojedinačne vrijednosti uzoraka

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

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

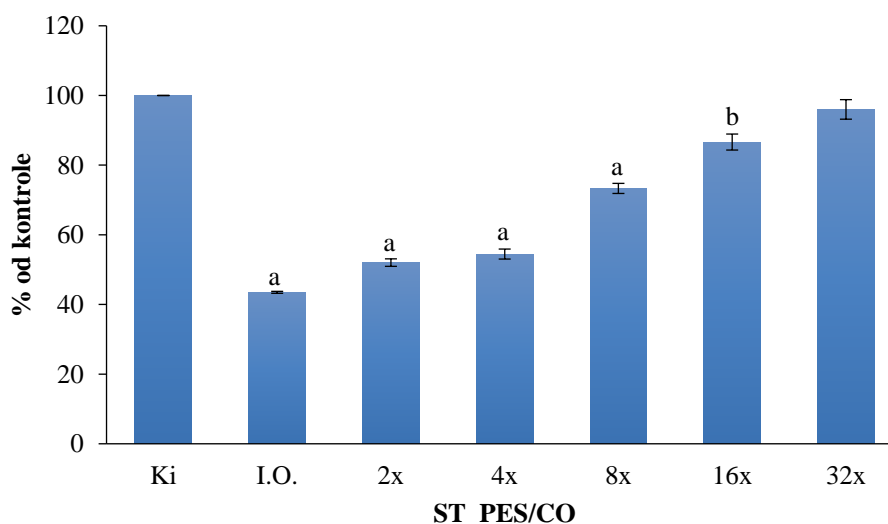
Statistički značajnim smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. UČINAK EKSTRAKATA IZOLIRANIH IZ POLIESTER/PAMUK TEKSTILIJA NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU HaCaT STANIČNE LINIJE ODREĐEN MTT METODOM

Citotoksični učinak različitih razrjeđenja (2x, 4x, 8x, 16x, 32x) ishodne otopine ST\_PES/CO (netretirana tekstilija poliester/pamuk) i ST\_PES/CO\_5W (netretirana tekstilija poliester/pamuk oprana pet puta) na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica određen je MTT metodom 72 h nakon tretmana i prikazan na slici 9 (ST\_PES/CO) i slici 10 (ST\_PES/CO\_5W).

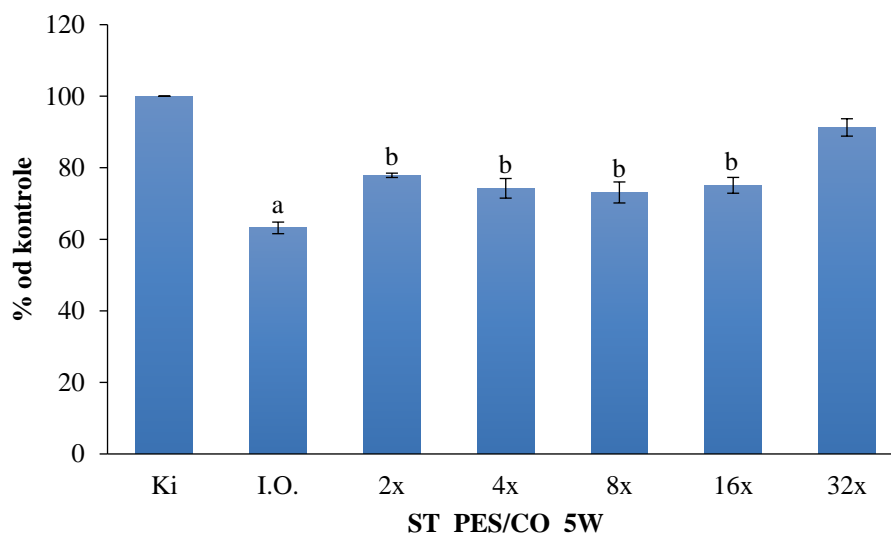
Na slici 9 vidljivo je da ishodna otopina ST\_PES/CO (I.O.) uzrokuje statistički značajno ( $p < 0,001$ ) smanjenje stanične vijabilnosti i proliferacije HaCaT stanica. Također, primijećeno je statistički značajno smanjenje vijabilnosti i proliferacije stanica za razrjeđenja 2 – 8x ( $p < 0,001$ ) te 16x ( $p < 0,005$ ). Iz Slike 9 vidljivo je da povećanjem razrjeđenja I.O. dolazi do smanjenja antiproliferativnog učinka na stanice. Vijabilnost stanica tretiranih ishodnom otopinom razrijeđenom 32x iznosila je 96,00 % u odnosu na kontrolni uzorak (Ki; netretirane stanice).



