

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

**ZnO mikro- ja nanomaterjalidel põhinevate antimikroobsete pindade
tsütotoksilisuse testimine inimese keratinotsüütidega**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Helis Paas

Juhendajad: doktorant Alexandra Nefedova

professor Angela Ivask

TARTU 2025

INFOLEHT

ZnO mikro- ja nanomaterjalidel põhinevate antimikroobsete pindade tsütotoksilisuse testimine inimese keratinotsüütidega

ZnO on materjal, millel on laialdased kasutusvõimalused, mh antimikroobsetes rakendustes. Kasutus nt antimikroobsetes puutepindades tingib aga selle ilmse kokkupuute ka inimnahaga ning seetõttu on oluline tagada selliste pindade ohutu kasutamine. Üheks võimaluseks hinnata materjalide ohutust on toksikoloogilised testid inimese rakkudega *in vitro*. Käesolevas töös kasutati inimese keratinotsüüte hindamaks ZnO nano- ja mikromaterjalidel põhinevate antimikroobsete pindade tsütotoksilisust nende pindade imiteeritud kasutuse tingimustes 9 nädala jooksul. Selgus, et ühetunnise kokkupuute järel pinnad keratinotsüütidele toksilised ei olnud, kuid peale 24-tunnilist kokkupuudet ilmnis tsütotoksilisus. Samuti suurenes pindade tsütotoksilisus juba peale nende imiteeritud 6-nädalast kasutust. Seega on ZnO pindade kasutamisel kindlasti ohutu ühetunnine kokkupuude naharakkudega.

Märksõnad: ZnO nanomaterjalid, tsütotoksilisus, ISO 10993-5, inimese keratinotsüüdid

CERCS: B220 (Geneetika, tsütogeneetika), B740 (Farmakoloogia, farmakognoosia, farmaatsia, toksikoloogia)

Cytotoxicity testing of antimicrobial ZnO micro-and nanomaterial-based surfaces with human keratinocytes

ZnO is a material used in a wide range of areas, including antimicrobial applications. However, the use of ZnO, i.e. in antimicrobial touch surfaces, also results in its contact with human skin due to which it is important to ensure the safe use of such surfaces. One way to assess the safety of substances and materials is through toxicological tests carried out with human cells *in vitro*. In this work, human keratinocytes were used to assess the cytotoxicity of antimicrobial surfaces based on ZnO nano- and micromaterials under their simulated use over three months. It turned out that after one hour of exposure, the surfaces were not toxic to keratinocytes, but after 24 hours of exposure, cytotoxicity appeared. This observed cytotoxic effect increased starting from 6-week simulated used of the ZnO surfaces. Therefore, this study enables to claim the safety of one hour exposure of skin cells to ZnO surfaces.

Keywords: ZnO nanomaterials, cytotoxicity, ISO 10993-5, human keratinocytes

CERCS: B220 (Genetics, cytogenetics), B740 (Pharmacological sciences, pharmacognosy, pharmacy, toxicology)

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 ZnO materjalid.....	6
1.1.1 ZnO nanomaterjalide kasutusvõimalused.....	6
1.2. ZnO nanomaterjalidel põhinevad pinnad.....	9
1.3 <i>In vitro</i> tsütotoksilisuse testimise meetodid.....	9
1.1.3. Pindade tsütotoksilisuse testimise meetodid, ISO 10993-5.....	10
1.4 ZnO nanomaterjalide toksilisus imetajarakkudele.....	12
1.5 ZnO materjalidel põhinevate pindade tsütotoksilisus.....	13
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	16
2.1 Töö eesmärgid.....	16
2.2 Materjal ja meetodika.....	16
2.2.1 ZnO materjali kirjeldus.....	16
2.2.2 ZnO materjaliga kaetud pinnad ning kontrollpinnad.....	18
2.2.3 Tsütotoksilisuse testimine inimese keratinotsüütidega.....	20
2.2.3.1 Rakkude kasvatamine ja ettevalmistamine testiks.....	21
2.2.3.2 ZnO suspensiooni ja Zn ionide tsütotoksilisuse testimine.....	22
2.2.3.3 Pindade tsütotoksilisuse testimine kontakttestis.....	23
2.2.3.4 Pindade leotiste tsütotoksilisuse testimine.....	24
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	26
3.1. Maatriksiga kaetud teraspindade tsütotoksilisus.....	26
3.2 ZnO pindade tsütotoksilisus otsekontakttestis.....	27
3.3 ZnO pindade tsütotoksilisus leostamistestis.....	29
3.4 Zn ionide ning ZnO suspensioonide tsütotoksilisus.....	30
KOKKUVÕTE.....	33
KASUTATUD KIRJANDUS.....	36
LISAD.....	41

KASUTATUD LÜHENDID

ALD	(Atomic Layer Deposition) aatomkihtsadestamine
CAS	(Chemical Abstracts Service) registreerimisnumber keemilistele ainetele
DMEM	(Dulbecco`s Modified Eagle Medium) Dulbecco muudetud Eagle sööde imetajarakkude kasvatamiseks
FBS	(Fetal Bovine Serum) veise loote seerum
GRAS	(generally recognized as safe) Üldiselt turvalisena tunnustatud
HaCaT	inimese keratinotsüütide rakuliin, mis on spontaanselt immortaliseerunud
ISO	(International Organization for Standardization) Rahvusvaheline standardiorganisatsioon
MBE	(Molecular-beam epitaxy) Molekulaarkiire epitaksia
MS	(Magnetron Sputtering) magnetron (mikrolainete) sadestusmeetod
MTS	3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-5-(3-karboksümetoksüfenüül)-2-(4-sulfofenüül)-2H-tetrasoolium, metaboolse aktiivsuse määramiseks
MTT	3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüül-tetrasooliumbromiid, tiasolüülisiline
PBS	(Phosphate Buffered Saline) fosfaatpuhverdatud soolalahus
PCL	polükaprolaktoon, biolagunev plastik
PLD	(Pulsed Laser Deposition) pulseeritud laseriga sadestamine
Rpm	pööret minutis
SEM	skaneeriv elektronmikroskoop
SILAR	(Successive Ionic Layer Adsorption and Reaction) järjestikuste ioonikihtide adsorptsiooni ja reaktsiooni meetod
UV kiirgus	Ultraviolettkiirgus
UH	Ultraheli
WST-1	vees lahustuv tetrasooliumsool, reagent rakkude metaboolse aktiivsuse määramiseks

SISSEJUHATUS

ZnO mikro- ja nanoosakesed on looduslikud materjalid, mis on laialdaselt kasutusel väga erinevates valdkondades, kuid üks nende laialdane kasutusala on erinevad antimikroobsed tooted. Laialt on levinud ZnO kasutamine nii erinevates määretes kui ka pindadel eesmärgiga tõkestada mikroobide ellujäämist ja levikut. Enamus ZnO antimikroobseid kasutusi on seotud inimese lähikeskkonnaga ning seetõttu on väga tõenäoline, et nendega puutub ka kokku inimene. Sellest lähtuvalt on oluline olla teadlik selliste materjalide toksilisusest ja ohutusest juba rakkude tasandil.

Ainete ja materjalide rakkudele mõjuva toksilisuse ehk tsütotoksilisuse uurimiseks on mitmeid erinevaid meetodeid, mis reeglina viiakse läbi laboritingimustes *in vitro*. Enamik neist meetoditest kas loendab surnud rakke või mõõdab nt rakkude metabolismi aktiivsust peale uuritava aine või materjaliga kokkupuudet. Kui lahustunud ainete tsütotoksilisuse uurimiseks lisatakse uuritav aine sobivas kontsentratsioonis lihtsalt rakkude inkubatsioonikeskkonda, siis pindade tsütotoksilisuse kindlakstegemiseks on tarvis rakud ja pind kokku viia otsekontakttesti abil.

Käesoleva töö eesmärk oli viia läbi otsekontakttestid antimikroobsel eesmärgil valmistatud UVA valguse poolt aktiveeritavate ZnO nano- ja mikromaterjale sisaldavate pindade ja inimese keratinotsüütide vahel hindamaks nende pindade *in vitro* tsütotoksilisust. Selliste pindade tsütotoksilisuse uurimine oli üks osa katseseeriast, mille eesmärk oli selgitada välja ZnO materjalidel põhinevate pindade antimikroobsete ja füüsikalise-keemiliste omaduste muutus ajas intensiivse kasutuse tingimustes. Antud töö tulemused võimaldavad hinnata pindade ohutust inimesele ja selle muutumist imiteeritud kolmekuulise intensiivse kasutuse vältel. Lisaks otsekokkupuute testidele hinnati ka katse käigus ZnO või Zn ionide pindadelt leostumist kaudse tsütotoksilisuse testi abil. Samuti tehti kindlaks ka pindadele kaetud ZnO nano-mikroosakeste tsütotoksilisus ning võrdluseks analüüsiti ka Zn ionide toksilisus.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 ZnO materjalid

Viimastel aastakümnetel on nanotehnoloogia väga kiiresti arenenud ning ZnO nanomaterjalid ehk nanoosakesed on tänu oma rohketele rakendustele, keskkonnasõbralikkusele ja mitmekesistele füüsikalise-keemilistele omadustele palju tähelepanu omandanud (Zhang jt. 2013).

Nanomaterjalideks loetakse nii loodusliku kui ka inimtekkelise päritoluga materjale, mis koosnevad tahketest osadest, mille suurus vähemalt ühes dimensioonis jääb vahemikku 1-100 nm (Euroopa Liidu Komisjon 2022). Nanomaterjale iseloomustab suur eripind ning need võivad olla erineva kujuga (nt vardad, torud, kiud, kerad, plaadid jm) (Jin ja Jin 2021). Materjale, mille osakese suurus jääb vahemikku 0,1-100 μm nimetatakse mikromaterjalideks. Käesolevas töös kasutati kombinatsiooni ZnO nano- ja mikromaterjalidest.

ZnO on looduslikult esinev materjal ning looduses esineb peamiselt mineraalina tsinkiit. Tänapäevaks on teada kolm ZnO kristallvõre vormi: heksagonaalne vurtsiit ning kuubikujuline (sfaleriit ja kivisool) struktuur. Toatemperatuuril atmosfäärirõhu juures on termodünaamiliselt kõige stabiilsem ZnO vorm heksagonaalne vurtsiit. Sfaleriidi struktuur on metastabiilne ja nõuab stabiliseerimiseks kasvatamist kuubilise struktuuri alusel. Kivisoola struktuuriga tsinkoksiid moodustub ainult väga kõrgel rõhul 2 GPa juures (Rai jt. 2022; Moezzi jt. 2012).

1.1.1 ZnO nanomaterjalide kasutusvõimalused

Kuigi ZnO on levinud mineraal looduses, siis enamus tööstuses kasutusel olevast ZnO-st toodetakse sünteetiliselt. ZnO omab fotokatalüütilisi, antimikroobseid ning piesoelektrilisi omadusi. Kuna aga ZnO nanomaterjalil on võrreldes suuremate ZnO struktuuridega suurem eripind ning kõik eelnimetatud omadused on veelgi tähelepanuväärsemalt väljendunud, siis on ZnO nanomaterjal kasutusel mitmetes tööstuslikes rakendustes, nii tekstiilides, keraamikas kui gaasi- ja biosensorites. Näiteks põhinevad tsinkoksiidil glükoosi- ja kolesteroolisensorid, mida kasutatakse inimverest oluliste näitajate jälgimiseks ning kuna sealjuures on tegemist meditsiinilise rakendusega, siis peab olema tagatud ka materjali biosobivus ehk turvalisus inimesele juba rakkude tasandil (Ali jt. 2018; Moezzi jt. 2012; Zhang jt. 2013).

Tänu valguse neeldumisele UV piirkonnas on ZnO materjalil fotokatalüütilised omadused, mille olemasolu on näidatud isegi peale UV valguse väljalülitamist (Ali jt. 2018). ZnO materjali stabiilsust ja katalüütilisi omadusi on ära kasutatud nt veepuhastussüsteemides, et kontrollida kahjulike bakterite kasvu ning vähendada sellega vee kaudu levivate haiguste riski. Lisaks on tänu ZnO fotokatalüütilistele omadustele võimalik reovees lagundada erinevaid saasteaineid, nt kosmeetika, tekstiilide värvid, toitujätmed jm (Abou Zeid ja Leprince-Wang 2024; Alhashem jt. 2024).

Nii seoses ZnO fotokatalüütilisusega kui sellest materjalist vabanevate Zn ionidega on sel materjalil tõestatud ka antibakteriaalsed omadused. Nii on teada, et ZnO nanomaterjal pärsib nii grampositiivsete kui gramnegatiivsete bakterite kasvu, nt *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ja *S. enteritidis* (Choi jt. 2021; Mendes jt. 2022). Tänu oma antibakteriaalsetele omadustele on ZnO materjale kasutatud näiteks toiduainetööstuses toidupakendite ning teiste toiduga kokkupuutuvate materjalide, nagu näiteks lõikelaudade koostises (Pina jt. 2020). Lisaks on ZnO materjali katsetatud antibakteriaalse tekstiili valmistamisel, kus näidati, et 115 µg/ml ZnO nanomaterjalidega töödeldud tekstiil omas pärssivat mõju bakterile *S. aureus* (Matijaković Mlinarić jt. 2024). ZnO antibakteriaalseid omadusi on ka ära kasutatud selle materjali kasutuselevõtul nahainfektsioonide vastu nii põletikuvastasel kui antimikroobsel eesmärgil (Koupai jt. 2025). ZnO nanomaterjalid on kasutusel meditsiinis nt hambaravis nii implantaatide kui hambapasta koostises antimikroobse ja seenevastase lisandina (Pushpalatha jt. 2022). Samuti on ZnO nanomaterjalid kasutusel ravimite kohaletoimetamise süsteemides vähiravis, et suurendada halbadele rakkudele selektiivsust ja täpsust (Rani jt. 2024).

ZnO nanomaterjalid esinevad ka tätoveerimistintides, nt Bright Red (Solong Tattoo, Shenzhen, China), mille võimalikku tsütotoksilisust tutvustatakse järgnevas peatükis (Battistini jt. 2025). Põllumajanduses on ZnO kasutusel väetiste koostises, stimuleerides taimede juure ja varre kasvu ning seeläbi saagikust. Lisaks esinevad ZnO nanomaterjalid mitmetes igapäevatoodetes: värvide, hermeetikute ja patareide ning materjalide koostises: keraamika, klaas, tsement ja kumm (Raha ja Ahmaruzzaman 2022).

ZnO materjali sisaldavatel pindade ja pinnakatete kasutusvõimalused on sarnased ZnO materjali enda kasutusvõimalustega. Selliseid pindu on kasutatud nii meditsiinis kui toiduainetetööstuses ja mujal (**Tabel 1**).

Tabel 1. ZnO erinevad kasutusvõimalused

Kasutusvaldkond	Kirjeldus	Viide
Ravimi kohaletoimetamise süsteemid	ZnO kasutus on suunatud enamasti haavaravile ja nahainfektsioonide ning põletike vastu	(Prajapati jt. 2024)
Vähiravi	ZnO materjalid optimeerivad reaktiivsete hapniku vormide tootmist	(Ouyang jt. 2024; Tao jt. 2025)
Päikesekaitsekreem	ZnO materjalid pakuvad UV kaitset	(Zhang jt. 2024)
Perovskiidist päikeseptareid	ZnO neelab efektiivselt päikesevalgust	(Bhattarai 2024)
Biosensorid	ZnO materjalil põhinevad kreatiinisensor; uurea biosensor; SARS-CoV-2 viiruse antigeeni test; glükoosisensor; biosensor kopsu- ja rinnavähi ravimi Vinorelbine monitoorimiseks verest; NO ₂ sensor	(Ahmad ja Lee 2024; Karimi- Maleh ja Erk 2023; Kim jt. 2025; Naorem jt. 2025; Shahriyari jt. 2025; Viter jt. 2024)
Reoveepuhastus	ZnO abil on võimalik eraldada veest tekstiilvärve, mikroplasti, uraani, õli	(Attia jt. 2025; Jeyavani jt. 2024; Shi jt. 2025; Tian jt. 2011)
Antimikroobsed tooted	ZnO lisatakse kateetritele, hambaimplantaadi pinnakatetele, luuimplantaadi pinnakatele, luu täiteainesse, toidupakenditesse	(Kumari jt. 2022; Sorca jt. 2025; Zhang jt. 2018; Wang ja Gao 2021; Pina jt. 2020))
Leegiaeglustid puidule	ZnO võimaldab puidu pinnal süüte edasilükkamist ja seeläbi leegi leviku aglustamist	(Öhrn jt. 2023)
Väetised	ZnO suurendab saagikust ja kvaliteeti nt riisil.	(Wang jt. 2023)

1.2. ZnO nanomaterjalidel põhinevad pinnad

ZnO nanomaterjalide kasutusvõimaluste hulka kuulub ka nende osakeste immobiliseerimine pinnale ning selliste pindade kasutamine sarnaselt ZnO materjaliga kas katalüsaatoritena, päiksepaneelides, isepuhastuvate pindadena, või antimikroobsetes rakendustes, toiduainetetööstuses, meditsiinis või ka mujal (**Tabel 1**). Pindade katmiseks ZnO materjaliga kasutatakse mitmeid meetodeid, sh aatomkihtsadestamist (ALD), (sprei)kastmist, sool-geel meetod, magnetron (mikrolainete) sadestusmeetod (MS), pulseeritud laseriga sadestamine (PLD), keemiline sadestamine aurufaasist, Molekulaarkiire epitaksia (MBE), järjestikuste ioonikihtide adsorptsiooni ja reaktsiooni meetod (SILAR) jne. ZnO katteid on lisatud nt roostevabale terasele, klaasile, silikoonile, biolagunevale plastikule ja muudele pindadele (Borysiewicz 2019; Caballero-Güereca jt. 2023; Popescu jt. 2019; Pina jt 2020) (**Tabel 4**).

ZnO nanoosakesi on lisatud biolagunevale plastikule (PCL). ZnO sisaldavad PCL materjalid tehti erinevate ZnO kontsentratsioonidega: 5%, 10% ja 15% ning hinnati nii antimikroobsust kui ka tsütotoksilisust. Antimikroobsuse hindamiseks kasutati Gram-positiivset bakterit *S. Aureus*. Mikroobide kasvu vähendas märkimisväärselt juba 5% ZnO sisaldusega PCL, samas tsütotoksilist efekti see ei andnud (Pina jt. 2020).

ZnO on lisatud ka näiteks roostevabale terasele, et luua superhüdrofoobne materjal. Sellel materjalil on suurepärane kontroll vee ja õli eraldamise üle, mis sobib mitmetesse protsessidesse, kus on nõutav kontrollitud eraldamine või filtreerimine.

1.3 *In vitro* tsütotoksilisuse testimise meetodid

Kuna ZnO nanomaterjalid võivad esineda päris mitmetes inimesega kokkupuutuvate materjalide koostises, siis peab olema tagatud nende materjalide ohutus inimesele, mille eelduseks on toksilisuse testimine. Kõige laiemalt kasutatud võimalus ainete ohutuse hindamiseks inimesele on nende materjalide toksilisuse jälgimine inimese rakkudele *in vitro*. *In vitro* sisaldab endas kindlates loodud tingimustes katset elusorganismist pärit bioloogilise materjaliga, mis viiakse läbi väljaspool elusorganismi. Enamasti kasutatakse selleks erineval moel immortaliseeritud rakke või primaarsed, st otse organismist eraldatud rakke.

Toksilisust rakkudele *in vitro* tingimustes ehk tsütotoksilisust saab tuvastada erinevate meetoditega ning sobivaim meetod valitakse selektiivsuse, eeldatavate tulemuste, kokkupuute aja ja olemasolevate reagentide põhjal (**Tabel 2**). Toksilisust saab hinnata kas otseselt surnud rakkude loendamise või suremusprotsendi määramise abil, või kaudselt mingi mõõdetava rakkude elumuse või aktiivsuse parameetri järgi (Kamiloglu jt. 2020; Repetto jt. 2008; Riss jt 2019).

Tabel 2. Otsesed ja kaudsed meetodid tsütotoksilisuse uurimiseks

Otsesed meetodid	Kaudsed meetodid
<ul style="list-style-type: none"> Värvid, mis läbivad selektiivselt surnud rakke ning seonduvad DNA-ga: trüpaansinine (CAS 72-57-1), kongopunane (CAS 573-58-0), erütrosiin B (CAS 15905-32-5), propiidiiumjodiid (CAS 25535-16-4) jt. Raku tsütoplasma koostises oleva ensüümi laktaadi dehüdrogenaas vabanemise mõõtmine Radioaktiivse ⁵¹Cr (CAS 14392-02-0) lisamine elusatele rakkudele ja selle vabanemise mõõtmine 	<ul style="list-style-type: none"> Värvid, mis seonduvad selektiivselt elusate rakkudega: neutraalpunane (CAS 553-24-2), väävelhodamiin B(CAS 3520-42-1) Metaboolse aktiivsuse mõõtmine: MTT (tetrasoolium sool, CAS 298-93-1), MTS (tetrasoolium sool, CAS 138169-43-4), WST-1 (tetrasoolium sool, CAS 150849-52-8), Alamar Blue (resasuriin, CAS 153796-08-8)

1.1.3. Pindade tsütotoksilisuse testimise metoodikad, ISO 10993-5

Kui tavapärase tsütotoksilisuse testi puhul segatakse testitav aine lihtsalt rakkudega kokku, siis pindade testimise puhul peab tagama pinna ja rakkude vahel otsekontakti. Pindade tsütotoksilisuse testimise standardmeetodeid ei ole eriti palju. Antud töös tugineti ISO 10993 standardile, mille eesmärk on uurida meditsiinilisel otstarbel kasutatud materjalide ja pindade toksilisust. ISO 10993 alla kuulub 20 osa ning rida standardeid, mis pakuvad juhiseid hindamiseks materjalide biosobivust meditsiiniseadmetes. Standardi viies osa, ISO 10993-5:2009 „Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity“ sisaldab endas meetodeid proovide ettevalmistamiseks ja *in vitro* tsütotoksilisuse mõõtmiseks

eri tüüpi proovidel, sh kontaktpindadel ja vedelikuproovides, lisaks kirjeldab standard teste, mille käigus ei ole testitava proovi ja rakkude vahel otsest kontakti (**Tabel 3**).

Tabel 3. ISO 10993-5:2009 meetodid erinevat tüüpi proovidel tsütotoksilisuse määramiseks

	Vedelikuproov	Otsekontakttest	Mitte otsekontakti testid	
			Agari difusioon	Filtri difusioon
Proovi tüüp	Vedelik või tahke proovi leotis	Tahke proov	Tahke proov	Tahke proov
Lahjendus	Originaal-ekstrakt või lahjendus	Ei lahjendata	Ei lahjendata	Ei lahjendata
Rakud	Ühtlane rakususpensioon	Ühtlane rakususpensioon, proov peab katma 1/10 rakukihist	Ühtlane rakususpensioon, mis ei reageeri ega läbi agarit	Ühtlane rakususpensioon
Kvantitatiivne	+	+	-	-
Kvalitatiivne	+	+	+	+
Ajapunkt	Miinimum 24 h	Miinimum 24 h	24-72 h	2 h ± 10 min

Järgnevalt on kirjeldatud ISO 10993-5:2009 standardi nõudeid, millele antud töö ka vastab.

- Rakud peavad saavutama katseks umbes 80%-lise konfluentsuse ehk olema logaritmilises kasvufaasis.
- Test peab sisaldama positiivset kontrolli, mis annab tsütotoksilise vastuse, ning mis peab korduvatel katsetel tootma sama tulemuse.
- Testis peab olema bioloogilise materjalita kaev, nt destilleeritud vesi äärmistes kaevudes, mis ei sisalda rakke ega proovimaterjali.
- Testis peab olema negatiivne kontroll, nt rakud söötmes, mis ei anna tsütotoksilist vastust.

- Nii proove kui kontrolle peab testima vähemalt kolmes korduses. Kontrollid tuleb valida nii, et neid saab ettevalmistada samamoodi nagu proove.

Loomsete rakkude kasvatamiseks sobib kas seerumiga või seerumivaba sööde. Seerumit sisaldava söötme puhul ei tohiks rakkude kasvutemperatuur ületada (37 ± 1) °C. Sobivaks tingimuseks on (24 ± 2) tundi ja (37 ± 1) °C, et oleks tagatud söötme steriilsus ja koostisosade stabiilsus. CO₂ vajalikkus inkubaatoris otsustatakse vastavalt tingimustele ja raku söötmele. Eri kujude, suuruste või füüsikaliste omadustega (vedel, tahke, geeljas) materjale võib tsütotoksilisuse analüüsis kasutada ilma modifikatsioonideta, sealjuures peab säilima söötme pH vahemikus 7,2-7,4. Antibiootikume võib kasutada, kui need ei mõjuta teste.

ISO 10993-5 standardi järgi loetakse tsütotoksiliseks proovid, mis vähendavad rakkude eluvõimet rohkem kui 30% võrreldes negatiivse kontrolliga. Samuti seab standard nõude testi kvaliteedile nii, et kui esineb suuri erinevusi sama proovi tulemustes, siis on kas test sobimatu või tulemused puudulikud. Samuti kui negatiivne ja positiivne kontroll ei anna oodatud tulemusi, tuleb kogu katse korrata. Kuigi ISO 10993-5 test pakub standardiseeritud moodust tsütotoksilisuse sh pindade tsütotoksilisuse testimiseks, võib sellel meetodil esineda ka erinevaid katsumusi. Sellisteks on mitmetimõistetavus, ajakulukus, alternatiivide vähesus ja rahaline kulukus ning standardite uuenemine (Sharma ja Luthra 2023).

1.4 ZnO nanomaterjalide toksilisus imetajarakkudele

Kuigi USA toidu ja ravimiamet (*Food and Drug Agency*, FDA) on klassifitseerinud ZnO kui GRAS materjali (*generally recognized as safe*), siis on ikkagi teada, et sellel materjalil võivad olla tsütotoksilised omadused (Akbar ja Sadiq 2021). On leitud, et ZnO nanomaterjalid mõjutavad erinevaid inimese rakke erinevalt. Näiteks ei omanud 24 tunnine inkubatsioon kuni 50 µg/ml ZnO nanoosakestega mingit mõju inimese keratinotsüütidele (HaCaT). Samas fibroblastidele mõjusid sellised ZnO materjalide kontsentratsioonid toksiliselt (Battistini jt 2025). Primaarsetele inimese keratinotsüütidele mõjus ZnO toksiliselt juba kontsentratsioonis 10 µg/ml. Madalamate kontsentratsioonide puhul, nt tätoveerimistindi Bright Red (Solong Tattoo, Shenzhen, China) puhul, mis sisaldab 0,5 µg/g ZnO nanoosakesi, HaCaT rakkudele toksilisust ei tuvastatud.

Lee jt., 2014 katses leiti, et inimese immortaliseerunud keratinotsüütidele ei mõjunud 24 tunnise inkubatsiooni järel samuti toksiliselt 5-10 µg/ml ZnO nanoosakesi ning IC₅₀ väärtuseks (pool-inhibeeriv kontsentratsioon ehk kontsentratsioon, mis kahandab rakkude aktiivsust 50% võrra) oli 41,7±3 µg/ml (Lee jt. 2014).

Mõned uuringud on näidanud ka ZnO nanomaterjalide selektiivset mõju vähirakkudele. Näiteks kui 49 tunnises inkubatsioonis mõjus eesnäärmevähi rakkudele (PC3) tsütotoksiliselt juba 20 µg/ml ZnO nanoosakesi, siis tervetele epiteelrakkudele (RWPE-1) mõjusid ZnO osakesed toksiliselt alles alates kontsentratsioonil 50 µg/ml (Yadav jt. 2022). Sarnaselt RWPE-1 rakkudele mõjus ka loote kopsu fibroblastidele tsütotoksiliselt 50 µg/ml ZnO kontsentratsioon (Abdel-Gawad jt. 2024). Glioblastoomi rakkudele (U87) saavutati ZnO nanoosakeste IC₅₀ 290 µg/ml kontsentratsiooni juures (Hamidian jt. 2023).

ZnO toksilisuse taga imetajarakkudele on reeglina materjalist vabanevad Zn ioonid ning neistioonidest moodustunud reaktiivsed hapniku vormid (Vasile jt. 2015). On ka teada, et ZnO tsütotoksilisus sõltub ZnO osakeste suurusest nii, et väiksemad osakesed on toksilisemad, kuna väiksemad suudavad rakumembraani lihtsamalt läbida (Ali jt. 2018). Lisaks osakese suurusele sõltub ZnO tsütotoksilisus üsna oodatavalt ka osakeste kontsentratsioonist. Näiteks on demonstreeritud, et 48 tunnise kokkupuute järel saavutati 50% inimese kopsurakkude (A549) inhibitsioon 68,47 µg/ml juures, kui tegemist oli 20 nm diameetriga ZnO osakestega ning 150,78 µg/ml juures, kui tegemist oli 70 nm osakestega (Baek jt. 2011).