**Slika 9.** Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrjeđenjima (2x – 32x) ishodne otopine (I.O.) ST\_PES/CO tekstilije u odnosu na kontrolne uzorke (Ki) određena MTT metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p < 0,001$ , <sup>b</sup> $p < 0,005$ .

Na slici 10 vidljivo je da ishodna otopina ST\_PES/CO\_5W (I.O.) uzrokuje statistički značajno ( $p < 0,001$ ) smanjenje stanične vijabilnosti i proliferacije HaCaT stanica. Također, primijećeno je statistički značajno smanjenje vijabilnosti i proliferacije stanica za razrjeđenja 2 – 16x ( $p < 0,025$ ). Iz slike 10 vidljivo je da povećanje razrjeđenja I.O. dolazi do smanjenja

antiproliferativnog učinka na stanice. Vijabilnost stanica tretiranih ishodom otopinom razrijeđenom 32x iznosila je 91,27 % u odnosu na kontrolni uzorak (Ki).



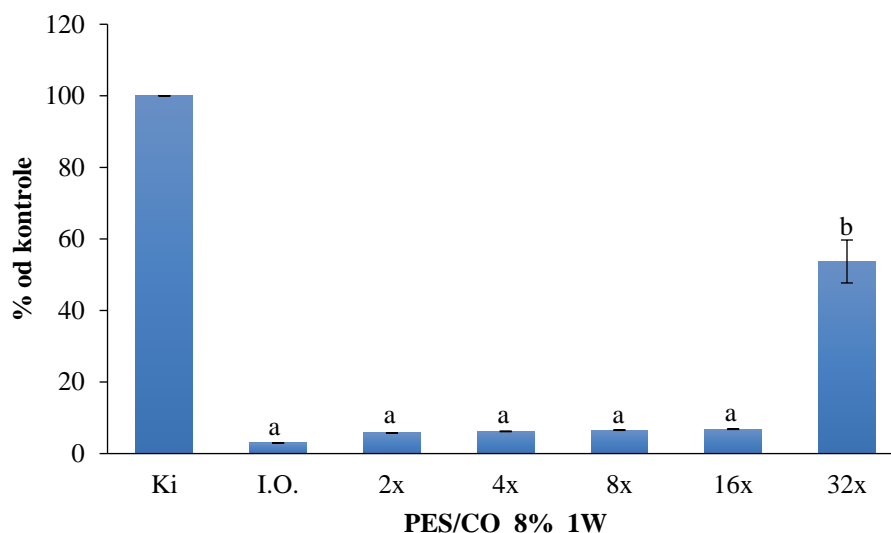
**Slika 10.** Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrjeđenjima (2x – 32x) ishodne otopine (I.O.) ST\_PES/CO\_5W tekstilije u odnosu na kontrolne uzorke (Ki) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p < 0,001$ , <sup>b</sup> $p < 0,025$ .

#### 4.2. UČINAK EKSTRAKATA IZOLIRANIH IZ POLIESTER/PAMUK TEKSTILIJA TRETIRANIH KITOZANOM NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU HaCaT STANIČNE LINIJE ODREĐEN *MTT* METODOM

Citotoksični učinak različitih razrjeđenja (2x, 4x, 8x, 16x, 32x) PES/CO\_8%\_1W, PES/CO\_8%\_5W i PES/CO\_8%\_10W (tekstilija poliester/pamuk s dodatkom 8% NaOH te oprana 1, 5 ili 10 puta, obrađena s 10 g L<sup>-1</sup> kitozana; 70 g L<sup>-1</sup> limunske kiseline; 65 g L<sup>-1</sup> natrijevog hipofosfita pentahidrata; 1 g L<sup>-1</sup> felosana NOP) na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica određen je *MTT* metodom 72 h nakon tretmana.

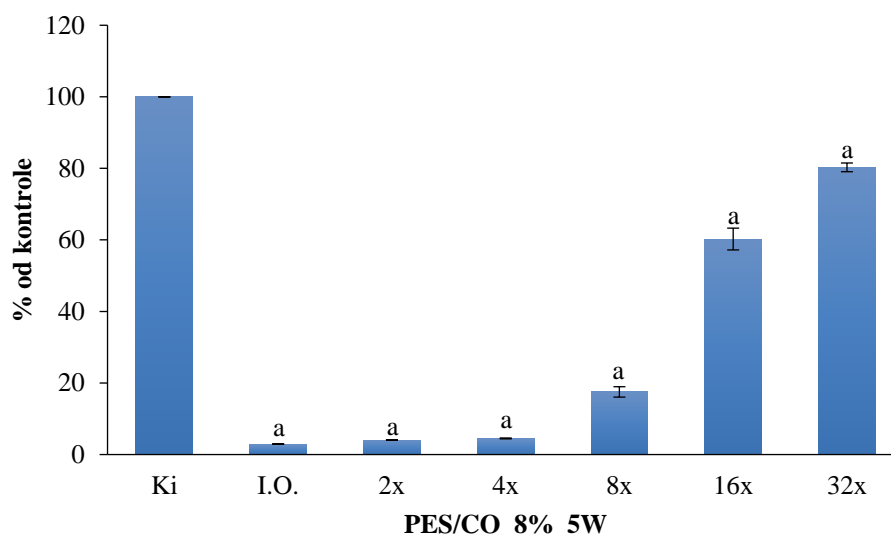
Tretman različitim razrjeđenjima (2x – 32x) ishodne otopine (I.O.) PES/CO\_8%\_1W utječe na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica te je učinak prikazan na slici 11. Statistički značajno ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,025$ ) smanjenje vijabilnosti i proliferacije stanica primijećeno je kod tretmana stanica I.O. te pri svim primijenjenim razrjeđenjima. Međutim, pri tretmanu stanica s najvećim razrjeđenjem (32x) uočava se poboljšana stanična vijabilnost te iznosi 53,69 % u odnosu na kontrolni uzorak (Ki).





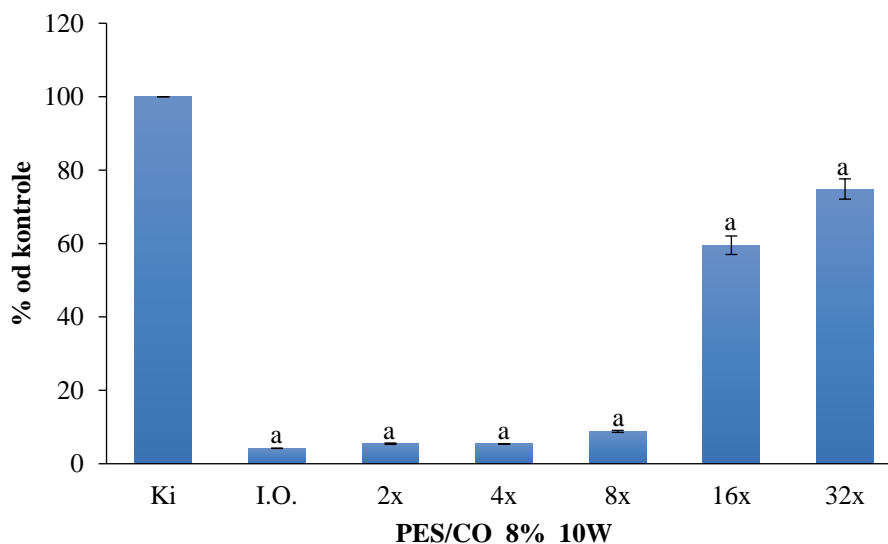
**Slika 11.** Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrjeđenjima (2x – 32x) ishodne otopine (I.O.) PES/CO\_8%\_1W tekstilije u odnosu na kontrolne uzorke (Ki) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup>p<0,001, <sup>b</sup>p<0,005.

Na slici 12 prikazan je učinak različitih razrjeđenja (2x – 32x) ishodne otopine PES/CO\_8%\_5W na proliferaciju i vijabilnost HaCaT stanica. Primijećeno je statistički značajno (p<0,001) smanjenje vijabilnosti i proliferacije stanica kod tretmana I.O. i svim razrjeđenjima. Porastom razrjeđenja uočava se poboljšanje u staničnoj vijabilnosti, a pri tretmanu s najvećim razrjeđenjem (32x) iznosi 80,28 % u odnosu na kontrolni uzorak (Ki).



**Slika 12.** Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrjeđenjima (2x – 32x) ishodne otopine (I.O.) PES/CO\_8%\_5W tekstilije u odnosu na kontrolne uzorke (Ki) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup>p<0,001.