ZnO puhul on sageli tegemist olukorraga, kus sellel materjalil on mingi teine soovitud omadus, nt antimikroobne toime ning materjali kasutamiseks peab see soovitud mõju avalduma enne seda, kui ZnO rakkudele toksiliseks muutub. Selle näitena võib tuua biolagunevasse plastikusse (PCL) immobiliseeritud ZnO nanomaterjali, mille puhul 5% ZnO sisaldusega PCL andis antimikroobse efekti, kuid rakkudele toksiline ei olnud. Seevastu 10% ja kõrgemat ZnO kontsentratsiooni sisaldav plastik mõjus tsütotoksiliselt ja selgelt oli tuvastatav rakkude lüüsumine (Pina jt. 2020).

1.5 ZnO materjalidel põhinevate pindade tsütotoksilisus

ZnO materjalidel põhinevate pindade ohutuse tagamiseks on uuritud nii pindade selliste pindade kui ka pindade leotiste (pindade 24 tunni leostamise tulemusel saadud leotised) mõju imetajarakkudele (**Tabel 4**).

Tabel 4. ZnO materjali sisaldavate pinnakatete tsütotoksilisus

Aluspind, millele ZnO kaeti	Rakud, mille vastu toksilisust testiti	Kokkupuuteaeg	Rakkude elumus, %	Viide
Otsekontakttestid				
Räni	Inimosteosarkoomi rakuliin (MG-63)	24 tundi	≤30%	(Milisav jt. 2025)
20 nm ja 100 nm nanopoorised alumiiniumoksiid membraanid	Makrofaagid (RAW 264.7)	24 tundi; 48 tundi	24 tundi: 100% 48 tundi: 35% (20 nm pooridega pind); 46% (100 nm pooridega pind)	(Petrochenko jt. 2013)
Räni	Makrofaagid (RAW 264.7)	24 tundi; 48 tundi	24 tundi: 56,6% 48 tundi: 46,5%	(Petrochenko jt. 2014)
Räni	Hiire fibroblastid (L929)	24 tundi	<50%;	(Lewinski jt. 2018)
GaN/c-safiirist (Al ₂ O ₃) alus	Hiire fibroblastid (L929)	24 tundi	<75%	(Lewinski jt. 2018)
Pindade leotised				
Räni	Makrofaagid (RAW 264.7)	24 tundi	11,4%	(Petrochenko jt. 2014)
GaN/c-safiir (Al ₂ O ₃)	Hiire fibroblastid (L929)	24 tundi	100%	(Lewinski jt. 2018)
Räni	Hiire fibroblastid (L929)	24 tundi	100%	(Lewinski jt. 2018)

Sarnaselt ZnO materjalidele on demonstreeritud ka ZnO kattega pindade tsütotoksilisi omadusi. Näiteks kahandas impulsslasersadestuse meetodil ränipindadele viidud 96 nm kiht 59 nm ZnO osakesi makrofaagide elumust 56,6%-ni 24 tunnise inkubatsiooni järel ning 46,5%-ni 48 tunnise inkubatsiooni järel (Petrochenko jt. 2014). Huvitavalt olid toksilised ka nende pindade leotised nii, et makrofaagide elumusest jäi 24 tunnise kokkupuute järel alles vaid 11%. Lewinski jt (2018) näitasid, ZnO materjaliga kaetud räni ja GaN/c-safiirist pinnad kahandasis hiire fibroblastide L929 elumust 25-50%, kuid nende pindade leotised toksilised ei olnud. Katseid on tehtud ka näiteks roostevaba terasega, mida katab bioaktiivne klaas erineva ZnO sisaldusega

(5-20%) ning katted olid lisatud elektroforeetilisel sadestamisel (Heidari Laybidi jt. 2023). Peale 24 tundi kokkupuudet inimese osteosarkoomi rakkudega (MG63) ei mõjunud mitte ükski pind toksiliselt ning MTT testi tulemused näitasid, et ZnO katted roostevabal terasel on kasutatud rakkudele ohutu. Selles artiklis uuriti ka ZnO pindade korrosiooni ajas ning leiti, et mida kõrgem oli pinnas olen ZnO sisaldus, seda suurem oli ka korrosiooni tekke võimalus, ent siiski säilis pindade mittetoksilisus osteosarkoomi rakkudele (Heidari Laybidi jt. 2023). Kuna tulemused on siiski varieeruvad on vajalikud korduvad testimised erinevates tingimustes.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

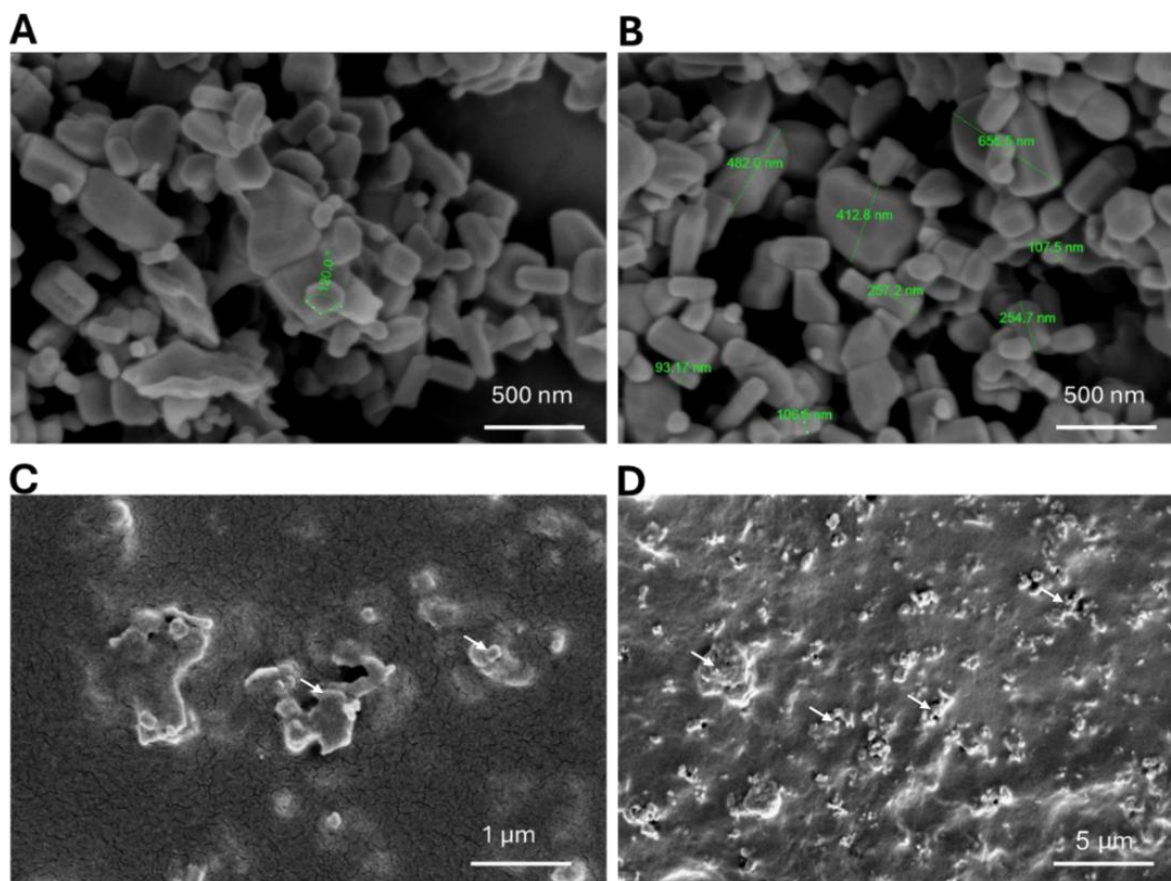
Käesoleva töö eesmärk oli viia läbi ISO 10993-5 meetodile vastavad otsekontakttestid antimikroobsel eesmärgil valmistatud UVA valguse poolt aktiveeritavate ZnO nano- ja mikromaterjale sisaldavate pindade ja inimese immortaliseerunud keratinotsüüdide rakuliini HaCaT rakkude vahel hindamaks nende pindade *in vitro* tsütotoksilisust. Selliste pindade tsütotoksilisuse uurimine oli üks osa katseseeriast, mille eesmärk oli selgitada välja ZnO materjalidel põhinevate pindade antimikroobsete ja füüsikalis-keemiliste omaduste muutus ajas intensiivse kasutuse tingimustes. Hüpotees oli, et ZnO pindade omadused ning ka tsütotoksilisus muutub intensiivse kasutuse tingimustes, kuna valitud kasutustingimused võiksid mõjutada pinna omadusi ja neisse immobiliseeritud ZnO osakeste stabiilsust. Seetõttu hinnati lisaks otsekokkupuute testidele ka ZnO või Zn ionide pindadelt leostumist kaudse tsütotoksilisuse testi abil. Samuti tehti kindlaks ka pindadele kaetud ZnO nano-mikromaterjali tsütotoksilisus ning võrdluseks analüüsiti ka Zn ionide toksilisust.

2.2 Materjal ja metoodika

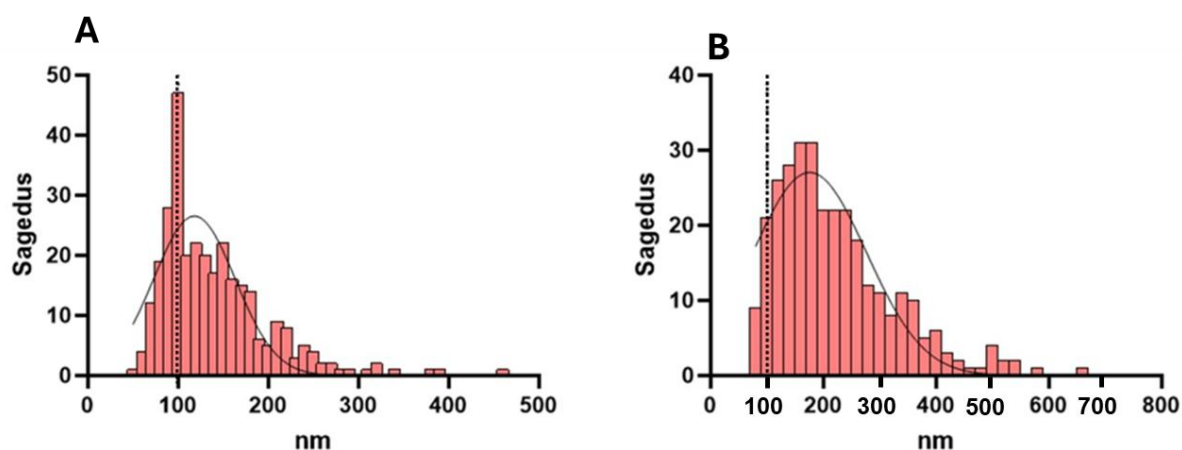
2.2.1 ZnO materjali kirjeldus

Eksperimentides kasutatud ZnO oli Sennelier Zinc White pigment, värvi kood PW4, tootja Max Sauer SAS, Prantsusmaa. Skaneeriva elektronmikroskoobi (SEM) fotod tegi TÜ füüsika instituudis Mati Kook FEI Nova NanoSEM 450 seadme abil 3kV juures.

SEM fotode järgi (**Joonis 1**) koosneb ZnO peamiselt 50-650 nm suurustest vardakujulistest osakestest. 103/310 mõõdetud osakese üks mõõde oli alla 100 nm, mistõttu võiks öelda, et kasutatud ZnO materjal koosnes 33% nanoosakestest, kusjuures ülejäänute mõõtmed jäid mikroosakeste piiridesse (**Joonis 2 ja Lisa 1**).



Joonis 1. Skaneeriva elektronmikroskoobi fotod ZnO mikro- ja nanoosakestest (A-B) ja nendest valmistatud pinnakatetest (C-D). Fotod on näidatud erinevate suuruskaaladega. Fotodel A ja B (100 000 x suurendus) on näha osakeste kuju ja suurus. Fotodel C (50 000 x suurendus) ja D (10 000 x suurendus) on näha pinnakatetest välja ulatuvad ZnO osakesed (märgistatud valgete nooltega). Fotode autor: Mati Kook, TÜ füüsika instituut.



Joonis 2. ZnO osakeste jaotus. Osakeste lühem külg (A), osakeste pikem külg (B). Vertikaalse joonega on tähistatud 100 nm piir. 310 osakese suurused mõõdeti skaneeriva elektronmikroskoobi fotodelt (Lisa 1) programmiga ImageJ ja sagedusjaotus tehti programmiga GraphPad.

2.2.2 ZnO materjaliga kaetud pinnad ning kontrollpinnad

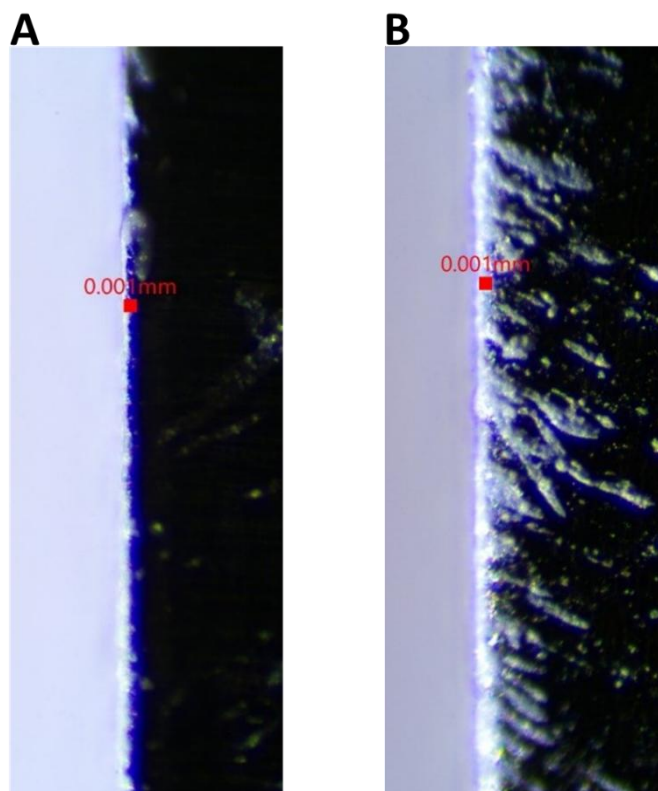
ZnO materjali sisaldavad pinnakatted 2 mm paksustele teraskupongidele valmistas Mati Kook TÜ füüsika instituudist.

Tabel 6. Katsetes kasutatud pinnad.

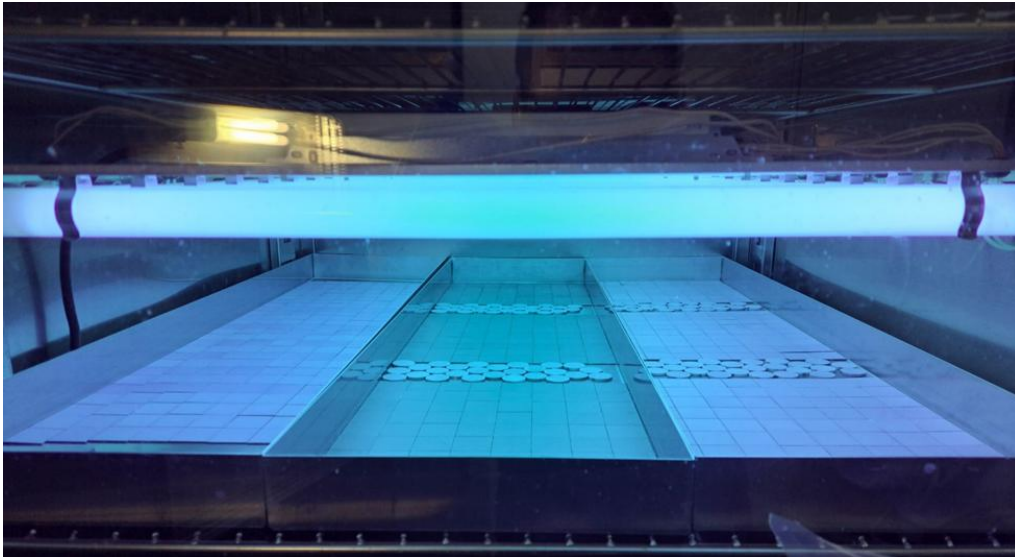
Pind	Tähis	Kirjeldus
Teras	Teras	2 cm läbimõõduga, 2 mm paksusega roostevaba teras (AISI 304L, koostis 18% kroom, 8% nikkel, 1,4% mangaan; 2B pinnatöötlus)
	M	Roostevaba terase (AISI 304L) pinnad kaeti nakkuvuse parandamiseks kruntvärviga, seejärel ühekomponentse veepõhise akrülaatlakiga ehk akrülaatmaatriksiga. Pinnad kuivatati õhu käes 2 tundi, seejärel ahjus 60°C juures 24 tundi.
Maatriks	M_0	Kuivatatud maatrikspinnad keedeti 2 tunni jooksul 96%-lises etanoolis, et akrülaatlaki polümeriseerumine lõpetada.
	M_3v	M_0 pinnad, mille 3-nädalast kasutust imiteeriti UVA all
	M_6v	M_0 pinnad, mille 6-nädalast kasutust imiteeriti UVA all
	M_9v	M_0 pinnad, mille 9-nädalast kasutust imiteeriti UVA all
ZnO kattega pind	ZnO	Roostevaba terase (AISI 304L) pinnad kaeti nakkuvuse parandamiseks kruntvärviga, seejärel ühekomponentse veepõhise akrülaatlakiga, millesse oli segatud 12% ZnO nano- ja mikromaterjali. Viskoossuse vähendamiseks lisati ka 20% H ₂ O, kuna ZnO käitub paksendajana. 1-2 µm ZnO kiht kanti pinnale värvipüstoliga (Gerko Smart Performance HVLP mini).
	ZnO_0	Kuivatatud ZnO kattega pinnad keedeti 2 tunni jooksul 96 %-lises etanoolis.
	Zn_3v	ZnO_0 pind, mille 3-nädalast kasutust imiteeriti UVA all
	Zn_6v	ZnO_0 pind, mille 6-nädalast kasutust imiteeriti UVA all
	Zn_9v	ZnO_0 pind, mille 9-nädalast kasutust imiteeriti UVA all
Vaskpind	Vask	Positiivse kontrollina kasutati 99% vaskpindasid läbimõõduga 2 cm ja paksusega 1 mm.

ZnO pinnad valmistati 12% ZnO nano-mikroosakeste pulbri sisse segamisel akrülaatmaatriksisse (Kiva 10, Tikkurila) ning selle pihustamisel HVLP värvipüstoliga abil (Gerko Smart Performance HVLP mini) eelnevalt krunditud (Otex Akva, Tikkurila) roostevabale terasele (AISI 304L, Aperam-Stainless) (**Tabel 6**). **Joonis 3A** näitab roostevaba terase pindadele kaetud ZnO pinnakatte paksust (umbes 1 μm).

Pindade intensiivse kasutuse imiteerimiseks inkubeeriti neid pindu UVA valguse käes (315 - 400 nm valguse intensiivsusega 10 W/m²) (**Joonis 4**) kliimakambris. UVA käes inkubeerimine valiti seetõttu, et need ZnO pinnad on UVA abil aktiveeritavad ning just sellise valguse all avaldub nende antimikroobne potentsiaal enim. ZnO pindadele kontrolliks valmistati ainult akrülaatmaatriksiga kaetud pinnad, mida inkubeeriti UVA valguse käes sarnaselt ZnO pindadele. Lisaks kasutati kontrollina puhas roostevaba terase pinda ning positiivse kontrollina vasepinda (99% vask Metroprint OY).



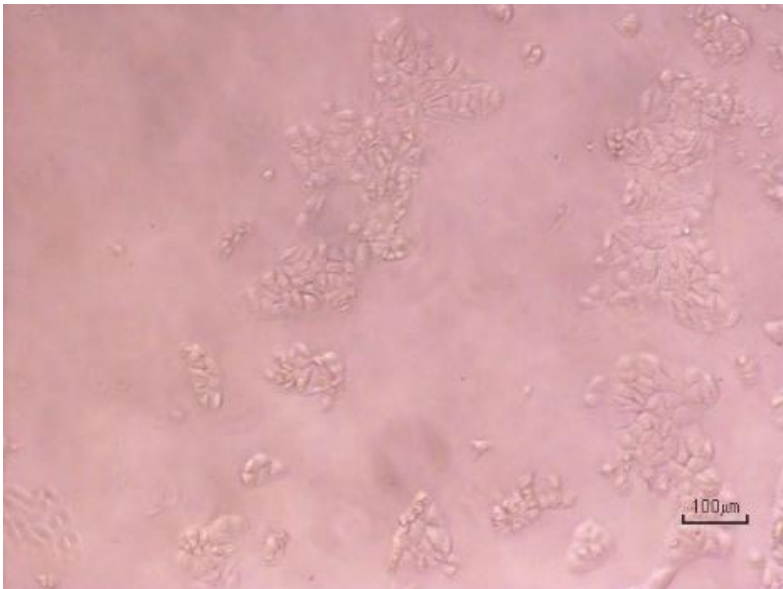
Joonis 3. Teraspind ZnO kattega (A) ja maatrikspind (B) valgusmikroskoobis. Pildi autor: Mati Kook, TÜ füüsika instituut.



Joonis 4. Kliimakamber. Pildi autor: Mati Kook, TÜ füüsika instituut.

2.2.3 Tsütotoksilisuse testimine inimese keratinotsüütidega

Katsetes kasutati rakuliinina inimese immortaliseerunud keratinotsüüte (HaCaT; DKFZ, Heidelberg). Immortaliseerunud keratinotsüüdid säilitavad oma funktsiooni ka pärast mitmekordseid jagunemisi ja seega sobivad inimese rakkude uurimiseks hästi (Boukamp jt. 1988). Antud rakud pärinevad inimese histoloogiliselt tervest nahast ning rakkude mõõtmed jäävad vahemikku 20-30 μm (**Joonis 5**).



Joonis 5. HaCaT keratinotsüütide rakud valgusmikroskoobis. Pildi autor: Alexandra Nefedova.

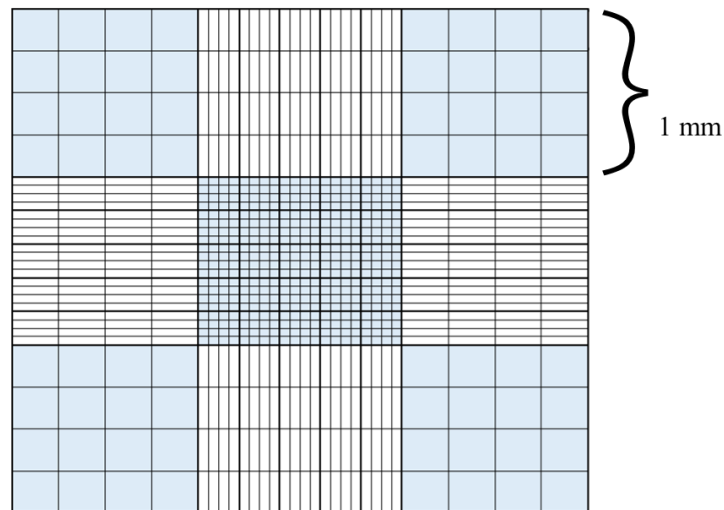
2.2.3.1 Rakkude kasvatamine ja ettevalmistamine testiks

Rakkude kasvatamiseks kasutati söödet, mille valmistamiseks kasutati DMEM söödet 4,5 g/l glükoosi ja L-glutamiiniga (Corning), millele oli lisatud 56°C juures 30 minuti jooksul inaktiveeritud veise loote seerumit (FBS) (PAN Biotech) ning 10,000 ühikut/mL penitsilliini ja 10,000 µg/mL streptomütsiini (Gibco). Rakud (8 korda jagatud) säilitati vedelas lämmastikus -80°C juures. Enne katset sulatati rakud 37°C vesivannis (K₂Cr₂O₇ vesilahus) 30 sekundi jooksul, peaaegu täieliku sulamiseni, lisati 10 ml söödet ning tsentrifugeeriti 1000 rpm 21°C juures 5 minutit. Seejärel eemaldati supernatant, rakud suspendeeriti 1 ml söötmes ning lisati koos 10 ml söötmega 10 cm läbimõõduga Petri tassi. Rakke kasvatati kogu eksperimendi jooksul koekultuuri laboris temperatuuril 37°C niisutatud inkubaatoris 5% CO₂ sisalduse juures. Rakke jagati iga 2-3 päeva tagant, kui oli saavutatud ~ 80%-line konfluentsus.

Enne tsütotoksilisuse katset koguti rakud vajalikus tiheduses, selleks töödeldi rakke umbes 80% täis kasvanud ja eelnevalt PBS puhviga pestud Petri tassis 2 ml eelsoojendatud 0,05% trüpsiiniga PBS-s (pH 7,0-7,6) (PAN-Biotech). Rakke inkubeeriti 37°C juures 10-12 minutit, misjärel kontrolliti mikroskoobiga, et rakud oleksid osaliselt lahti ja hõljuksid. Seejärel lisati tsentrifugeeritud 30 ml söödet, vabastati võimalikult palju rakke ning need loendati. Loendamiseks värviti rakud 0,4% trüpaansinisega (Thermo Fisher) 1:1 suhtes ja loendades hemotsütomeetri ühes kambris, kus siniselt värvunud rakud on surnud, sest olid värvil läbilaskvad, ning värvumata rakud on elus, kuna nende membraan on terve. Valgena paistvaid rakke loendati joonisel viielt sinisega märgitud alalt (**joonis 6**) ning arvutati rakkude tihedus (arv/ml). Tsütotoksilisuse katses kasutati 2-2,5×10⁵ kontsentratsiooniga rakususpensiooni ning sellist suspensiooni lisati 96-kaevulise plaadi kaevudesse 100 µl (seega 6,3-7,8×10⁴ rakku cm² plaadi põhjapinna kohta) või 12-kaevulise plaadi kaevudesse 1 ml (seega 5,7-7,1×10⁴ rakku plaadi põhjapindala kohta). 96-kaevulise plaadi puhul ei täidetud kõiki kaevusid rakususpensiooniga, vaid äärmistesse kaevudesse lisati 100 µl destilleeritud vett, et vältida rakkude kuivamist. Rakususpensioon lisati 60 sisemisse kaevu. Ettevalmistatud mikroplaate kasvatati 24 tunni jooksul 37°C juures 5% CO₂ sisaldusega inkubaatoris, et neid seejärel toksilisuse testis kasutada.

$$\text{Elusate rakkude arv milliliitris} = \frac{\text{Loetud elusate rakkude arv}}{\text{Loetud suurte ruutude arv}} \times \text{lahjendustegur} \times 10,000$$

Lahjendustegur on 2, kui rakkude suspensioon on segatud värviga 1:1, s.t. lahjendatud pooleks.



Joonis 6. Hemotsütomeeter. Sinisel taustal on näidatud väljad, millelt loeti rakkude arvukused.

2.2.3.2 ZnO suspensiooni ja Zn ionide tsütotoksilisuse testimine

Töös kasutati põhimõtteliselt kahte erinevat meetodit tsütotoksilisuse määramiseks: vedelikutesti ning pinna otsekontakttesti. ZnO suspensioonide ning Zn ionide toksilisust määrati vedelikutestis, mis viidi läbi 96-kaevulistel plaatidel. Selleks valmistati 2000 mg/ml (25 mM) kontsentratsiooniga ZnO lahus söötmes ja sellest valmistati söötmes lahjendused (5 – 2000 mg/ml). Zn ionide allikana kasutatud tsinkatsetaadi ($Zn(OAc)_2$) lahus valmistati söötmes kontsentratsiooniga 4530 mg/l (sarnaselt ZnO suspensiooniga 25 mM) ja sellest valmistati söötmes lahjendused (1,8 – 4530 mg/ml). 96-kaevulistes mikroplaatides kasvanud rakkudelt eemaldati sööde ning lisati ZnO ja $Zn(OAc)_2$ lahjendused. Negatiivseks kontrolliks olid rakud söötmes ning sellistesse kaevudesse lisati Zn ühendi asemel sööde. Rakke inkubeeriti seejärel kas 1 tundi või 24 tundi 37°C juures 5% CO₂ sisaldusega inkubaatoris. Inkubatsiooni järel eemaldati rakkudelt sööde või sööde koos Zn ühendiga ja lisati neutraalpunase (Thermo Fisher) lahus DMEM-is, mis oli saadud 4 mg/ml neutraalpunase lahuse 1:100 lahjendamise teel. Neutraalpunane on nõrgalt katioonne, fluorestseeruv värv, mis läbib elusrakkude plasmamembraani. Värv jääb püsima elusrakkude lüsoosoomides, kuna neis on lüsoosoomi sisekeskkonna pH piisavalt madal, et värvi kinni hoida. Enne rakkude värvimist tsentrifuugiti värvilahust 10 min 1800 rpm 21°C, et värvikristallid sadestuksid. Värvilahus viidi uude anumasse, et tekkinud sadet mitte puutada, sest värvikristallid võivad mõjutada mõõtmistulemusi. 96-kaevulisse mikroplaati lisati rakkudega kaevudesse 100 µl värvilahust ning plaate inkubeeriti 2 tundi 37°C 5% CO₂ sisaldusega inkubaatoris. Seejärel pesti rakke 150

µl PBS-ga ja lisati 150 µl neutraalpunase lahustit (50% etanool 96%, 49% destilleeritud vesi, 1% jää-äädikhape). Rakke loksutati 10 minuti jooksul, et värv ühtlaselt jaotuks. Neutraalpunase neelduvust saab mõõta lainepikkusel 540 nm, fluorestsentsi ergastamine toimub 530 nm ja emissioon 645 nm juures. Antud töös mõõdeti plaadilt fluorestsentsi väärtused Infinite 200 Pro (Tecan) plaadilugejaga.

$$Elumus (\%) = \frac{\text{Neutraalpunase fluorestsentsi väärtus proovis} \times 100\%}{\text{Neutraalpunase fluorestsentsi väärtus kontrollis}}$$

Kõik Zn ühendid testiti vähemalt kuues korduses, tulemustest arvutati keskmine. Rakkude elumuse % alusel erinevate Zn ühendite juuresolekul arvutati välja IC50 ehk 50% rakkude elumust inhibeeriv ZnO või Zn(OAc)₂ kontsentratsioon koos 95% usalduspiiridega. Arvutused sooritati programmi GraphPad abil kasutades mittelinaarset regressiooni ning Hilli korrektsiooni.

2.2.3.3 Pindade tsütotoksilisuse testimine kontakttestis

Pindade toksilisuse test järgis üldjoontes ISO 10993-5 otsekontakttesti standardmetoodikat. Enne testi algust kiiritati ZnO materjaliga või maatriksiga kaetud teraspinnad, või puhtad teraspinnad UVC kiirgusega mõlemalt poolt 15 minuti jooksul. Vasepinnad leotati 10% ammoniagi lahuses vees umbes 24 tundi, et eemaldada pinnal olev oksiidikiht. Kui pinnad olid visuaalselt puhtad (ühtlaselt läikivad, ilma plekkideta), eemaldati ammoniaagi lahus ja pinnad pesti destilleeritud veega, kuni universaalse indikaatorpaberi järgi olid pinnad vees neutraalsed. Seejärel pesti pinnad 70%-lise etanooliga ja säilitati 96%-lises etanoolis, et vähendada oksüdeerimist. Vahetult enne eksperimenti kuivatati pinnad.

Kontakttestis kasutati 12-kaevulistest plaatides ettevalmistatud rakke. Rakkudelt eemaldati sööde ja need pesti 1 ml PBS puhvriga, lisati uus sööde. Igasse testkaevu asetati testitav pind aktiivne pool vastu rakke ning inkubeeriti kas 1 või 24 tundi (vase puhul 2 tundi). Seejärel eemaldati pinnad pintsettidega. Rakke pesti 1 ml PBS-ga, vahetati sööde ning inkubeeriti veel 24 tundi. Seejärel eemaldati rakkudelt sööde, lisati 1 ml neutraalpunase värvilahust (vt protokollil ülalpool) ning rakke inkubeeriti 2 tundi inkubaatoris. Värv eemaldati, rakud pesti 1,5 ml PBS-ga ja lisati 1,5 ml neutraalpunase värvilahustit. Värvil lasti lahustuda 10 minuti jooksul

plaate kergelt loksutades ning mõõdeti fluorestsents 530 nm ergastamise ja 645 nm emissiooni juures. Rakkude elumuse % arvutati, nagu ülalpool. Kõiki pindasid analüüsiti kokku kuues korduses. Negatiivseks kontrolliks olid rakud söötmes ilma pinnata. Toksiliseks loeti pindasid, millel oli rakkude elumuse keskmine väärtus $\leq 70\%$, vastavalt ISO 10993-5 juhiste. Statistilisi erinevusi erinevate pindade elumuse väärtustes analüüsiti GraphPad programmi abil kasutades ühefaktorilist dispersioonianalüüsi (ANOVA) koos *post-hoc* tulemuste paariviisilise võrdlemisega Tukey meetodil. Statistiliselt oluliste erinevuste tuvastamiseks kasutati olulisusnivood $\alpha=0,05$.

2.2.3.4 Pindade leotiste tsütotoksilisuse testimine

ISO 10993-5 meetodi järgi on veel üheks võimaluseks pindade toksilisust analüüsida viies läbi kaudne test, mis näeb ette pinnaleotise valmistamist ja selle testimist. Leostamise testi jaoks asetati kas ZnO kattega või maatriksiga kaetud teraspinnad, puhtad teraspinnad või vasepinnad aktiivne pool allpool 50 ml tsentrifuugituubi, millesse oli lisatud 2 ml söödet. Sellisel kujul puudutas pind just veidi söötme pinda. Leostamine viidi läbi 24 tunni jooksul ning pindasid leostati kolmes korduses. Peale 24 tunnist leostamist lisati varem ettevalmistatud rakkudega 96-kaevulisele mikroplaadile 100 μ l pinnaleotist. Rakke inkubeeriti seejärel 24 tundi, pesti 100 μ l PBS-ga, lisati 100 μ l uut söödet ning inkubeeriti veel 24 tundi, nagu soovitatud Kamiloglu jt artiklis aastal 2020. Seejärel eemaldati sööde ja lisati 100 μ l värvilahust ning inkubeeriti 2 tundi 37°C 5% CO₂. Seejärel pesti rakke 150 μ l PBS-ga ja lisati 150 μ l neutraalpunase lahustit, mõõdeti fluorestsents ning arvutati rakkude elumus, nagu kirjeldatud ülalpool. Toksiliseks loeti pindasid, millel oli rakkude elumuse keskmine väärtus $\leq 70\%$, vastavalt ISO 10993-5 juhiste. Statistilisi erinevusi erinevate pindade elumuse väärtustes analüüsiti GraphPad programmi abil kasutades ühepoolse ANOVA analüüsi koos tulemuste paariviisilise võrdlemisega *post-hoc* Tukey meetodil.

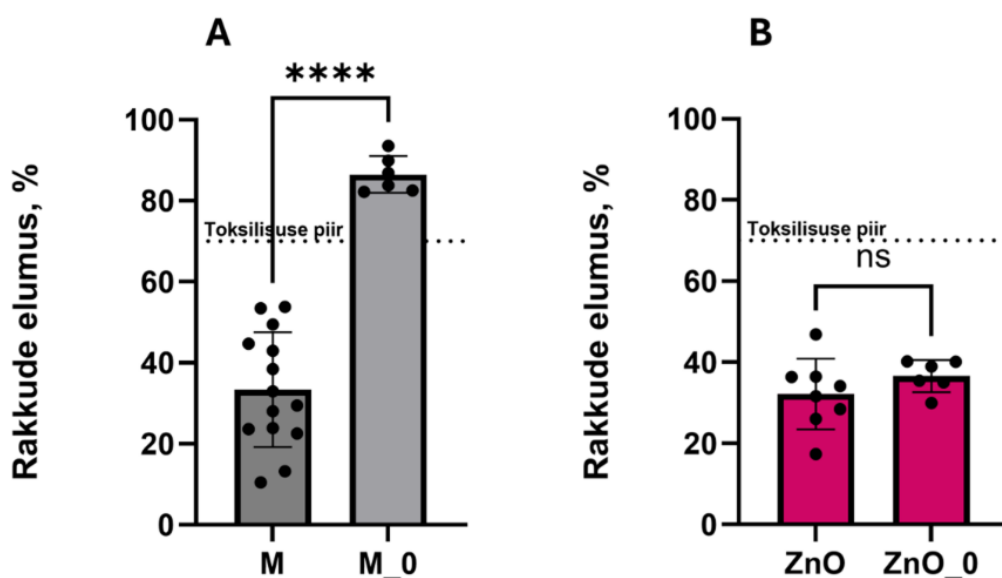
Paralleelselt tsütotoksilisuse testimisega analüüsiti pindade leotisi nende Zn sisalduse osas. Leostamiseks imiteeriti täpselt tsütotoksilisuse testi jaoks läbi viidud leostamisskeemi, kuid rakukultuuri söötme asemel kasutati deioniseeritud vett ja seda põhjusel, et Zn analüüsi ei segaks rakukultuuri söötmes juba varem olemasolev Zn (250 μ g/l). Leostamiseks asetati ZnO kattega teraspinnad aktiivne pool allpool 50 ml tsentrifuugituubi, millesse oli lisatud 2 ml deioniseeritud vett. Leostamine viidi läbi toatemperatuuril 24 tunni jooksul, misjärel analüüsiti

Zn kontsentratsioon proovides ICP-MS spektromeetriga (Agilent Technologies, 2009) EVS-EN ISO 17294-2 meetodil Eesti Keskkonnauuringute Keskus.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. Maatriksiga kaetud teraspindade tsütotoksilisus

Kuna töös kasutati ZnO materjalidel põhinevaid katteid, kus osakeste immobiliseerimiseks kasutati akrülaatmaatriksit (**Joonis 3**), siis oli esimeseks ülesandeks testida akrülaatmaatriksi stabiilsust ja mittetoksilisust keratinotsüütidele. Selleks viidi läbi otsekontakttest 24 tundi 60 °C juures polümeriseerunud akrülaatmaatriksit sisaldavate pindade ja keratinotsüütide vahel ning mõõdeti rakkude elumust. Üllatuslikult selgus, et akrülaatmaatriks avaldab rakkudele toksilist mõju, mistõttu sellist maatriksit ZnO osakeste immobiliseerimiseks ei olnud võimalik kasutada. Arvatavasti oli toksilisus tingitud osaliselt polümeriseerimata jäänud akrülaadist ning lõpliku polümerisatsiooni saavutamiseks keedeti akrülaatmaatriksiga pindasid 96%-lises etanoolis. Peale sellist töötlust pinnad enam rakkudele toksilised ei olnud ning edaspidi keedeti etanoolis kõik valmistatud pinnad. Tulemustest nähtub aga, et akrülaatmaatriksi (peamine maatriksikomponent enamustes värvides ja lakkides) lõpuni polümeriseerumine on oluline pindade tsütotoksilisuse minimeerimisel ja ohutuse suurendamisel (**Joonis 7**).



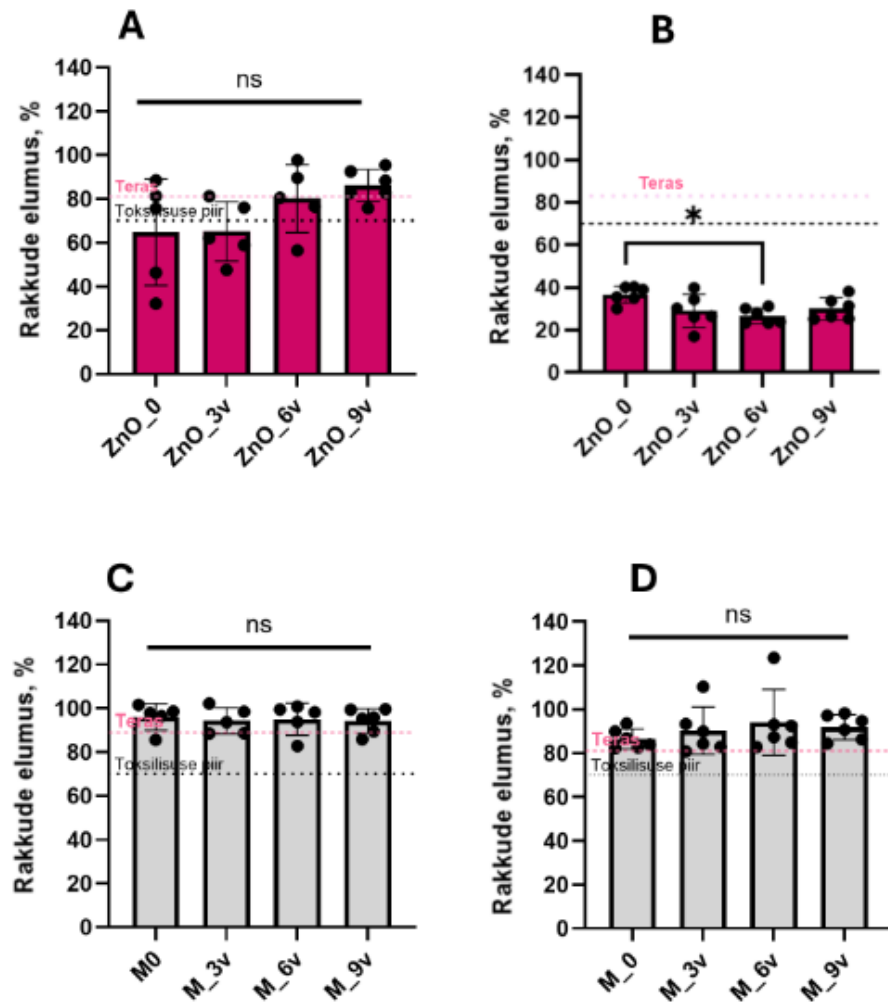
Joonis 7. Keratinotsüütide elumus peale 24-tunnist kokkupuudet akrülaatmaatriksi pinnaga, mida kas ei olnud või mida oli polümeriseerumise parandamiseks 96%-lises etanoolis keedetud. (A) akrülaatkinnad ilma lisandita (M – keetmata pind, M_0 – keedetud pind), (B) akrülaatkinnad ZnO lisandiga (ZnO – keetmata pind, ZnO_0 – keedetud pind). **** statistiliselt oluline erinevus $p > 0.0001$.

3.2 ZnO pindade tsütotoksilisus otsekontakttestis

Värskelt valmistatud ning intensiivse kasutamise tingimustes (kolmekuuline UVA töötlus) hoitud ZnO pindade toksilisus otsekontakttestis, kus pinnad olid rakkudega vahetus kontaktis, on näidatud **joonisel 8 A-B**. Üldiselt olid ZnO pinnakatted tunduvalt vähem tsütotoksilised peale 1-tunnist kokkupuuteaega kui peale 24-tunnist kokkupuudet. Tunnise otsekontakti järel inimrakkude ja pinna vahel kahanes rakkude elumus veidi alla 70% ainult värskelt valmistatud ZnO pinna puhul ja 3 nädalat UVA all imiteeritud kasutustingimustes hoitud pindade puhul. Kauem kasutustingimustes hoitud pinnad enam definitsiooni järgi tsütotoksilised ei olnud (**Joonis 8 A**). 24 tunni inkubatsiooni järgselt oli maksimaalne rakkude elumus ZnO pindadel 44% ning kasutusaja pikenemisega toksilisus veidi tõusis. 6-nädalase UVA all läbiviidid imiteeritud kasutuse järel oli rakkude elumus küll veidike, kuid statistiliselt oluliselt erinev värskelt valmistatud pinnast. Seda võib osaliselt selgitada skaneerivas elektronmikroskoobis tähele pandud pinnadefektide ilmumisega (**Lisa 2**). 6-nädalase imiteeritud kasutuse läbinud pindadel pandi tähele võrreldes värskelt valmistatud pinnaga suuremat hulka õõnsusi just ZnO materjali kõrval, mis võiks viidata sellele, et 6 nädala jooksul toimus osakeste läheduses pinnamaatriksi korrosioon. Ka leostamistestid, millest on juttu all, näitavad, et kasutuse järgselt vabaneb pindadelt Zn veidi rohkem, kui värskelt valmistatud pinnast, mis samuti viitab osalisele pindade korrosioonile. Akrülaatmaatriks ei olnud rakkudele toksiline mitte ühegi kasutustingimuse ega kokkupuute ajapunkti jooksul. **Joonisel 8** on näidatud ka, et roostevaba terase pind ei avaldanud ei 1 ega 24 tunni kokkupuute järel tsütotoksilisust (1 tunni kokkupuute järel oli rakkude elumus 89% negatiivsest kontrollist ning 24 tunni kokkupuute järel oli rakkude elumus 81% kontrollist). Selline tulemus oli ootuspärane roostevaba terase, kui väga laialdaselt kasutuses oleva metallisulami, puhul. Samas tuleb aga mainida, et roostevaba teras sisaldab mõningaid teadaolevalt toksilisi metalle, nagu kroom, mistõttu ei oleks väike kahanemine rakukude elumuses ka üllatav.

Kui võrrelda ZnO värskelt valmistatud ja UVA käes imiteeritud kasutuses olnud pindade tsütotoksilisust nende pindade fotokatalüütilise aktiivsuse (st võimega lagundadada indikaatorvärvi) ja antibakteriaalse mõjuga, mis küll ei olnud antud töö teema, kuid mis olid kogu projekti peamised uurimisteemad, siis võib öelda, et imiteeritud kasutamine ei mõjutanud pindade fotokatalüütilisi omadusi oluliselt ning antibakteriaalne toime isegi veidi kahanes võrreldes värskelt valmistatud ZnO pinnaga. Sellest tulenevalt saab järeldada, et intensiivne ZnO pindade kasutus UVA käes, mis neilt pindadelt reaktiivseid hapniku vorme vabastab, muudab pindade omadused ebasoodsamaks, kuna põhjustab kahanenud antimikroobset mõju,

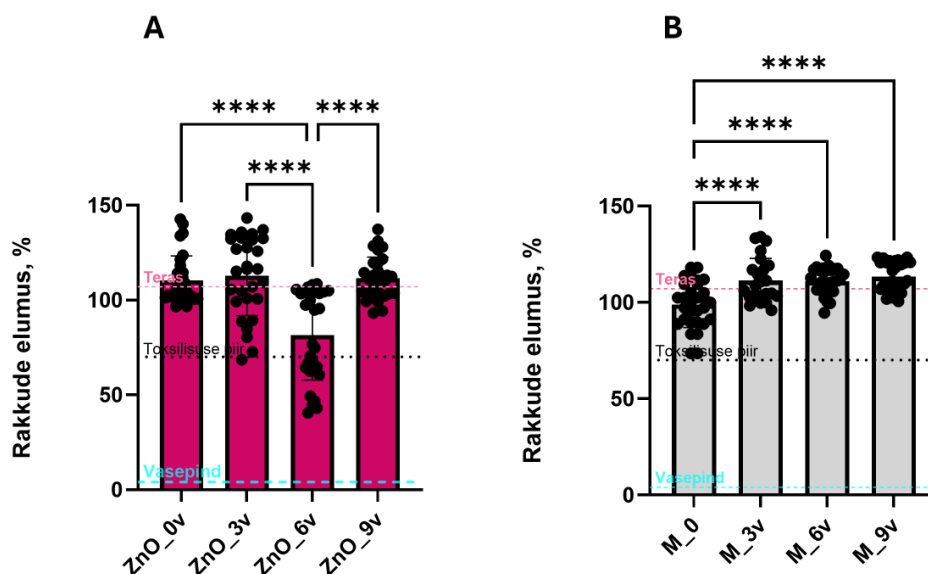
veidi tõusnud tsütotoksilisust ning ka füüsilisi muutusi, mida nähti skaneeriva elektronmikroskoobi all. Seega leidis töös esitatud hüpotees osaliselt kinnitust ning tuvastasime, et intensiivse kasutuse jooksul toimuvad materjalis muutused, mis võivad mh avalduda väikeste muudatustena pindade tsütotoksilisuses.



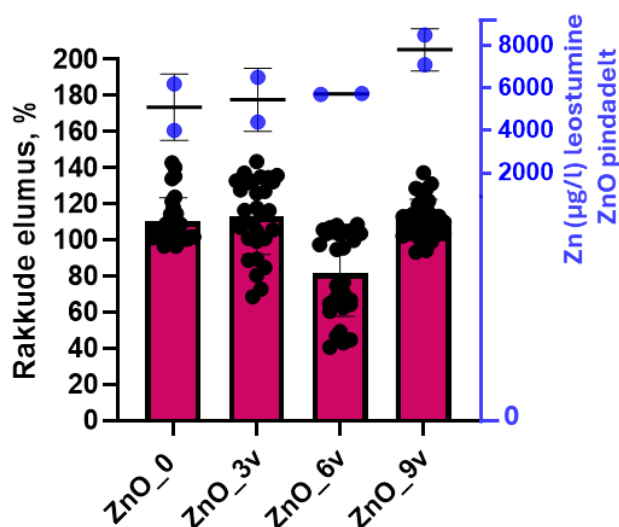
Joonis 8. Akrülaatmaatriksisse immobiliseeritud ZnO mikro- ja nanomaterjalidega kaetud pindade mõju HaCaT keratinotsüütide elumusele peale 1 või 24 tunnilist kokkupuudet. A-B näitavad ZnO pinnakatete tsütotoksilisust: (A) 1 tund ja (B) 24 tundi. C-D näitavad ilma ZnO materjalita akrülaatmaatriksi tsütotoksilisust: (C) 1 tund ja (D) 24 tundi. Proovid M_0 ja ZnO_0 on värskest valmistatud maatriks või ZnO pinnad, M_3v või ZnO_3v on maatriks või ZnO pind, mida on töödeldud UVA valgusega 3 nädalat (proovid _6v ning _9v on läbinud vastavalt 6 ja 9 nädalase töötluse). Must katkendjoon näitab pindade toksiliseks määratlemise piirväärtust (elumus 70%).

3.3 ZnO pindade tsütotoksilisus leostamistestis

Lisaks otsekontakttestile analüüsi ZnO pindade mõju keratinotsüütidele ka mitte otsesel meetodil, peale pindade eelnevat leostamist rakuõõtmes. Värskest valmistatud ZnO pinna leotis rakkude elumust ei kahandanud, kuid 3 ja 6 nädala imiteeritud kasutuse järgselt oli rakkude elumus mitmete mõõtmiste kohasel kahanenud ning 6 nädala proovis oli kahanemine ka statistiliselt oluline (**Joonis 9**). Huvitavalt ei leitud olulist rakkude elumuse kahanemist enam 9 nädala imiteeritud kasutuse järgselt. Kui vaadata andmeid pindadelt Zn leostumise kohta, siis leostunud Zn hulk kasvas mõningal määral koos pindade imiteeritud kasutusaja pikkusega, kuid oma maksimumi saavutas siiski 9 nädala kasutuse järgselt (**Joonis 9**). Selline tulemus on ka kooskõlas pindadelt tehtud skaneeriva elektronmikroskoobi piltidega, millel on selgelt näha enam pinnakahjustusi, kui värsketel pindadel. Sellised pinnakahjustused aga võivad mõjutada Zn ionide või ZnO vabanemist pinnalt leotisesse. Positiivse kontrollina kasutatud vasepinna leotis toimis rakkudele toksiliselt, nagu oli ka oodata. Tulemusi kinnitavad ka Lewinski jt. katsed aastast 2018, kus hiire rakkudele ei mõjunud toksiliselt ZnO pindade leotised. See lubab arvata, et taoliste pindade leotised ei mõju toksiliselt imetajarakkudele üldiselt.



Joonis 9. ZnO pindade tsütotoksilisus leostamisel. (A) näitab rakkude elumust peale 24 tunnist kokkupuudet ZnO pindade leotistega ning (B) akrülaatmaatriksi leotistega. Proovid M_0 ja ZnO_0 on värskest valmistatud maatriksi või ZnO pinnad, ZnO_3v ja M_0 on ZnO pind või maatriks, mida on töödeldud UVA valgusega 3 nädalat (proovid _6v ning _9v on läbinud vastavalt 6 ja 9 nädalase töötuse). Must katkendjoon näitab proovi toksiliselt määratlemise piirväärtust (elumus 70%), helesinine katkendjoon vasepinna mõju rakkude elumusele ning roosa katkendjoon märgib rakkude elumust teraspindadega kokkupuutel (joonte tähendused on ka esitatud paneelil A). **** - statistiliselt oluline erinevus $p > 0.000$.

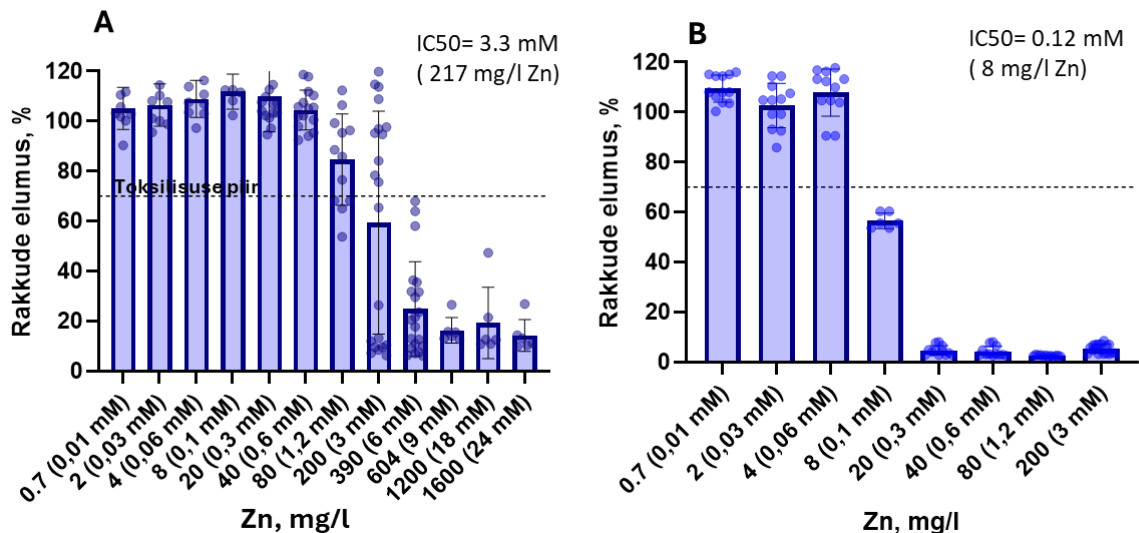


Joonis 10. ZnO pindade tsütotoksilisus kombineeritud Zn leostumisega nendelt pindadelt. ZnO pindade leotiste elumuse andmed (mustad sümbolid) võrreldes neist pindadest 24 tunni jooksul välja leostunud Zn kontsentratsiooniga (sinised sümbolid).

3.4 Zn ionide ning ZnO suspensioonide tsütotoksilisus

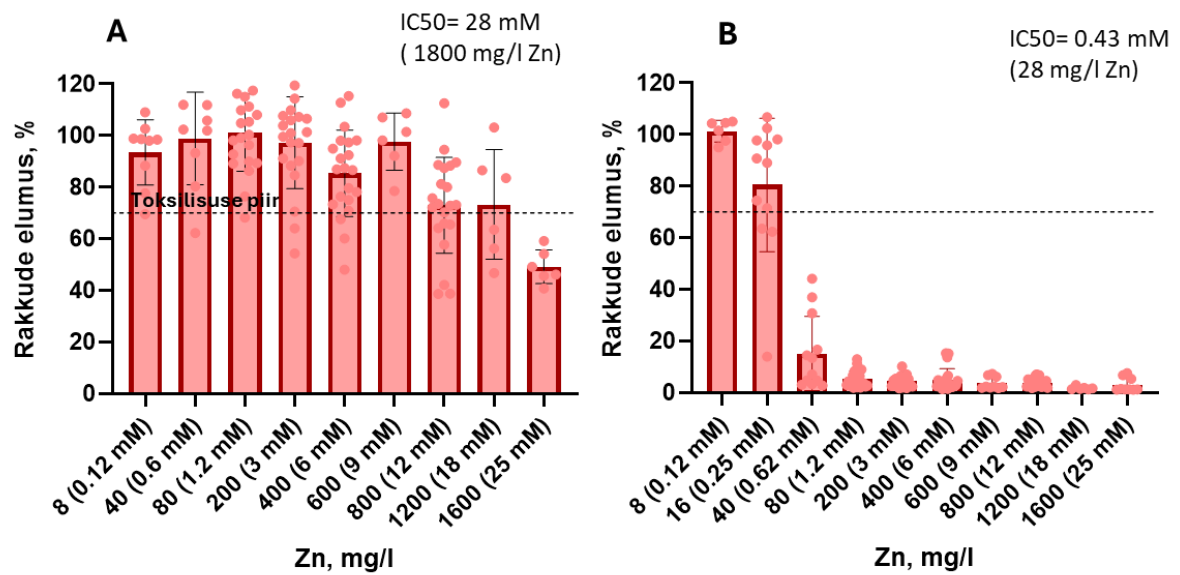
Et teha kindlaks, kas ZnO pindade leotiste tsütotoksilisus oli tingitud nendest pindadest söötmet vabanenud Zn ühenditest või ionidest, viidi järgmisena läbi toksilisuse test ioonse Zn ühendiga ning ZnO pindade tsütotoksilisuse võrdlemiseks ZnO suspensiooniga.

Et teha kindlaks, kas ZnO sisaldava kattega pindadest välja leostunud Zn hulk võiks iseenesest toksilisust põhjustada, määrati keratinotsütide elumus Zn soola ($Zn(OAc)_2$) erinevate kontsentratsioonide juuresolekul 1 ja 24 tunnise kokkupuute järel (**Joonis 11**). Tulemused näitasid, et testitud Zn ühendi toksiline mõju 1 tunnise kokkupuute järel oli tuvastatav alles 200 mg Zn juures liitri kohta ning kontsentratsioon, mis inhibeeris 50% rakkude kasvu oli 217 mg/l Zn (3,3 mM). 24 tunnisel kokkupuudel olid inhibeerivad kontsentratsioonid märkimisväärselt madalamad ning toksilisus tuvastati alates kontsentratsioonist 8 mg/l Zn (0,12 mM) (**Joonis 11**). 24 tunnisel kokkupuutel oli Zn ionide 50% inhibeerivaks kontsentratsiooniks 8 mg/l Zn (0,12 mM).



Joonis 11. Zn ionide mõju keratinotsüütide elumusele peale 1 või 24 tunnilist kokkupuudet. 1 tund (A) ja 24 tundi (B). Zn ionide allikana kasutati Zn(OAc)₂ ning kontsentratsioonid on väljendatud kas mg/l Zn kohta või mM.

Et võrrelda Zn ionide tsütotoksilisust ZnO omaga ning teha kindlaks, et kui toksiline on pinnakatetes kasutatud ZnO mikro- ja nanoosakesed ilma maatriksita, viidi läbi tsütotoksilisuse testid ZnO suspensioonide erinevate kontsentratsioonidega (**Joonis 12**). 1 tunnise inkubatsiooni järgselt oli ZnO toksilisus väga madal ning isegi 1200 mg Zn/l ei mõjutanud rakkude elumust alla toksilisuse piiri (70% negatiivsest kontrollist). Ainuke kontsentratsioon, mis vähendas rakkude elumust oli algne valmistatud lahus 1600 mg/l Zn (25 mM). Pärast 24 tunnilist kokkupuudet ZnO suspensiooniga oli toksiline juba kontsentratsioon 40 mg/l (0,6 mM). ZnO 24 tunni poolinhibeeriv kontsentratsioon IC₅₀ oli 28 mg/l (0,43 mM), mis veidi kõrgem, kui Zn(OAc)₂ sama väärtus. Sarnase tulemuse said ka Lee jt. 2014, kus 24 tunni testil ZnO nanoosakesi sisaldavatel lahustel poolinhibeerivaks kontsentratsiooniks HaCaT rakkudele saadi 41,7±3 mg/l (ZnO). Samuti näitas 2025 aastal Battistini jt, et ZnO suspensioon kontsentratsioonis 50 mg/l inhibeeris fibroblastide kasvu täielikult ja toksilisus oli 100%. Sarnane tulemus saadi ka antud töö katsetes, kus rakkude elumus jäi antud kontsentratsiooni juures 0% lähedale. kui Zn ionid nii, et selle poolinhibitoorne kontsentratsioon IC₅₀ ulatub kuni 27 mM-ni (1.8 g Zn/l). ZnO 24 tunni IC₅₀ väärtus on tunduvalt madalam (0.43 mM) ning ulatused juba lähedale (Zn(OAc)₂ samadele väärtustele. Seega võib järeldada, et ZnO üks oluline toksilisuse mehhanism on Zn ionide leostamine ning vabanenud Zn ionid omakorda seonduvad ebaspetsiifiliselt rakkudes olevatele valkudele ja seeläbi mõjutavad tsiingi tasakaalu (Fernández-Bertólez jt, 2024).



Joonis 12. ZnO mikro- ja nanoosakeste suspensiooni mõju keratinotsüütide elumusele peale 1 või 24 tunnilist kokkupuudet. 1 tund (A) ja 24 tundi (B). Kontsentratsioonid on väljendatud kas mg/l Zn kohta või mM.

KOKKUVÕTE

ZnO on materjal, millel on laialdased kasutusvõimalused, mh antimikroobsetes rakendustes, nt implantaatide koostises, haavaravis ja nahahoolduses ning toiduainetööstuses. Tänu selle materjali laialdasele kasutusele on oluline kindlustada ZnO materjalide ohutus. Üheks võimaluseks hinnata ainete ja materjalide ohutust on toksikoloogilised testid inimese naharakkudega *in vitro*. Käesoleva töö eesmärk oli viia läbi ISO 10993-5 meetodile vastavad otsekontakttestid antimikroobsel eesmärgil valmistatud UVA valguse poolt aktiveeritavate ZnO nano- ja mikromaterjale sisaldavate pindade ja inimese immortaliseerunud keratinotsüütide rakuliini HaCaT rakkude vahel hindamaks nende pindade *in vitro* tsütotoksilisust. Selliste pindade tsütotoksilisuse uurimine oli üks osa katseseeriast, mille eesmärk oli selgitada välja ZnO materjalidel põhinevate pindade antimikroobsete ja füüsikalise-keemiliste omaduste muutus ajas intensiivse kasutuse tingimustes.

Esimesena kontrolliti akrülaatmaatriksist pinnakatte mittetoksilisust inimese keratinotsüütidele. Kuna selgus, et vaid 24 tunni jooksu 60°C juures polümeriseeritud akrülaatmaatriks oli siiski veel rakkudele toksiline, polümeriseeriti see lõpuni etanoolis keetmise lisasammu abil. Selliselt lõpuni polümeriseeritud akrülaatmaatriksi katted keratinotsüütide elumust ei kahandanud. Järgnevalt uuriti akrülaatmaatriksisse immobiliseeritud ZnO nano- ja mikromaterjalide tsütotoksilisust otsekontakttestis ja kaudses, leostamistestis. Akrülaatlakil põhinevaid ZnO sisaldavad pinnakatteid analüüsiti nii kohe peale valmistamist kui peale 3, 6 ja 9 nädalat peale UVA all toimunud intensiivset kasutamist. Selgus, et ZnO pinnad ühetunnise kokkupuute järel keratinotsüütidele toksilisust ei põhjustanud, kuid peale 24-tunnilist kokkupuudet ilmnes tsütotoksilisus. Seega on ZnO pindade kasutamisel kindlasti ohutu lühem, näiteks ühetunnine, kokkupuude naharakkudega. Samuti suurenes pindade tsütotoksilisus juba peale nende imiteeritud 6-nädalast kasutust. Sellega leidis töös esitatud hüpotees osaliselt kinnitust ning tuvastasime, et intensiivse kasutuse jooksul toimuvad materjalise muutused, mis võivad mh avalduda väikeste muudatustena pindade tsütotoksilisuses. Leostamistestides ZnO pinnad reeglina toksilisust ei näidanud, välja arvatud osa 6 nädalat UVA all kasutustingimustes olnud ZnO pindadest.. Kui ZnO pindadelt mõõdeti pinnast vabanenud Zn hulk, siis oli selge, et UVA all toimunud imiteeritud kasutamine suurendas Zn vabanemist pindadelt. Seega on üsna tõenäoline, et ZnO pindadelt vabaneb just piisavas koguses Zn, et keratinotsüütide elumust mõjutada. Zn ionide toksilisuse võrdlemine pindadel kasutatud ZnO toksilisusega viitas sellele, et ZnO peamine toimemehhanism rakkudele on vabanenud Zn, mis liigub raku, seostub valkude ja ensüümide koostisesse ning seeläbi mõjutab raku homöostaasi.

Cytotoxicity testing of antimicrobial ZnO micro-and nanomaterial-based surfaces with human keratinocytes

Helis Paas

Summary

ZnO is a material with a wide range of applications, including antimicrobial applications, e.g. in implant formulations, wound healing and skin care, and food industry. ZnO material is also often included in surface coverings with a goal to achieve e.g., antimicrobial surfaces. Due to the widespread use of ZnO material it is important to ensure the safety of ZnO materials to humans taking into account the possible exposure route. The aim of this work was to evaluate the potential toxicity of ZnO-based surface coatings that were originally meant for antimicrobial use, at as-prepared state and during 3 months of intensive imitated use under UVA. UVA was applied in order to mimic the actual conditions under which these light-activated surfaces are actively working. As the studied ZnO coatings are meant as coverings for touch surfaces, their safety was evaluated against human keratinocytes. The effect of ZnO surfaces towards HaCaT keratinocyte cell line was assessed during a direct toxicity test and also an indirect leaching test according to ISO 10993-5 standard method.

As ZnO was coated to surfaces within acrylate polymer matrix, first, the non-toxicity of the acrylate matrix coating to human keratinocytes had to be assured. Since it turned out that the acrylate matrix that was polymerized for only 24 hours at 60°C was still toxic to cells, further polymerization by boiling the surfaces in 96% ethanol for two hours, which eventually removed acrylate toxicity, was used throughout the study. ZnO materials that were coated onto the surfaces were rod-shaped particles, which fell into nano- and microsize as about 30% of those particles had one dimension less than 100 nm, which is the upper limit for nanomaterials. During direct testing, where ZnO surfaces were in close contact with human keratinocytes, no toxicity, which was defined as more than 30% decrease in cellular viability, was observed after 1 hour of exposure. We also tested surface-included ZnO materials as suspensions separately and also those data showed that during 1 hour of exposure, ZnO material was relatively safe even until 1200 mg Zn/l. However, clear toxicity of ZnO-based surfaces was measured after 24 hours of exposure. Surfaces that had been under imitated use for 6 weeks further increased their toxicity towards keratinocytes as compared with freshly prepared surfaces. This could be explained by surface defects that appeared on ZnO surfaces after UVA exposure and that possibly increase the contact between cells and ZnO within the acrylate matrix. These results

suggest that during shorter exposure times (one hour) ZnO surfaces would be definitely safe to skin cells while longer exposure times would be an issue to worry about. During leaching tests, ZnO surfaces proved to be relatively safe, which could indicate that during cleaning or other types of activities involving larger quantities of water, the leachates would be generally safe to use. One exception was surface that had been for 6 weeks under imitated use and showed slight cytotoxicity. To explain this we determined the amount of Zn that was leaching out from surfaces and comparison of those quantities with Zn ion toxicity suggested that surface leached Zn at almost toxic concentrations. Therefore, leaching of ZnO surfaces in water for longer periods of time would not be recommended. Our findings also suggest that the main mechanism of action of ZnO materials and ZnO-based surface coatings on cells is the released Zn, which may binds to proteins and enzymes within the cell, and thereby affect cellular homeostasis.

KASUTATUD KIRJANDUS

Abdel-Gawad, D.R.I., Shaban, N.S., Moselhy, W.A., El-Dek, S.I., Ibrahim, M.A., Azab, A.A. ja Hassan, N.E.-H.Y. Estimating the in vitro cytotoxicity of the newly emerged zinc oxide (ZnO) doped chromium nanoparticles using the human fetal lung fibroblast cells (WI38 cells). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2024, 81, p. 127342.

Akbar, A. ja Sadiq, M. B. Zinc Oxide Nanomaterials as Antimicrobial Agents for Food Applications. In *Zinc-Based Nanostructures for Environmental and Agricultural Applications*; Elsevier, 2021; pp 167–180.

Ali, A., Phull, A.-R. ja Zia, M. Elemental zinc to zinc nanoparticles: is ZnO NPs crucial for life? Synthesis, toxicological, and environmental concerns. *Nanotechnology Reviews* 2018, 7(5), pp. 413–441.

Abou Zeid, S. ja Leprince-Wang, Y. Advancements in ZnO-Based Photocatalysts for Water Treatment: A Comprehensive Review. *Crystals* 2024, 14(7), p. 611.

Ahmad, R. ja Lee, B.-I. Facile fabrication of palm trunk–like ZnO hierarchical nanostructure–based biosensor for wide-range glucose detection. *Chemical Engineering Journal* 2024, 492, p. 152432.

Alhashem, Z.H., Farha, A.H., Aleithan, S.H., Mansour, S.A. ja Tony, M.A. A Hybrid Photocatalytic Approach Utilizing Oleic Acid-Capped ZnO Nanoparticles for the Treatment of Wastewater Containing Reactive Dyes. *Catalysts* 2024, 14(12), p. 934.

Attia, A., Elboughdiri, N., Ghernaout, D., Carbonnier, B., Amar, R.B. ja Mahouche-Chergui, S. Enhancing the generation and stabilization of ZnO nanoparticles on modified clay with polyethylenimine to improve the photodegradation of dyes in textile wastewater. *Journal of Water Process Engineering* 2025, 73, p. 107711.

Baek, M., Kim, M. K., Cho, H. J., Lee, J. A., Yu, J., Chung, H. E. ja Choi, S. J. Factors Influencing the Cytotoxicity of Zinc Oxide Nanoparticles: Particle Size and Surface Charge. *J. Phys. Conf. Ser.* 2011, 304, 012044.

Battistini, B., Lulli D., Bocca B., ... Failla C. M. Tattoo Ink Metal Nanoparticles: Assessment of Toxicity In Vitro and with a Novel Human Ex Vivo Model. *Nanomaterials* 2025, 15(4), p. 270.

Bhattarai, S. Designing a more efficient CsSnI₃ based perovskite solar cell with novel bio-synthesized ZnO-NP as ETL. *Materials Chemistry and Physics* 2024, 318, p. 129269.

Borysiewicz, M.A. ZnO as a Functional Material, a Review. *Crystals* 2019, 9(10), p. 505.

Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breikreutz, D., Hornung, J., Markham, A. ja Fusenig, N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology* 1988, 106(3), pp. 761–771.

Caballero-Güereca, C.E., Cruz, M.R.A., Luévano-Hipólito, E. ja Torres-Martínez, L.M. Transparent ZnO thin films deposited by dip-coating technique: Analyses of their hydrophobic properties. *Surfaces and Interfaces* 2023, 37, p. 102705.

Choi, Y.H., Kim, M.-J., Lee, J., Pyun, J.-C. ja Khang, D.-Y. Recyclable, Antibacterial, Isoporous Through-Hole Membrane Air Filters with Hydrothermally Grown ZnO Nanorods. *Nanomaterials* 2021, 11(12), p. 3381.

Euroopa Liidu Komisjon 2022. Komisjoni 10. juuni 2022. aasta soovitus (nanomaterjali määratluse kohta) parandus 32022H0614(01)R(01). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/?uri=CELEX%3A32022H0614%2801%29R%2801%29&qid=1748137780376> (Vaadatud viimati 25.05.2025).

Fernández-Bertólez, N., Alba-González, A., Touzani, A., ... B.; Valdiglesias, V. Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles: Cellular and Behavioural Effects. *Chemosphere* 2024, 363, 142993.

Hamidian, K., Sarani, M., Najafidoust, A., Kadkhodaei, J., Sardashti-Birjandi, A. Co-Doped ZnO Nanowires: Synthesis, Photocatalytic Performance, and Cytotoxic Activity against Human Brain Glioblastoma Cells. *Results Chem.* 2023, 5, 100734.

Heidari Laybidi, F., Bahrami, A., Abbasi, M.S., Rajabinezhad, M., Heidari Beni, B., Karampoor, M.R. ja Mousavi Anijdan, S.H. Electrophoretic Deposition of ZnO-Containing Bioactive Glass Coatings on AISI 316L Stainless Steel for Biomedical Applications. *Coatings* 2023, 13(11), p. 1946.

Jeyavani, J., Al-Ghanim, K.A., Govindarajan, M., Malafaia, G. ja Vaseeharan, B. A convenient strategy for mitigating microplastics in wastewater treatment using natural light and ZnO nanoparticles as photocatalysts: A mechanistic study. *Journal of Contaminant Hydrology* 2024, 267, p. 104436.

Jin, S.-E. ja Jin, H.-E. Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nano/Microparticles and Their Combinations against Pathogenic Microorganisms for Biomedical Applications: From Physicochemical Characteristics to Pharmacological Aspects. *Nanomaterials* 2021, 11(2), p. 263.

Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T. ja Capanoglu, E. Guidelines for Cell Viability Assays. *Food Front.* 2020, 1 (3), 332–349.

Karimi-Maleh, H. ja Erk, N. A DNA biosensor strategy in monitoring of Vinorelbine breast cancer drug using catalytic effect of Pt–Pd–ZnO/SWCNTs. *Environmental Research* 2023, 239, p. 117338.

Kim, T., Kim, W., Kim, S. ja Lee, W. Sensitive and stable NO₂ sensor in a wide range based on rGO/ZnO via simple spray coating. *Microchemical Journal* 2025, 212, p. 113250.

Koupai, A.A., Varshosaz, J., Tavakoli, M., Mirhaji, M., Salehi, S. ja Dobakhti, F. Multifunctional Tri-layer Wound Dressing containing ZnO nanoparticles ja IGF-1 as an Efficient Biomaterial for Healing of Full Thickness Skin Injuries. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2025, p. 101039.

- Kumari, P., Bharti, A., Agarwal, V., Kumar, N. ja Saxena, K. ZnO coating on silicon rubber urinary catheter to reduce the biofilm infections. *Advances in Materials and Processing Technologies* 2022, 8(sup2), pp. 423–433.
- Lee, P.-L., Chen, B.-C., Gollavelli, G., Shen, S.-Y., Yin, Y.-S., Lei, S.-L., Jhang, C.-L., Lee, W.-R. ja Ling, Y.-C. Development and Validation of TOF-SIMS and CLSM Imaging Method for Cytotoxicity Study of ZnO Nanoparticles in HaCaT Cells. *J. Hazard. Mater.* 2014, 277, 3–12.
- Lewinski, N. A., Avrutin, V., Izadi, T., Secondo, L. E., Ullah, Md. B., Özgür, Ü., Morkoç, H. ja Topsakal, E. Influence of ZnO Thin Film Crystallinity on *in Vitro* Biocompatibility. *Toxicol. Res.* 2018, 7 (5), 754–759.
- Matijaković Mlinarić, N., Wawrzaszek B., Kowalska K., ... Bohinc K. Poly(Allylamine Hydrochloride) and ZnO Nanohybrid Coating for the Development of Hydrophobic, Antibacterial, and Biocompatible Textiles. *Nanomaterials* 2024, 14(7), p. 570.
- Mendes, C.R., Dilarri G., Forsan C.F., Sapata V.D.M.R, Lopes P.R.M., De Moraes P.B., Montagnoli R.N., Ferreira H. ja Bidoia E.D. Antibacterial action and target mechanisms of zinc oxide nanoparticles against bacterial pathogens. *Scientific Reports* 2022, 12(1), p. 2658.
- Milisav, A.-M., Mičetić M., Dubček P., ... Sikirić M.D. Effect of Ag and Cu doping on the properties of ZnO magnetron sputtered thin films for biomedical applications. *Applied Surface Science* 2025, 690, p. 162623.
- Moezzi, A., McDonagh, A.M. ja Cortie, M.B. Zinc oxide particles: Synthesis, properties and applications. *Chemical Engineering Journal* 2012, 185–186, pp. 1–22.
- Naorem, B.D., Singh J.P., Sharma B., ...Batra N. Mn-doped ZnO thin films as a platform for reagentless uric acid biosensor. *Chemical Physics Impact* 2025, , p. 100823.
- Ouyang, Y., Zhou, M., Liu, Y., Zhang, L., Zhong, C., Yang, Q. ja Liu, M. Mg-doped ZnO nanoparticle as an effective nanocarrier in delivery of 5-Fluorouracil anti-gastric cancer drug. *Journal of Molecular Structure* 2024, 1314, p. 138706.
- Petrochenko, P.E. Zhang Q., Bayati R., Skoog S.A., Phillips K.S., Kumar G., Narayan R.J. ja Goering P.L. Cytotoxic evaluation of nanostructured zinc oxide (ZnO) thin films and leachates. *Toxicology in Vitro* 2014, 28(6), pp. 1144–1152.
- Petrochenko, P.E., Skoog, S.A., Zhang, Q., Comstock, D.J., Elam, J.W., Goering, P.L. ja Narayan, R.J. Cytotoxicity of cultured macrophages exposed to antimicrobial zinc oxide (ZnO) coatings on nanoporous aluminum oxide membranes. *Biomatter* 2013, 3(3), p. e25528.
- Pina, H.D.V., Farias A.J.A.D., Barbosa F.C., William De Lima Souza J., De Sousa Barros, A.B., Batista Cordoso M.J., Fook M.V.L. ja Wellen R.M.R. Microbiological and cytotoxic perspectives of active PCL/ZnO film for food packaging. *Materials Research Express* 2020, 7(2), p. 025312.

- Popescu, M. C., Ungureanu, C., Buse, E., Nastase, F., Tucureanu, V., Suchea, M., Draga, S. ja Popescu, M. A. Antibacterial Efficiency of Cellulose-Based Fibers Covered with ZnO and Al₂O₃ by Atomic Layer Deposition. *Appl. Surf. Sci.* 2019, 481, 1287–1298.
- Prajapati, B.G., Sharma, D., Elossaily, G.M., Sharma, N., Bilandi, A. ja Kapoor, D.U. Unlocking potential of zinc oxide nanoparticles in enhancing topical drug delivery. *Nano-Structures & Nano-Objects* 2024, 39, p. 101302.
- Pushpalatha, C., Suresh J., Gayathri V.S., Sowmya S.V., Augustine D., Alamoudi A., Zidane B., Mohammad Albar N.H. ja Patil S. Zinc Oxide Nanoparticles: A Review on Its Applications in Dentistry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2022, 10, p. 917990.
- Raha, S. ja Ahmaruzzaman, Md. ZnO nanostructured materials and their potential applications: progress, challenges and perspectives. *Nanoscale Advances* 2022, 4(8), pp. 1868–1925.
- Rai H., Prashant ja Kondal, N.A. Review on Defect Related Emissions in Undoped ZnO Nanostructures. *Mater. Today Proc.* 2022, 48, 1320–1324.
- Rani, N., Khan, Y., Yadav, S., Saini, K. ja Maity, D. Application of Metal Oxide Nanoparticles in Different Carcinomas. *Journal of Nanotheranostics* 2024, 5(4), pp. 253–272.
- Repetto, G., Del Peso, A. ja Zurita, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* 2008, 3(7), pp. 1125–1131.
- Riss, T., Niles A., Moravec, R., Karassina, N. ja Vidugiriene J. 2019. The Assay Guidance Manual. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540958/> (Vaadatud viimati 21.05.2025).
- Shahriyari, A., Bagherzadeh-Nobari Sh., Yousefizad M., Manavizadeh N., Pourfarzad H., GolshanBafghi ., Ahmadi H. ja Gholipour F. High-sensitivity creatine detection using doped ZnO nanoribbon biosensors: A density functional theory approach. *Sensing and Bio-Sensing Research* 2025, 47, p. 100767.
- Sharma, A. ja Luthra, G. Significance of ISO 10993 Standards in Ensuring Biocompatibility of Medical Devices: A Review. *Journal of Pharmaceutical Research International* 2023, 35(8), pp. 23–34.
- Shi, T.-Y., Niu, C.-P., Zhang, R., He, H.-X., Wang, X.-X., Liang, R.-P. ja Qiu, J.-D. In-situ synthesis of porous PVC/ZnO heterojunction composites for photocatalytic removal of uranium from wastewater. *Separation and Purification Technology* 2025, 363, p. 132145.
- Sorca, B.V., Kaya D.A., Kaya M.G.A.; ... Titorencu I. Bone Fillers with Balance Between Biocompatibility and Antimicrobial Properties. *Biomimetics* 2025, 10(2), p. 100.
- Zhang, Y., Liu X., Li Z., Zhu S., Yuan X., Cui Z., Yang X., Chu P. K. ja Wu S. Nano Ag/ZnO-Incorporated Hydroxyapatite Composite Coatings: Highly Effective Infection Prevention and Excellent Osteointegration. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2018, 10(1), pp. 1266–1277.
- Zhang, Y., Nayak, T., Hong, H. ja Cai, W. Biomedical Applications of Zinc Oxide Nanomaterials. *Current Molecular Medicine* 2013, 13(10), pp. 1633–1645.

Zhang, Y., Zhang, J., Li, J., Shen, J. ja Zhang, X. Thermosensitive ZnO-PMMA/PEG microgels: A smart sunscreen with adapting SPF to ambient temperature fluctuations. *Materials Today Chemistry*. 2024 37, p. 102039.

Tao, Y., Zhuang, W., Fan, W., Zhou, L., Fan, L., Qin, H. ja Zhu, Y. Dual-functional silver nanoparticle-enhanced ZnO nanorods for improved reactive oxygen species generation and cancer treatment. 2025, *iScience* 28(2), p. 111858.

Tian, D., Zhang, X., Wang, X., Zhai, J. ja Jiang, L. Micro/nanoscale hierarchical structured ZnO mesh film for separation of water and oil. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2011, 13(32), p. 14606.

Vasile, O. R., Serdaru, I., Andronescu, E., Trușcă, R., Surdu, V. A., Oprea, O., Ilie, A. ja Vasile, B. Ș. Influence of the Size and the Morphology of ZnO Nanoparticles on Cell Viability. *Comptes Rendus Chim*. 2015, 18 (12), 1335–1343.

Viter, R., Tepliakova, I., Drobysh, M., ... Ramanavicius, A. Photoluminescence-Based Biosensor for the Detection of Antibodies against SARS-CoV-2 Virus Proteins by ZnO Tetrapod Structure Integrated within Microfluidic System. *Sci. Total Environ*. 2024, 939, 173333.

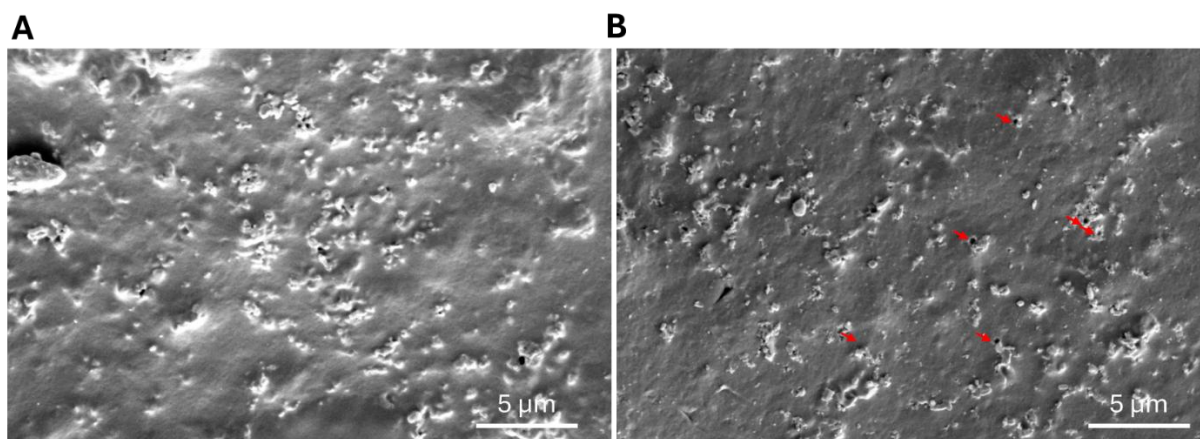
Wang, M. ja Gao, J. Atomic Layer Deposition of ZnO Thin Film on ZrO₂ Dental Implant Surface for Enhanced Antibacterial and Bioactive Performance. *Mater. Lett*. 2021, 285, 128854.

Wang, S. Fang R., Yuan X., Chen J., Mi K., Wang., Zhang H. Ja Zhang H. Foliar Spraying of ZnO Nanoparticles Enhanced the Yield, Quality, and Zinc Enrichment of Rice Grains. *Foods* 2023, 12(19), p. 3677.

Öhrn, O., Sykam K., Gawusu S., ... Das O. Surface coated ZnO powder as flame retardant for wood: A short communication. *Science of The Total Environment* 2023, 897, p. 165290.

Yadav, S., Sadique, Mohd.A., Pal, M., Khan, R. ja Srivastava, A.K. Cytotoxicity and DNA fragmentation-mediated apoptosis response of hexagonal ZnO nanorods against human prostate cancer cells. *Applied Surface Science Advances* 2022, 9, p. 100237.

Lisa 2. ZnO materjali sisaldavate pindade muutumine UVA all läbiviidud intensiivse kasutuse vältel. (A) Koheselt valmistatud ZnO materjali sisaldav pind, (B) 6 nädalat UVA all kasutustingimustes hoitud pind skaneerivas elektronmikroskoobis. Punased nooled viitavad aukudele pinnamaatriksis. Piltide autor: Mati Kook, TÜ füüsika instituut



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

1. Mina, Helis Paas, annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “ZnO mikro- ja nanomaterjalidel põhinevate antimikroobsete pindade tsütotoksilisuse testimine inimese keratinotsüütidega”, mille juhendajad on doktorant Alexandra Nefedova ja professor Angela Ivask, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Helis Paas

14.05.2025