Na slici 13 prikazan je učinak različitih razrjeđenja (2x – 32x) ishodne otopine PES/CO\_8%\_10W na proliferaciju i vijabilnost HaCaT stanica određen *MTT* metodom 72 h nakon tretmana stanica. Primijećeno je statistički značajno ( $p < 0,001$ ) smanjenje vijabilnosti i proliferacije stanica nakon tretmana I.O. i svim primijenjenim razrjeđenjima. Međutim, porastom razrjeđenja uočava se poboljšanje u staničnoj vijabilnosti, a pri tretmanu s najvećim razrjeđenjem (32x) iznosi 74,84 % u odnosu na kontrolni uzorak.



**Slika 13.** Vijabilnost HaCaT stanica 72 sata nakon tretmana različitim razrjeđenjima (2x – 32x) ishodne otopine (I.O.) PES/CO\_8%\_10W tekstilije u odnosu na kontrolne uzorke (Ki) određena *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p < 0,001$ .

Nema puno istraživanja i provedenih pokusa na ovu tematiku, međutim HaCaT stanična linija se koristi kao test sustav za ispitivanje proliferacije keratinocita u raznim testovima citotoksičnosti. Također, *MTT* metoda je široko rasprostranjena metoda u testovima toksičnosti, a HaCaT stanična linija i *MTT* metoda predstavljaju idealan sustav za određivanje vijabilnosti i proliferacije stanica nakon tretmana antimikrobnim agensima.

Wiegand i sur. (2010) proveli su istraživanje koje je proučavalo učinke kitozana ovisno o njegovoj molekularnoj masi na HaCaT staničnu liniju humanih keratinocita. Korištena metoda bazirala se na identifikaciji svjetla koje se emitiralo prilikom reakcije ATP-a s luciferazom i D-luciferinom. Istražen je utjecaj kitozana molekulske mase 120 kDa i kitozana molekulske mase 5 kDa na humane keratinocite. Uzorci kitozana pokazali su negativni učinak na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica. Učinak kitozana na vijabilnost stanica pokazao se ovisan o vremenu inkubacije, koncentraciji i molekularnoj masi. Kitozan molekulske mase 120 kDa

uzrokovao je značajno smanjenje stanica nakon inkubacije u trajanju od 2 h, dok je utjecaj kitozana molekulske mase 5 kDa kod koncentracije 1 % inhibirao proliferaciju HaCaT stanične linije za oko 40 %, nakon 24 h i za oko 50 % nakon 48 h, a koncentracija 0,5 %-tna nije imala skoro nikakav učinak na stanice (Wiegand, i sur., 2010).

Kako bi otkrili potencijalna citotoksičnost obojenih i završenih tekstilija, Klemola i sur. (2009) proveli su istraživanje na tri različita stanična sustava: i) hepa-1, ii) HaCaT, iii) spermiji. U sva tri slučaja stanice su bile izložene ekstraktima tekstilija. U testovima citotoksičnosti mjeran je rast stanica izloženih ekstraktu 72 h nakon tretmana koristeći otopine proteina u jažicama kao indikator. Ako je koncentracija proteina u jažicama bila manja od 80 % test dokazuje citotoksičnost. Test inhibicije motiliteta spermija dokazuje citotoksičnost ako je najmanje 25 % stanica mrtvo nakon tretmana. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da ekstrakti netretiranih tekstilija nisu citotoksični. Ekstrakt obojenih tekstilija pokazao je nisku citotoksičnost u testu inhibicije motiliteta spermija, međutim može se zaključiti da reaktivne boje ne uzrokuju štetne učinke (Klemola i sur., 2009).

Fanizza i sur. (2022) su primjenom *in vitro* testova procjenjivali biokompatibilnost pametnih tekstilija (razvijene kombinacijom inženjerstva, elektronike i nanotehnologije). *In vitro* testni sustav je HaCaT stanična linija te je vijabilnost stanica određena *MTT* metodom. Pametne tekstilije tretirane grafenskim nanopločicama (engl. *graphene nanoplatelets*, GNP) u testu na HaCaT staničnoj liniji pokazuju nikakav ili minimalan toksični učinak. *In vitro* humani keratinociti uzgojeni u izravnom kontaktu s pametnim tekstilijama sugeriraju da te tekstilije ne izazivaju upalne reakcije ili reakcije preosjetljivosti na ljudskoj koži (Fanizza i sur., 2022).

## 5. ZAKLJUČCI

1. HaCaT stanična linija humanih keratinocita predstavlja vjerodostojan modelni sustav za ispitivanje potencijalne citotoksičnosti antimikrobno obrađenih tekstilija.
2. *MTT* kolorimetrijska metoda predstavlja odgovarajuću metodu za određivanje stanične proliferacije i vijabilnosti HaCaT stanične linije nakon tretmana antimikrobno obrađenim tekstilijama.
3. Ekstrakti izolirani iz standarda poliester/pamuk tekstilija 72 h nakon tretmana pokazuje statistički značajno ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,005$ ,  $p < 0,025$ ) smanjenje vijabilnosti HaCaT stanica pri ishodnoj otopini te pri razrjeđenjima 2x – 16x. Povećanjem razrjeđenja ishodne otopine dolazi do smanjenja antiproliferativnog učinka na stanice.
4. Ekstrakti izolirani iz poliester/pamuk tekstilija tretiranih kitozanom, s dodatkom 8 % NaOH te oprana jednom, pet ili deset puta 72 h nakon tretmana pokazuje statistički značajno ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,005$ ) smanjenje vijabilnosti HaCaT stanica pri ishodnim otopinama te pri svim ispitanim razrjeđenjima 2x – 32x. Povećanjem razrjeđenja ishodne otopine dolazi do smanjenja antiproliferativnog učinka na stanice.

## 6. POPIS LITERATURE

Abd E, Yousef SA, Pastore MN, Telaprolu K, Mohammed YH, Namjoshi S i sur. (2016) Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clin Pharmacol* **8**, 163–176. <https://doi.org/10.2147/CPAA.S64788>.

Ates G, Vanhaecke T, Rogiers V, Rodrigues RM (2017) Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. U: Gilbert D, Friedrich O (ured.) Cell Viability Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Humana Press, New York, str. 19-26. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_2).

Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R (2012) Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol* **30(3)**, 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>

CLS (2022) HaCaT cell pellet. CLS – Cell Lines Service. <https://cls.shop/HaCaT/300493-main-product>. Pristupljeno 17. kolovoza 2022.

Fanizza C, Stefanelli M, Risuglia A, Bruni E, Ietto F, Incoronato F i sur. (2022) *In Vitro* and *In Vivo* Biocompatibility Studies on Engineered Fabric with Graphene Nanoplatelets. *Nanomaterials* **12(9)**, 1-19. <https://doi.org/10.3390/nano12091405>.

Gao Y, Cranston R (2008) Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles. *Text Res J* **78(1)**, 60-72. <https://doi.org/10.1177/0040517507082332>.

Grgurević MH (2019) Čimbenici djelotvornosti dermalnog pripravka (specijalistički rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Gulati R, Sharma S, Sharma RK (2021) Antimicrobial textile: recent developments and functional perspective. *Polym Bull* **79**, 5747-5771. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03826-3>.

Hodgson E (2010) A Textbook of Modern Toxicology, 4. izd., John Wiley & Sons, New Jersey.

Ibrahim A, Laquerre J, Forcier P, Deregnaucourt V, Decaens J, Vermeersch O (2021) Antimicrobial Agents for Textiles: Types, Mechanisms and Analysis Standards. U: Kumar B (ured.) Textiles for Functional Applications. IntechOpen, London, <https://doi.org/10.5772/intechopen.98397>.

Jain AK, Singh D, Dubey K, Maurya R, Mittal S, Pandey AK (2018) Models and methods for *in vitro* toxicity. U: Dhawan A, Kwon S (ured.) *In vitro* Toxicology, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 45-65.

Klemola K, Pearson J, Liesivuori J, Lindström-Seppä P (2009) Evaluating the toxicity of fabric extracts using the hepa-1 cytotoxicity test, the HaCaT cytotoxicity test and the spermatozoa motility inhibition test. *J Text Inst* **100(4)**, 330-337. <https://doi.org/10.1080/00405000701810278>.

Kmetič, I. (2016) Osnove toksikologije. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Kolle SN, Landsiedel R (2021) Human-Derived *In Vitro* Models Used for Skin Toxicity Testing Under REACH. *Handb Exp Pharmacol* **265**, 3-27. [https://doi.org/10.1007/164\\_2020\\_368](https://doi.org/10.1007/164_2020_368).

Krishna G, Goel S, Krishna KA (2014) Alternative animal toxicity testing and biomarkers. U: Gupta RC (ured.) Biomarkers in Toxicology, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 129-147.

McLafferty E, Hendry C, Farley A (2012) The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing Standard* **27(3)**, 35-42. <https://doi.org/10.7748/ns2012.09.27.3.35.c9299>.

Monteiro-Riviere NA (2010) Structure and function of skin. U: Monteiro-Riviere NA (ured.) Toxicology of the skin, Informa, Healthcare, New York/London, str. 1-19.

Morais DS, Guedes RM, Lopes MA (2016) Antimicrobial approaches for textiles: from

research to market. *Materials* **9(6)**, 498. <https://doi.org/10.3390/ma9060498>.

Ng WL, Yeong WY (2019) The future of skin toxicology testing - Three-dimensional bioprinting meets microfluidics. *Int J Bioprinting* **5**, 44-54. <https://doi.org/10.18063/ijb.v5i2.1.237>.

Pellevoisin C, Bouez C, Cotovio J (2018) Cosmetic industry requirements regarding skin models for cosmetic testing. U: Marques AP, Pirraco RP, Cerqueira MT, Reis RL (ured.) *Skin Tissue Models*, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 3-37. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810545-0.00001-2>.

Periolatto M, Ferrero F, Vineis C, Varesano A, Gozzelino G (2017) Novel Antimicrobial Agents and Processes for Textile Applications. U: Kumavath RN (ured.) *Antibacterial Agents*, IntechOpen, London. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68423>.

Pinho E, Magalhães L, Henriques M, Oliveira R (2011) Antimicrobial activity assessment of textiles: Standard methods comparison. *Ann Microbiol* **61(3)**, 493-498. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0163-8>.

Rogers JV, McDougal JN (2002) Improved method for *in vitro* assessment of dermal toxicity for volatile organic chemicals. *Toxicol Lett* **135**, 125-135. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00207-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00207-2).

Schaefer U, Hansen S, Schneider M, Contreras J, Lehr CM (2008) Models for Skin Absorption and Skin Toxicity Testing. U: Ehrhardt C, Kim KJ (ured.) *Drug Absorption Studies. Biotechnology: Pharmaceutical Aspects*, vol VII. Springer, Boston, str. 3-33. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74901-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74901-3_1).

Schmidt FF, Nowakowski S, Kluger PJ (2020) Improvement of a Three-Layered *in vitro* Skin Model for Topical Application of Irritating Substances, *Front Bioeng Biotechnol* **8**, 388. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00388>.

Segeritz CP, Vallier L (2017) Cell Culture: Growing Cells as Model Systems *In Vitro*. U: Jalali

M, Saldanha FYL, Jalali M (ured.) Basic Science Methods for Clinical Researchers, Elsevier, Cambridge, str. 151-172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>.

O'Hare S, Atterwill CK (1995) *In Vitro* Toxicity Testing Protocols. U: O'Hare S, Atterwill CK (ured.) Methods in Molecular Biology, str. 1-11. <https://doi.org/10.1385/0896032825>.

Soloneski S, Larramendy LM (2021) Introductory Chapter: Cytotoxicity. *Cytotoxicity - New Insights into Toxic Assessment*. IntechOpen, London. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99299>.

Stine KE, Brown TM (2015) Principles of Toxicology, 3. izd., Taylor and Francis Group, London.

Strober W (2019) Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* **111(1)**, A3.B.1.-A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>.

Sutterby E, Thurgood P, Baratchi S, Khoshmanesh K, Pirogova E (2022) Evaluation of *in vitro* human skin models for studying effects of external stressors and stimuli and developing treatment modalities. *VIEW* **3 (2)**, 1-19. <https://doi.org/10.1002/viw.20210012>.

Venus M, Waterman J, McNab I (2010) Basic physiology of the skin. *Surgery* **28**, 469-472. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2010.07.011>.

Wiegand C, Winter D, Hipler UC (2010) Molecular-weight-dependent toxic effects of chitosans on the human keratinocyte cell line HaCaT. *Skin Pharmacol Physiol* **23(3)**, 164-170. <https://doi.org/10.1159/000276996>.

Wilson VG (2013) Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes. *Methods Mol Biol* **1195**, 33-41. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2013\\_42](https://doi.org/10.1007/7651_2013_42).

Yun YE, Jung YJ, Choi YJ, Choi JS, Cho YW (2018) Artificial skin models for animal-free testing. *J Pharm Investig* **48**, 215–223. <https://doi.org/10.1007/s40005-018-0389-1>.



## **Izjava o izvornosti**

Ja Nikolina Račić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis