

# Učinak iona metala otpuštenih iz ortodontskih prstenova i bravica na vitalnost i vijabilnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

---

Sabadi, Domagoj

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:608357>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Domagoj Sabadi

UČINAK IONA METALA OTPUŠTENIH IZ  
ORTODONTSKIH PRSTENOVA I BRAVICA NA  
VITALNOST I VIJABILNOST KVASCA

*Saccharomyces cerevisiae*

Diplomski rad

Rijeka 2021.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Domagoj Sabadi

UČINAK IONA METALA OTPUŠTENIH IZ  
ORTODONTSKIH PRSTENOVA I BRAVICA NA  
VITALNOST I VIJABILNOST KVASCA

*Saccharomyces cerevisiae*

Diplomski rad

Rijeka 2021.

Mentor rada: *izv.prof.dr.sc. Gordana Čanadi Jurešić, dipl.ing.preh.teh.*

Diplomski rad obranjen je dana 24.09.2021. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. *izv.prof.dr.sc. Lara Batičić Pučar, dipl.sanit.ing.*

2. *dr.sc. Božena Ćurko-Cofek, dr.med.*

3. *izv.prof.dr.sc. Gordana Čanadi Jurešić, dipl.ing.preh.teh.*

Rad ima 88 stranica, 41 sliku , 10 tablica i 81 literaturni navod.

## ZAHVALA

*Prvenstveno, veliko hvala dugujem svojoj obitelji koja je u svakome trenutku vjerovala u mene i moj uspjeh, pa čak i kada ni sam nisam mogao u sebe vjerovati. Hvala Vam na izrazitoj ljubavi i strpljenju te podršci i razumijevanju. Hvala Vam što ste uvijek bili moj najveći oslonac u teškim trenucima.*

*Naravno, ovaj diplomski rad ne bih mogao izrealizirati bez svoje mentorice, izv.prof.dr.sc. Gordane Čanadi Jurešić, koju cijenim kao stručnjaka svojega polja, ali i čovjeka. Hvala Vam na prenesenome znanju, izrazitome strpljenju i vodstvu pri izradi diplomskoga rada te na izdvojenome vremenu, korisnim savjetima i potpori koji su mi omogućili najbolju realizaciju ovoga rada. Stvarali ste ugodnu radnu atmosferu i zračili pristupačnošću zbog koje nije postojalo nikakvo oklijevanje za potrebnim dodatnim pojašnjavanjima koje bih tražio od Vas. Ukratko, bili ste mentor kakvoga sam samo mogao poželjeti. Hvala Vam!*

*Također, zahvaljujem se svim profesorima i asistentima sa Zavoda za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju te Zavoda za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju na ugodnome boravku pri izradi eksperimentalnoga dijela diplomskoga rada te korisnim savjetima.*

*Naposljetku, kao šećer na kraju, želio bih izraziti zahvalu svojim „starim“, ali i „novim“ prijateljima koje sam upoznao tijekom ovoga petogodišnjega razdoblja, a koji su mi ovih pet godina boravka u Rijeci učinili najljepšim razdobljem mojega života te su me svaki puta uvjerali kako je dolazak Rijeka, uistinu, bio moj najbolji životni odabir. Ove divne uspomene će se zasigurno pamtili i, nadam se, nastaviti nadograđivati.*

*Rad je izrađen uz financijsku potporu Slovensko-hrvatskog bilateralnog projekta (IPS-2020-01-7418): „Utvrdjivanje pojavnosti, uzroka i štetnih učinaka oksidativnog stresa izazvanog uporabom fiksnih ortodontskih naprava“*

*Domagoj Sabadi*

## Sažetak

U današnje vrijeme ljudi su sve više opsjednuti “hollywoodskim” osmijehom kojega svi oblici medija svakodnevno serviraju na ovaj ili onaj način (filmovi, TV serije/emisije, socijalne mreže i sl.). Stoga, sve veći broj ljudi počinje koristiti ortodontske naprave, neznajući potencijalne štetne učinke koje njegove komponente mogu imati na čovjekov organizam. Otpuštanje iona metala iz ortodontskih materijala postaje sve veća zabrinutost ortodontskoga svijeta jer, osim uzrokovanja kontaktnoga dermatitisa, moguća je i pojava akutnog ili kroničnog otrovanja. Osim toga, ioni metala mogu uzrokovati oksidativni stres pomoću kojega će se manifestirati njihovi genotoksični i citotoksični učinci.

Cilj istraživanja bio je ispitati učinak otpuštenih iona (prvenstveno  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{4+}$  i  $\text{Cr}^{3+}$ ) na vitalnost i vijabilnost dva soja kvasca: *Saccharomyces cerevisiae* W303 i divlji tip. Istraživanje je odrađeno u dva dijela – na hranidbenoj podlozi (YPD) i umjetnoj slini. U svakoj su metodi korištene hranidbene podloge i uzorci umjetne sline s onom količinom iona otpuštenih iz ortodontskih bravica i prstenova kroz 3, 7 i 14 dana.

Vijabilnost je praćena promjenom broja stanica oba soja kvasca kroz 24 sata na tretiranim hranidbenim podlogama i uzorcima umjetne sline. Rezultati su iskazani preko krivulja rasta te prebrojenih stanica pomoću LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter-a. S druge strane, vitalnost je praćena promjenom metaboličke aktivnosti stanica dvjema metodama: prva – bojanjem stanica LIVE/DEAD Yeast Viability Kit-om i promatranjem stanica fluorescentnim mikroskopom, i druga – korištenjem XTT testa. Također, fluorimetrijskim mjerenjem unutarstanične oksidacije određena je i količina ROS-ova stvorenih u stanicama kvasaca kao posljedica aktivnog metabolizma i rasta na podlogama s iscrpinama metala.

Ioni ortodontskih bravica i prstenova utječu na vitalnost i vijabilnost oba soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, pogotovo na soj W303 u svim parametrima.

**Ključne riječi:** ortodontske bravice, ortodontski prstenovi, vijabilnost, vitalnost

## Abstract

Nowadays, people are getting more and more obsessed with the “Hollywood” smile that all forms of media serve in one way or another (movies, TV shows/series, social networks, etc.). Therefore, an increasing number of people are starting to wear orthodontic appliances, unaware of the potential harmful effects that its components could have on the human organism. The release of metal ions from orthodontic materials is becoming a growing concern of the orthodontic world because, in addition to causing contact dermatitis, acute or chronic poisonings are also possible to occur. In addition, metal ions can cause oxidative stress, by which their genotoxic and cytotoxic effects could be manifested.

The aim of this study was to examine the effects of released ions ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{4+}$  and  $\text{Cr}^{3+}$ ) on the vitality and viability of two yeast strains: *Saccharomyces cerevisiae* W303 and wild type. The research was done in two parts – on YPD growth media and in artificial saliva. Growth media and artificial saliva samples with the amount of ions released from orthodontic braces and brackets over 3, 7 and 14 days were used in each method.

Viability was observed by the change in the number of the cells of both yeast strains over 24 hour-growth in treated growth media and artificial saliva samples. The results were expressed via growth curves and counted cells using a LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter. On the other hand, vitality was observed by the change in cell's metabolic activity using two method. First – cell staining with the LIVE/DEAD Yeast Viability Kit, afterwhich the cells were microscoped using a fluorescence microscopy, and the second – XTT test. Also, fluorimetric measures of intracellular oxidation determined the amount of ROS generated in yeast cells as a result of active metabolism and growth on depleted media.

The ions of orthodontic braces and rings affect the vitality and viability of both strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, especially the W303 strain in all parameters.

**Key words:** orthodontic brackets, orthodontic bands, viability, vitality.

## Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Povijest ortodontije .....	2
1.2.	Revolucija ortodontije – „ <i>edgewise</i> “ .....	3
1.1.1.	Ortodontske bravice.....	5
1.1.2.	Ortodontski prstenovi .....	6
1.1.2.1.	Elektrokemijska korozija u ortodontiji .....	7
1.1.2.2.	Nikal (Ni).....	9
1.1.2.2.1.	Toksikologija nikla .....	11
1.1.2.2.2.	Oksidativni stres .....	12
1.1.2.2.3.	Toksični učinci nikla u ortodontiji.....	17
1.1.2.3.	Molibden (Mo) .....	18
1.1.2.3.1.	Toksikologija molibdena .....	21
1.1.2.4.	Krom (Cr) .....	22
1.1.2.4.1.	Toksikologija kroma.....	24
1.1.2.4.2.	Toksični učinci kroma u ortodontiji.....	26
1.1.3.	Kvasci .....	27
1.1.3.1.	Pekarski/pivski kvasac ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	30
2.	Cilj istraživanja .....	33
3.	Materijali i metode .....	34
3.1.	Materijali .....	34
3.1.1.	Radni kvasac .....	34
3.1.2.	Detalni materijali .....	34
3.2.	Uređaji, laboratorijski pribor i kemikalije.....	34
3.3.	Metode .....	35
3.3.1.	Priprema hranidbene podloge .....	35
3.3.2.	Nacjeppljivanje i uzgajanje kvasaca.....	36



3.3.3.	Priprema metalnih iscrpina (YPD) .....	36
3.3.4.	Priprema umjetne sline .....	36
3.3.5.	Priprema metalnih iscrpina (umjetna slina).....	37
3.3.6.	Protokol određivanja broja stanica kvasca .....	37
3.3.7.	Prebrojavanje stanica kvasca .....	39
3.3.8.	Određivanje krivulje rasta stanica .....	42
3.3.9.	Protokol određivanja metaboličke aktivnosti kvasca .....	42
3.3.10.	XTT test .....	44
3.3.11.	Protokol određivanja unutarstanične oksidacije .....	46
4.	Rezultati .....	47
4.1.	Određivanje vijabilnosti .....	47
4.1.1.	Određivanje krivulja rasta .....	47
4.1.2.	Određivanje vijabilnosti stanica prebrojavanjem stanica LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter-om.....	48
4.1.3.	Određivanje metaboličke aktivnosti.....	56
4.1.4.	Određivanje stanične proliferacije i citotoksičnosti XTT testom.....	60
4.2.	Određivanje unutarstanične oksidacije .....	63
5.	Rasprava.....	66
5.1.	Određivanje vijabilnosti .....	66
5.1.1.	Određivanje krivulje rasta .....	66
5.1.2.	Određivanje vijabilnosti stanica prebrojavanjem stanica LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter-om.....	68
5.1.3.	Određivanje metaboličke aktivnosti.....	69
5.1.4.	Određivanje stanične proliferacije i citotoksičnosti .....	71
5.2.	Određivanje unutarstanične oksidacije .....	72
6.	Zaključci .....	74
7.	Literatura.....	75
8.	Prilozi.....	84

8.1.	Popis slika.....	84
8.2.	Popis tablica.....	86
9.	Životopis .....	88

## 1. Uvod

Postoje brojni i snažni znanstveni dokazi da izgled lica i zubi osobe djeluju na percepciju i prosudbu drugih. Lijepo lice i atraktivan osmijeh povećavaju uspješnost zapošljavanja na određenoj poziciji (kao i performans na istoj), uspješnost u pronalaženju partnera, uspješnost dobre socijalne interakcije i sl. Ipak je u razgovoru, u većini slučajeva, pažnja sugovornika upravo usmjerena ili u oči ili u osmijeh sugovornika (59). Estetski privlačni zubi povezani su s dobrotom, popularnošću, inteligencijom te visokim socijalnim statusom. Također, dokazana je i činjenica da je razina zadovoljstva svojim osmijehom izravno povezana sa samopercepcijom i određenim psihološkim osobinama (1).

Stupovi estetskoga osmijeha su usne, zubi i desni, a njihov sklad presudan je faktor za estetski privlačan osmijeh (58). Unatoč velikome broju dokaza o važnosti privlačnoga osmijeha, o stvarnim se potrebama za estetskim liječenjima zuba uvijek govorilo kontroverzno zbog etičkih zabrinutosti te činjenica da nepravilno i neuspješno liječenje može imati ozbiljne posljedice na atraktivnost i dobrobit pacijenta. (1)



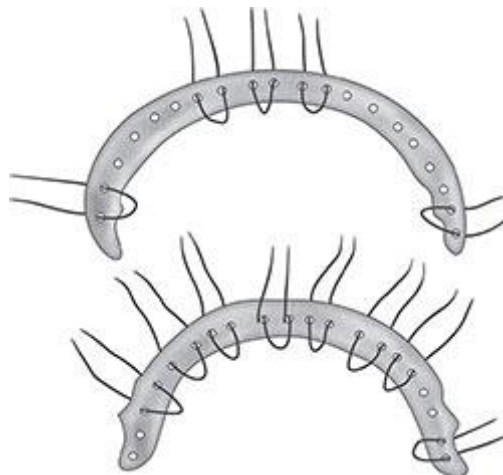
**Slika 1.** Estetski osmijeh unutar okvira lica. (58)

Potruga za poboljšanjem izgleda lica i zuba potječe još iz antičke povijesti. U 18. stoljeću stomatologija se razvila kao zasebna medicinska disciplina, olakšavajući tretiranje funkcionalnih i estetskih zubnih nedostataka. Kako su se preventivne mjere, materijali za zamjenu zuba i djelomične (kao i kompletne) tehnike izrade proteza godinama nakon neprestano unaprijeđivale, najznačajnija otkrića estetske stomatologije datiraju iz 20. stoljeća. Estetska stomatologija sama po sebi nije zasebna specijalizacija ili područje stomatologije, već predstavlja jedan od ciljeva stomatološkoga liječenja obuhvaćajući sva specijalna područja –

od preventivne i restaurativne stomatologije do stomatološke protetike, parodontologije, oralne i maksiofacijalne kirurgije te ortodontije (koja je i sami fokus ovog istraživanja). (1)

### 1.1. Povijest ortodontije

Ljudi su, od samoga početka ljudske povijesti, uspjeli razumijeti da se bez pravilnoga ugriza nije moglo preživjeti jer, ukoliko se hrana nije mogla sažvakati, nije se mogla niti jesti. Ostaci rimske, egipatske i etruščanske kulture ukazuju na korištenje različitih metala i „žica“ u svrhu izravnjavanja ili prilagodbe zubi za bolju funkciju. Grk Hipokrat (460.-377. g. pr. Kr.) je u svojem djelu „Corpus Hippocraticum“ opisivao nepravilnost zubi te okolno tkivo, dok je Aristotel (384.-322. g. pr. Kr.) u svojem djelu „De partibus Animalium“ uspoređivao zubnu formaciju tadašnjih životinja. Talijanski renesansni genije, Leonardo da Vinci (1452.-1517.), prvi je u povijesti uspio razumijeti formaciju zubi (njihov broj, formaciju korijena itd.) te da su najjači zubi, molari, namijenjeni za žvakanje, no ne i za kidanje/griženje hrane. Javljali su se i mnogi drugi filozofi/znanstvenici koji su promatrali malokluziju zubi, no 18. st. je razdoblje s većim otkrićima u području ortodontije. Francuski liječnik i otac moderne stomatologije, Pierre Fauchard (1679.-1761.), patentirao je prototip ortodontske naprave („bandelette“) 1723. g., čija je uloga bila proširenje zubnih lukova (60). Sastojala se od metalne trake koja se voskom i svilenim ligaturama sljepljivala na zube (62). Dizajn Fauchardove ortodontske naprave prikazana je na slici 2.



**Slika 2.** Prikaz „bandelette“, koju je dizajnirao Pierre Fauchard za proširenje zubnih lukova. (60)

Tijekom ostatka stoljeća, razvile su se još sitnih modifikacija u ortodontiji, no one najvažnije javljaju se, kao što je već rečeno, u 20. stoljeću.

## 1.2. Revolucija ortodontije – „*edgewise*“

Najdominantnijom i najutjecajnijom osobom u povijesti ortodontije, ali i „ocem moderne ortodontije“ smatra se Amerikanac Edward H. Angle (1855.-1930.). Zahvaljujući njemu, ortodontija se odvojila od ostalih grana stomatologije te je postala zasebna specijalizacija. (2)

Angleove inovacije, koje su imale najveći utjecaj na javno zdravstvo, su brojne. Identificirao je zubnu okluziju (pravilan kontakt zubnih kvržica unutar zubnih lukova) kao jednako važnu uz nepravilnost zuba. Razvio je jednostavni sustav klasifikacije okluzalnih stanja, a uveo je i montažne ortodontske aparate. Također, sam je i utemeljitelj prvog svjetskog obrazovnog programa za izobrazbu ortodontata. (4)

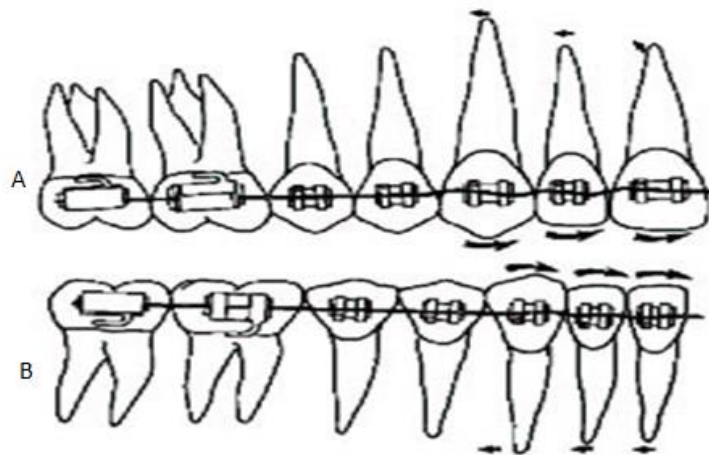


**Slika 3.** Edward H. Angle, otac moderne ortodontije. (61)

Kombiniranjem adhezivnog sustava sa žicama (lukovima), cjevčicama (tubama) prstenovima i bravicama, Angle 1928. godine osmišljava fiksnu napravu *edgewise* tipa. Doduše, standardni Angleov *edgewise* nije bio savršen, već je imao nekoliko mana. Bravice Angleove naprave bile su univerzalne, tj. sve bravice su bile jednakog oblika i jednakih dimenzija za svaki pojedini zub. Također, bravice nisu imale ugrađene informacije tj.

preskripcije koje opisuju kako je bravica (primarno slot) oblikovana (npr. koliko će žica, koja je postavljena u bravicu, izvući zub labijalno, a koliko će ga pustiti lingvalno). Uz to, najvećim nedostatkom smatrao se luk koji je bio unaprijed oblikovan prema idealnome obliku. To znači da se luk nije mogao dodatno manualno manipulirati, već se pacijentova usna šupljina morala prilagoditi obliku luka, a ne obrnuto jer svaka osoba zahtjeva različit oblik luka. (3)

Kako bi se taj problem popravio, Larry Andrews 1974. godine uvodi tehniku ravnoga luka. Kod tehnike ravnoga luka bravice postaju posebno izgrađene za svaki pojedini zub, a uz to, imaju u sebi ugrađene informacije. Također, kako i samo ime tehnike kaže, uvodi se luk kojega ortodont može sam savijati prema pacijentovim potrebama (što kod standardne *edgewise* naprave nije bio slučaj). (3)



**Slika 4.** Usporedba dvaju edgewise modela  
(slika A prikazuje Andrewsov luk, a slika B Angleov luk).

(izvor: <https://www.jco-online.com/archive/1989/03/142-the-transition-from-standard-edgewise-to-preadjusted-appliance-systems>)

Svi ti povijesni događaji su danas oblikovali fiksnu napravu edgewise tipa u onaj oblik kakav se danas koristi. Ortodonska terapija ovom fiksnom napravom prozvana je zlatnim standardom te u prosjeku traje 2-3 godine. Nanizani uspjesi ovakve terapije omogućili su svakodnevni porast terapija kojoj prilaze ljudi svih dobi (11). Doduše, ortodonske naprave svrstavaju se u biomaterijale, odnosno materijale koji se ugrađuju u čovjekovo tijelo. Zbog činjenice da takvi materijali budu dio čovjekova organizma određeni period (dani, tjedni, mjeseci, godine), od njih se očekuje da budu biokompatibilni, tj. da ne dolazi do neželjnih

nuspojava (citotoksičnost, genotoksičnost, korozija, alergija) na mjestu primjene (63). Upravo su takvi materijali česti predmeti istraživanja u području ortodoncije, ali i širega područja.

### 1.1.1. Ortodonske bravice

Ortodonske bravice smatraju se najbitnijim dijelom ortodonske naprave *edgewise* tipa. Sastoje se od nekoliko dijelova: tijela, baze s retencijom (koja je hrapava jer se na nju nanosi kompozitni materijal kojim se bravica fiksira na zub), slota (dio bravice u kojega se stavlja žičani luk), krilca (služe za stavljanje elemenata (najčešće gumenih i žičanih ligatura) koji povezuju žičani luk u bravicu) te kukica (nalaze se na očnjacima i služe za dodavanje dodatnih akcesornih elemenata) (64).



**Slika 5.** Ortodonska bravica zasebno (lijevo) i kao dio ortodonske naprave (desno).

(izvori: <https://www.orthodontist4u.com/blog/2015/03/29/orthodontic-history-part-3-156695> i <https://www.dentaltix.com/en/blog/brackets-orthodontics-how-choose-most-suitable-each-type-treatment>)

Svaka bravica zalemljena je ili zavarena na ortodonski prsten koji ili okružuje zub ili je izravno vezan za njega, a možemo ih podijeliti na metalne i keramičke. Metalne se bravice dijele na bravice od nehrđajućega čelika (koje su i ispitivane u ovome radu te sadrže 10-13% nikla, 2-2,5% molibdena i 16,5-18,5% kroma), bravice od nehrđajućega čelika s malo/bez nikla ili bravice od titana (65). Metalne bravice su kontinuirano (2 godine i više) izložene slini usne šupljine te bi stoga morale pokazati visoku otpornost na koroziju. Međutim, kloridni ioni, visoka koncentracija kisika i drugi faktori usne šupljine prisutni u slini otežavaju taj posao (6). Klasične bravice od nehrđajućega čelika posjeduju nikal u svome sastavu, za kojega su dokazani genotoksični učinci i izazivanje alergijskih reakcija. Stoga su bravice od nehrđajućega

čelika s malo/bez nikla dobra zamjena za tradicionalne bravice, no njihova mana je niža otpornost na koroziju od klasičnih bravica. Titanske bravice su iznimno biokompatibilne s čovjekovim organizmom i posjeduju visoku otpornost na koroziju, no imaju puno manju čvrstoću od gore navedenih bravica od nehrđajućega čelika te se brzo troše (65).

Iako te ortodontske bravice (najvećim dijelom izrađene od metala) imaju izuzetna mehanička svojstva, ipak nemaju estetska. Kako bi se riješio takav problem, ortodontske industrije počele su sve više širiti paletu materijala od kojih se izrađuju bravice. Tako su izrađene keramičke bravice koje su po prirodi prozirnog ili mliječno-bijelog izgleda (31). Također, korišteni su i drugi materijali, poput plastike i materijala na bazi polikarbonata, no zbog njihovih deformacija i diskoloracija tijekom tretmana, kao i niske tvrdoće, uporaba plastičnih bravica u ortodonciji postaje sve ograničenija (65), dok razgrađivanje polikarbonatnih bravica dovodi do neželjnog oslobađanja bisfenola-A (67). Klasične keramičke bravice imaju zadovoljavajuću tvrdoću, no problem se javlja kod dugotrajnoga boravka u orlanom okruženju kod kojega bravice stare i postaju lomljive. Kako bi se to poboljšalo, razvijaju se nove keramičke bravice s manjom apsorpcijom vode, čime se poboljšavaju mehanička svojstva, a zadržavaju prozirnost i biokompatibilnost (65).

### **1.1.2. Ortodontski prstenovi**

Ortodontski (molarni) prstenovi su dijelovi ortodontske naprave namijenjene za stražnje molare (kutnjake), a služe kao „sidrište“ žičanim lukovima koji prolaze kroz ortodontske bravice (69), ali i omogućavaju bolju retenciju i stabilizaciju same bravice (71). Izrađeni su od nehrđajućega čelika (prstenovi ovoga diplomskoga rada sadrže 17-19% kroma i 8-10,5% nikla), što ih čini iznimno izdržljivima i lako primijenjenima na zub. No, kao i kod ortodontskih bravica, u estetske su se svrhe razvili keramički te plastični (prozirni) ortodontski prstenovi (68).





**Slika 6.** Ortodontski prsten zasebno (lijevo) i primijenjen na zub (desno).

(izvori: [https://www.alibaba.com/product-detail/Orthodontic-Roth-Bands-with-Lingual-Cleat\\_1912713450.html](https://www.alibaba.com/product-detail/Orthodontic-Roth-Bands-with-Lingual-Cleat_1912713450.html) i <https://www.quora.com/What-is-an-orthodontic-band>)

Prije samog apliciranja ortodontskih prstenova potrebno je razdvojiti kutnjake pomoću elastičnoga separatora kojega pacijent nosi između zuba oko tjedan dana. Nakon toga, pacijentu se stavlja ortodontski prsten oko zuba te se njegova površina polira, nakon čega se prsten cementira (70). No, željeni ortodontski tretman može se postići i bez ortodontskih prstenova jer zubi nekih pacijenata zahtijevaju samo ortodontske bravice i žičane lukove. Ortodontski se prstenovi primjenjuju isključivo kod osoba sa širokim zubnim prazninama, iznimno neravnim ugrizom ili kod osoba starije životne dobi. Također, ortodontski se prstenovi mogu primijeniti i kod djece, čiji zubi nisu potpuno izrasli, što omogućava bolju izolaciju zuba (69).

Ipak, uz sve prednosti tijekom ortodontskoga tretmana, ortodontski prstenovi posjeduju i određenu manu, a to je rizik od nastajanja karijesa. Ortodont će najčešće savjetovati pažljivo i nježno četkanje dijela zuba s ortodontskom prstenom, a korištenje zubnoga konca se ne preporučuje. Budući da je zub potpuno okružen prstenom, sva hrana koja se zaglavi između prstena i zuba bude nedostupna za efikasno uklanjanje (68). Također, kao i svi metalni dijelovi ortodontske naprave, tako i ortodontski prstenovi tijekom tretmana mogu korodirati i otpuštati ione u usnu šupljinu i manifestirati određene simptome.

#### **1.1.2.1. Elektrokemijska korozija u ortodontici**

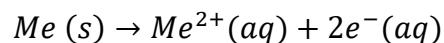
Različite karakteristike usne šupljine (slina, hrana, mikrobiološki i biokemijski produkti) čine ju izvrsnim mjestom za odvijanje elektrokemijske korozije. Usna se šupljina može promatrati kao jedan galvanski članak koji posjeduje elektrolit (slina) i elektrode (dijelovi ortodontskih naprava) (21). Riječ je o elektrokemijskom procesu koji rezultira gubitkom bitnih metalnih svojstava metala. Gotovi svi metali i legure su podložni koroziji (osim plemenitih

metala poput zlata, platine i sl.). Korozijom metala/metalnih dijelova dolazi do oslobađanja iona metala izravno u otopinu (u ovome slučaju u slinu) ili postupnim otapanjem površinskog filma (obično oksida ili sulfida) s metala (6). Općenito, elektrokemijska korozija nastupa kada se dva metala stave u vodljivu otopinu ili elektrolit, gdje elektronegativniji metal postaje anoda i oksidira, dok elektropozitivniji metal postaje katoda te se reducira. Pretpostavlja se da elektrokemijska korozija u ortodontici nastupa zbog prisustva različitih metala u dijelovima ortodonske naprave (5).

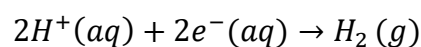
Elektrokemijska korozija se javlja intraoralno, bez obzira na metalnu strukturu legura. Svojstvo otpornosti nehrđajućega čelika na koroziju može se pripisati kromu i ovisi o pasivnome filmu (uz Cr sadrži i Fe i Ni) koji se spontano stvara (pasivizacija) u zraku te unutar tkivne tekućine (11). Nikal pridonosi čvrstoći filma te njegovoj otpornosti na koroziju, stvarajući soli s komponentama usne šupljine umjesto kroma, omogućavajući veću dostupnost kroma za stvaranje pasivnoga filma. No, ionska veza takvih soli nije jaka te često rezultira pucanjem, pri čemu dolazi do oslobađanja nikla u usnu šupljinu. S druge strane, molibden stabilizira krom te pruža daljnju zaštitu od stvaranja pukotina koje mogu dovesti do jamičaste korozije (57). Za stvaranje takvoga filma i njegovo održavanje potreban je kisik, dok blago kiseli okoliš i kloridni ioni mogu imati štetno djelovanje na njega. Osim navedenih čimbenika, štetan učinak na pasivni film mogu imati i ioni fluora ( $F^-$ ) koji su u velikim količinama zastupljeni u sredstvima za održavanje oralne higijene (11). Također, toplinska obrada lemljenjem narušava stabilnost zaštitnoga sloja pri spajanju dijelova ortodonske naprave (31), a upravo njegovim otapanjem/uništenjem nastupa korozija uz oslobađanje iona u usnu šupljinu. (7)

Svaka elektrokemijska korozija uključuje dvije reakcije – oksidaciju (otpuštanje elektrona) i redukciju (primanje elektrona), a redoks reakcija u usnoj šupljini može se sumirati na sljedeći način (20):

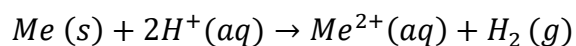
Anodna reakcija (oksidacija - otpuštanje elektrona):



Katodna reakcija (redukcija – primanje elektrona):



Sumirano:



Ljudska slina predstavlja nepovoljno elektrolitsko okruženje za ortodontske naprave, tj. njezine dijelove jer potiče koroziju. Riječ je o blago kiseloj, hipotoničnoj tekućini koja sadrži ione klora ( $Cl^-$ ), kalija ( $K^+$ ) i natrija ( $Na^+$ ) te dušikove okside i proteine. Oslobađanjem iona metala pri koroziji dolazi do promjene boje susjednih mekih tkiva i alergijskih reakcija kod osjetljivih pacijenata. Proizvodi korozije upleteni su u izazivanje alergijskih reakcija, boli ili oteklina u području ortodontske naprave u odsustvu infekcije, što može dovesti do sekundarne infekcije. Također, može doći i do citotoksičnih reakcija, poput smanjenja nekih enzimskih aktivnosti, ometanja biokemijskih puteva, karcinogenosti i mutagenosti. (8)

Na makroskopskoj razini, koroziju karakterizira povećana hrapavost površine materijala. koja je često kombinirana s taloženjem proizvoda korozije. Nadalje, korozija je kontinuirani proces s kumulativnim učinkom, što može dovesti do progresivnoga povećanja hrapavosti slota bravice ili nakupljanja proizvoda korozije tijekom vremena. Sve to može uzrokovati povećanu otpornost na trenje pri ortodontskoj mehanici klizanja, što će nepovoljno utjecati na napredak liječenja. (6)

Kako sama tehnologija napreduje, tako napreduju i modifikacije površina dijelova ortodontskih naprava. Potrebno je provoditi stalna istraživanja te odrediti kakve vrste korozija nastaju pri interakciji navedenih dijelova sa slinom te kojom se brzinom odvijaju, ali i koja vrsta iona se izlučuje i u kojim količinama. (21)

Kako bi se smanjio utjecaj korozije i količina otpuštanja iona, dijelovi ortodontskih naprava se prevlače različitim materijalima (teflon, polimeri, zlato) (21). Jedna od industrijskih alternativa kojom se sprječava korozija jest dodatak inhibitora u samu otopinu, koji bi reagirao s metalom tvoreći zaštitni film. No, budući da dodavanje inhibitora korozije u usnu šupljinu nije moguće, prirodni proteini sline mogu poslužiti kao inhibitori korozije. Tako, primjerice, amilaze i  $\gamma$ -globulini pokazuju inhibitorni učinak na koroziju, dok mucini pokazuju slabiji (gotovo nepostojeći) inhibitorni učinak. (6)

#### **1.1.2.2. Nikal (Ni)**

Nikal je srebrno-bijeli teški metal atomskoga broja 28, s relativnom atomskom masom od 58,71, čija gustoća iznosi  $8908 \text{ kg/m}^3$ . Riječ je o prijelaznome metalu, čija temperatura tališta iznosi  $1453 \text{ }^\circ\text{C}$ , dok temperatura vrelišta iznosi  $2732 \text{ }^\circ\text{C}$ . (5)

Nikal posjeduje siderofilna svojstva koja olakšavaju stvaranje legura nikal-željezo. Za razliku od topivih soli nikla (kloridi ( $NiCl_2$ ), nitrati ( $Ni(NO_3)_2$ ), sulfati ( $NiSO_4$ )), metalni nikal,

niklov sulfid (NiS) te niklovi oksidi (NiO) slabo su topljivi u vodi. Otporan je na koroziju zrakom, vodom i lužinama, ali se nikal lako otapa u razrijeđenim oksidacijskim kiselinama. Također, nikal posjeduje relativno visoku toplinsku i električnu vodljivost, kao i feromagnetska svojstva. (9)



**Slika 7.** Nikal.

(izvor: <https://batteryindustry.tech/tesla-offers-giant-contract-to-responsible-nickel-miners/>)

Nikal prvenstveno postoji kao prirodni element zemlje u sulfidnim ili oksidnim rudama koje se vade pod zemljom ili u otvorenim jamama (19). Koristi se u proizvodnji legura, čelika te baterija. Može se koristiti kao katalizator u kemijskoj i prehrambenoj industriji, a koristi se i u procesima galvanizacije. Također, nikal se koristi i u proizvodnji elektroničkih komponenata poput vakuumskih cijevi i tranzistora, ali i metalnih predmeta kao što su ratna oprema i stomatološki instrumenti (kao i ortodonske naprave). Što se tiče neindustrijske primjene, nikal se primjenjuje u proizvodnji kovanica, nakita, satova, okvira za naočale, kućanskih i kuhinjskih pribora i sl. (5).

Prosječna koncentracija nikla u tlu iznosi 5-500 ppm, no u sušenome mulju i u blizini rafinerija ta koncentracija može iznositi 24 000-53 000 ppm. Poljoprivredna tla sadrže otprilike 3-1000 mg nikla/kg tla. (9)

Razina nikla u okolišnom zraku je mala (oko 6-20 ng/m<sup>3</sup>), ali su veće razine (120-170 ng/m<sup>3</sup>) (5) prisutne u zraku zagađenom antropogenim izvorima. Primjeri takvih izvora su metalurške operacije koje uključuju visoke temperature, procesi izgaranja ili spaljivanja otpada i mulja iz kanalizacije, no najveći doprinos nikla u okolišnome zraku proizlazi iz izgaranja fosilnih goriva (9).

Divalentni nikal prevladavajući je oblik nikla u vodenim izvorima, ali mogu postojati i drugi oblici, ovisno o pH i pojavi organskih i anorganskih liganada. Nikal u površinskim i podzemnim vodama rezultat je razgradnje stijena i tla te taloženja nikla iz atmosfere. Lokalna industrijska ispuštanja također pridonose prisutnosti nikla u vodama (9). Utvrđeno je da se razina nikla u prirodnim nekontaminiranim slatkovodnim vodama te vodi iz slavine kreće u rasponu od 2-10 µg/L, a u morskoj vodi od 0,2-0,7 µg/L. Maksimalna dopuštena koncentracija nikla u vodi za piće iznosi 0,1 mg nikla/L. Prosječne razine nikla u vodi za piće kreću se u rasponu od 3-7 µg/L, no koncentracije mogu doseći i vrijednost od 35 µg/L. Međutim, koncentracija nikla u vodi za piće na području rudnika nikla doseže i do 200 µg/L (5).

Nikal se može pojaviti u namirnicama biljnoga i životinjskoga podrijetla. Tako, primjerice, povrće poput mahunarki, špinata i salate te orašastih plodova sadrže više nikla od ostalih prehrambenih proizvoda. Drugi prehrambeni izvori nikla uključuju prašak za pecivo, kakao u prahu te kisela pića (sok od narandže/jabuke/ananasa/grožđa, limunada, coca-cola i sl.). (5)

#### **1.1.2.2.1. Toksikologija nikla**

Što se tiče toksikokinetike nikla, ona je vrlo jednostavna. Apsorpcija se vrši ingestijom, inhalacijom i transdermalno. Nakon ingestije, apsorpcija teško topljivih spojeva nikla te metalnoga nikla u gastrointestinalnome traktu vrlo je mala. Međutim, apsorpcija topivih spojeva nikla (kloridi, nitrati, sulfati) vrlo je brza, no dokazano je da gastrointestinalni trakt apsorbira gotovo 40 puta manje niklovihi spojeva iz hrane nego iz vode. Gotovo 20% inhaliranog nikla se apsorbira u respiratornome traktu, od čega se 30% nikla taloži u plućima (5). Kada je u pitanju transdermalna apsorpcija nikla, ona je uzrokovana oslobađanjem soli nikla iz nakita znojem ili iz ortodontskih naprava slinom (9). Postoji nekoliko transportnih proteina za nikal. Donedavno se transport nikla prvenstveno prepisivao albuminu (kao glavnom krvnom transportnom proteinu za nikal) te nikeloplazminu ( $\alpha_2$ -makroglobulin). Međutim, dokazano je da u transportu nikla sudjeluju i proteini vezani za transportere željeza. Transferin, jedan od glavnih proteina uključenih u stanični unos željeza, također veže nikal, vanadij i druge metale. Još jedan transport-protein željeza, divalentni transporter metala (DMT1), transportira nikal, mangan, kobalt, bakar i cink. Dakle, nikal se može natjecati sa željezom za ulazak u stanice, no dovoljan unos željeza može ograničiti apsorpciju nikla (5). Ciljni organ akumulacije nikla je prvenstveno bubreg, a potom pluća, mozak te gušteraća. Primarni organ eliminacije nikla iz organizma jest bubreg, i to preko mokraće. Nikal se također može eliminirati znojem i slinom, što značajno može pridonijeti eliminaciji u vrućem okruženju (9).

Akutno otrovanje niklom kod ljudi najčešće podrazumijeva inhalaciju para niklova karbonila  $[\text{Ni}(\text{CO})_4]$  (12). Riječ je o bezbojnoj hlapljivoj tekućini koja je međuprodukt Mondova postupka rafiniranja nikla, a koristi se kao katalizator u naftnoj industriji (13). Razlikujemo dvije vrste simptoma: trenutne i odgođene simptome. Trenutni simptomi akutnog otrovanja traju od nekoliko sati do nekoliko dana, a uključuju mučninu, povraćanje, vrtoglavicu, iritaciju. Trenutne simptome slijede odgođeni simptomi poput stalnoga kašlja, boli u prsima, dispneje, cijanoze, tahikardije, poremećaja vida, slabosti te pojačanog znojenja (12). Pored patoloških lezija na plućima i mozgu, lezije su prisutne i na bubrezima, nadbubrežnim žlijezdama, slezeni te jetri. Osim toga, znanstvenici su dokazali teratogeni učinak nikal-karbonila zbog njegove mogućnosti prolaska kroz placentarnu membranu. Potomci izloženih ženki štakora razvile su očne anomalije poput anoftalmije i mikroftalmije, no moguće je i javljanje spontanijeh pobačaja (13, 15). Liječenje akutnog otrovanja nikal-karbonilom provodi se davanjem kelata Na-dietil-ditiokarbamata intramuskularno ili per os (14). S druge strane, postoje i slučajevi akutnog otrovanja anorganskim niklom, iako nisu toliko brojni. U tome slučaju nastupaju simptomi poput eritema, midrijaze, tahikardije, plućne kongestije, kome i srčanoga zastoja (9).

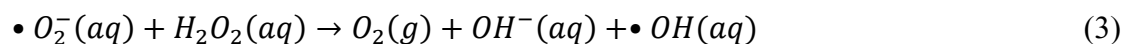
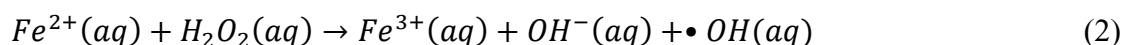
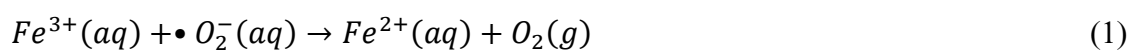
Kada je u pitanju kronično otrovanje niklom i njegovim spojevima, priča je nešto drugačija. Izloženost na radnome mjestu niklovoj prašini ili parama nikla (koje nastaju zavarivanjem legura nikla) najčešći su putevi kroničnog izlaganja ljudi. Kronično udisanje prašine i aerosola doprinosi pojavi respiratornih poremećaja (astma, kronični bronhitis, kronični i hipertrofični rinitis i sinusitis i sl.) (9, 12). Osim toga, postoji opasnost od pojave karcinoma bubrega (rijetko), grkljana, pluća, želuca te sluznice nosa i paranazalnih sinusa, ali i pojave sarkoma mekoga tkiva (13). S druge strane, u općoj populaciji nikal je jedan od najčešćih uzročnika kontaktnoga dermatitisa (12). Upravo su žene češće pogođene takvim dermatitisom zbog veće izloženosti nakitu (uključujući i *piercing*), ručnim satovima i sl. (9). Postoji i profesionalna dermatoza uzrokovana kroničnom izlaganju niklu, a to je ekcem galvanizera kojega karakteriziraju osip, svrbež, peckanje i bolovi (14).

#### **1.1.2.2.2. Oksidativni stres**

Reaktivne vrste kisika (ROS) okidači su oksidativnoga stresa, a tu aktivnost im omogućuje nespareni elektron u vanjskoj ljusci koji ih čini vrlo reaktivim molekulama (18). Osim jednog (ili više) visoko reaktivnog atoma kisika, koji je u djelomično reduciranom stanju, karakteriziraju ih i kratko poluvrijeme života te jako oksidacijsko djelovanje. Općenito je riječ o heterogenoj skupini tvari koja uključuje radikale (superoksidni anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), hidroksilni

radikal ( $\bullet\text{OH}$ ) i dušikov oksid ( $\text{NO}\bullet$ ) i neradikale (vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ), hipoklorična kiselina ( $\text{HClO}$ ) i peroksinitrit ( $\text{NO}_3^-$ )). (22)

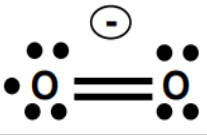
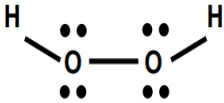
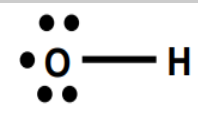
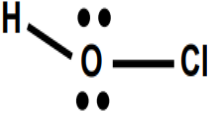
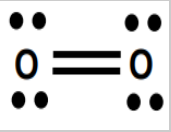
Općenito, ROS-ovi nastaju kada se stanice izlože metalima koji mogu dovesti do stanja hipoksije. U ovome slučaju, izloženost niklu uzrokuje stvaranje ROS-ova tako što ion nikla ( $\text{Ni}^{2+}$ ) istiskuje ion željeza ( $\text{Fe}^{2+}$ ) iz prenositelja kisika – Fe(II)-hibridnog hemoglobina - što će i dovesti do stanja hipoksije, a ujedno i do aktiviranja transkripcijskog faktora HIF1 (čimbenik 1 induciran hipoksijom) (15). Dakle, ROS-ovi su proizvodi aerobnoga metabolizma i nastaju djelovanjem respiratornoga lanca ili drugih staničnih enzima poput nikotinamid adenin fosfatoksidaze (NOX), ksantin oksidaze (XO), lipoksigenaze (LOX), ciklooksigenaze (COX) i dušikov oksid sintaze (NOS). Superoksidni anion nastaje redukcijom jednog elektrona molekularnoga kisika i predstavlja preteču većine ROS-ova. Dismutacija  $\bullet\text{O}_2^-$  dovodi do stvaranja  $\text{H}_2\text{O}_2$  spontanom reakcijom u vodenoj otopini ili reakcijom koja je katalizirana superoksid dismutazom (SOD). Jednom nastali vodikov peroksid može prijeći u visoko reaktivne hidroksilne radikale pomoću Haber-Weissove reakcije (reakcija 1) u kojoj redoks-ciklički metal  $\text{Fe}^{2+/3+}$  djeluje kao akceptor elektrona superoksidnog aniona, stvarajući molekularni kisik. Potom, u Fenton reakciji (reakcija 2) taj metal djeluje kao donor elektrona i dovodi do razgradnje vodikova peroksida (22). Također, Fenton reakcija može se općenito gledati kao izvor hidroksilnih radikala, što je i vidljivo iz jednadže 2 (56). Neto reakcija (reakcija 3) prikazuje potrošnju jednoga vodikova peroksida i superoksidnog aniona, iz kojih nastaju jedna molekula kisika, jedna molekula hidroksidnog aniona te jedna molekula hidroksilnoga radikala.



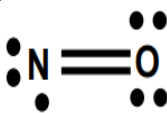
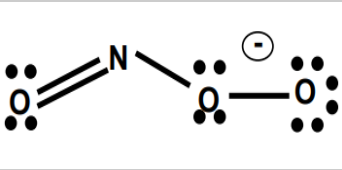
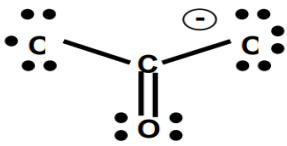
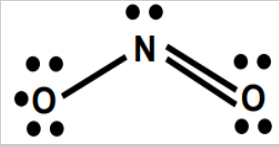
Hipoklorična kiselina ( $\text{HClO}$ ) nastaje iz vodikova peroksida djelovanjem enzima mijeloperoksidaze, dok singletni kisik (privremeno pobuđeno stanje molekularnoga kisika) nastaje prirodnim fotokemijskim i fotobiološkim reakcijama. Zanimljivo je to što se upravo taj singlet kisika smatra odgovornim za odvijanje degenerativnih pojava poput fotodegradacije, starenja i fotokarcinogeneze. Na kraju, dušikov oksid ( $\text{NO}\bullet$ ) nastaje oksidacijom L-arginina u L-citrulin djelovanjem dušikov oksid sintaze. Nastali dušikov oksid brzo reagira sa singletom

kisika, stvarajući fiziološki oksidans peroksinitrit ( $\text{NO}_3^-$ ), koji dalje reagira s različitim biomolekulama, uključujući i  $\text{CO}_2$ , stvarajući karbonatne radikale ( $\bullet\text{CO}_3^-$ ) te dušikov dioksid ( $\bullet\text{NO}_2$ ). (22)

**Tablica 1.** Prikaz najčešćih reaktivnih vrsta kisika. Lijevi stupac prikazuje strukturne formule, srednji stupac naziv i kemijsku formulu, a treći stupac njihovo metaboličko podrijetlo.

STRUKTURNA FORMULA	NAZIV I KEMIJSKA FORMULA	METABOLIČKO PODRIJETLO
	<b>SUPEROKSIDNI ANION</b> ( $\bullet\text{O}_2^-$ )	-mitohondrijska respiracija -NOX, NOS, XO
	<b>VODIKOV PEROKSID</b> ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	-SOD -NOX4, DUOX1 i DUOX2
	<b>HIDROKSILNI RADIKAL</b> ( $\bullet\text{OH}$ )	-reakcija $\text{H}_2\text{O}_2$ s $\text{Fe}^{2+}$ ili $\text{Cu}^{2+}$
	<b>HIPOKLORIČNA KISELINA</b> ( $\text{HClO}$ )	-MPO
	<b>SINGLETNI KISIK</b> ( $^1\text{O}_2$ )	-prirodna fotokemijska i fotobiološka reakcija
	<b>DUŠIKOV OKSID</b> ( $\text{NO}\bullet$ )	-NOS



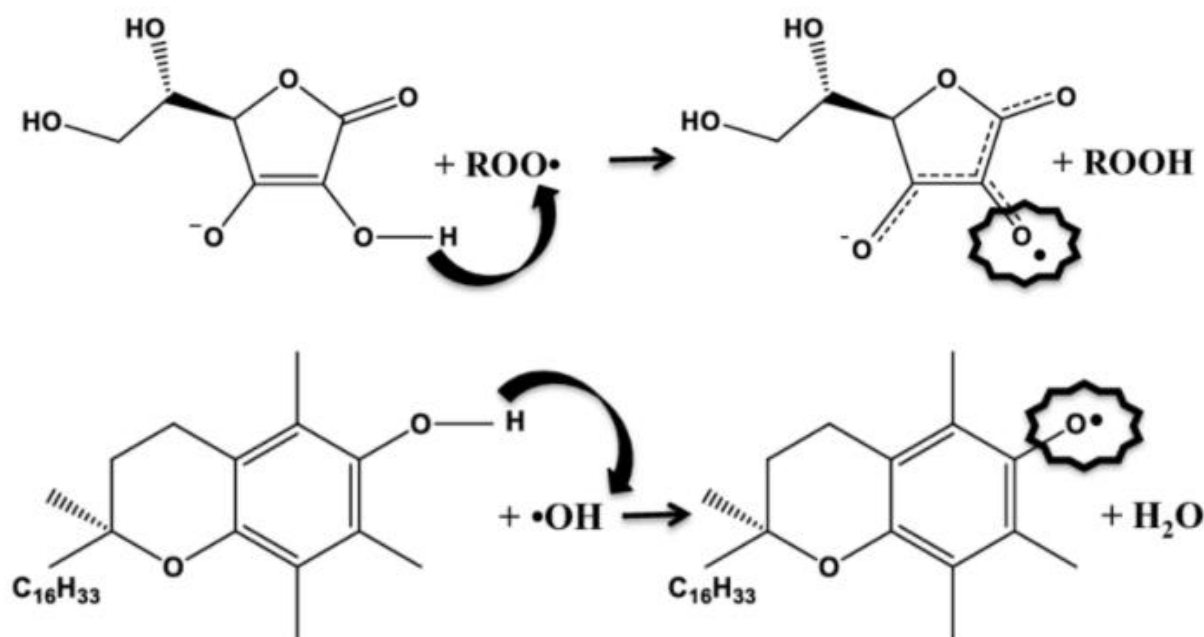
		
	<b>PEROKSINITRIT</b> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	-reakcija NO s •O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
	<b>KARBONATNI RADIKAL</b> (•CO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	-reakcija NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> s CO <sub>2</sub>
	<b>DUŠIKOV DIOKSID</b> (•NO <sub>2</sub> )	-reakcija NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> s CO <sub>2</sub>

Oksidativni stres uzrokovan niklom poprilično je slab, no trošenje glutationa (GSH) te aktivacija transkripcijskih faktora ne mogu se zanemariti kao mogući pokazatelji oksidativnoga stresa (12). Stvaranje ROS-ova popraćeno je reakcijama kao što su lipidna peroksidacija, oštećenje makromolekula (DNA, proteini, lipidi) te oštećenje ili smrt (apoptoza) stanica. Lipidnu peroksidaciju uzrokuju slobodni radikali, a sami proces podrazumijeva oksidaciju i raspadanje višestrukonezasićenih masnih kiselina iz stanične membrane na vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidroksilne radikale te malondialdehid (MDA), koji posjeduje kancerogeni, mutageni i genotoksični učinak (16). Općenito, višestrukonezasićene masne kiseline vrlo lako otpuštaju svoj elektron pa se to može uzeti kao potencijalni razlog lakoj oksidaciji i stvaranju radikala. (19).

Kao što je već spomenuto, sam nikel uzrokuje slabi oksidativni stres, no pojačanom učinku može pridonijeti njegovo stvaranje kelata s ligandima koji posjeduju histidin ili cistein (15). Takvim stvaranjem kompleksa Ni<sup>2+</sup> oksidira u Ni<sup>3+</sup>, koji se smatra glavnim uzročnikom pojačanog oksidativnog stresa (17). *In vitro* studije na ljudskim limfocitima dokazale su kako nikel uistinu uzrokuje pojačano stvaranje vodikova peroksida i lipidnih peroksidaza u limfocitima, uzrokujući smrt limfocita (19). No također je dokazano kako katalaze (endogeni antioksidativni enzimi koji razgrađuju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na vodu i kisik) (CAT) (22, 12), GSH (jaka reduktivna aktivnost tiolne skupine cisteinskog ostatka) (22), manitol te superoksid dismutaza

(SOD) ometaju daljnje stvaranje ROS-ova (12, 15). Iako SOD sudjeluje u dismutaciji superoksidnog aniona u vodikov peroksid, ona kao međuprodukt stvara i supstrat katalaze, što ju čini presudnom u procesu detoksikacije ROS-ova.

Zbog okoline koja je bogata kisikom, reakcije makromolekula sa slobodnim radikalima praktički su neizbježne (19). Ljudski organizam posjeduje obrambeni antioksidativni sustav koji nadzire koncentraciju ROS-a u normalnim fiziološkim uvjetima. Ipak, pojačano stvaranje ROS-ova može svladati antioksidativne mehanizme i dovesti do stanja oksidativnoga stresa, što može dovesti do staničnog oštećenja koje je uzrokovano eikozanoidima čija se produkcija povećava stimulacijom fosfolipaze A2 pri povećanoj lipidnoj peroksidaciji (15). Egzogeni antioksidansi (poput hidrofilnog vitamina C (askorbinska kiselina), djelujući s lipofilnim vitaminom E (tokoferol)) preveniraju oštećenje stanica oksidativnim stresom tako što prekidaju lančanu reakciju. (19). To svojstvo im je omogućeno zbog posjedovanja aromatskoga prstena koji može primiti nesporeni elektron ROS-a, pri tome dajući ROS-u njihov atom vodika. Time dolazi do stvaranja ili vode ili stabilne hidroksilne molekule (slika 8) (22).



**Slika 8.** Mehanizam djelovanja vitamina C (gornja slika) i vitamina E (donja slika) pri detoksikaciji molekule ROS-a. (22)

Antioksidativni potencijal vitamina C i E sudjeluje i u zaštiti kardiovaskularnoga sustava od pojave neurodegenerativnih bolesti poput ateroskleroze (22). No, prekomjerne doze

askorbinske kiseline mogu dovesti do stvaranja završnih produkata glikozilacije koji proizlaze iz razgradnje lipida, ugljikohidrata te askorbinske kiseline. Ti produkti mogu dovesti do nastajanja niza patoloških stanja (posebice dijabetesa i poremećaja bubrega) pa je stoga potrebno pripaziti pri unosu vitamina C i držati se preporučenih doza unosa (19). No, osim vitamina C i E, postoje i drugi egzogeni antioksidansi koji mogu sudjelovati u borbi protiv negativnih učinaka ROS-ova, kao što su fenoli, flavonoidi, karotenoidi te steroidi. Navedene se komponente mogu pronaći u namirnicama kao što su grožđe, zeleni čaj, ružmarin, ginko, đumbir, cikla i češnjak (22).

### **1.1.2.2.3. Toksični učinci nikla u ortodontiji**

Nikal je najčešći metal koji uzrokuje kontaktni dermatitis u ortodontiji. Legure nikla, poput nikal-titan legure i nehrđajućega čelika široko su rasprostranjene u ortodontiji (ponajviše kod ortodontskih naprava). Udio nikla u leguri nikal-titan prelazi čak 50% pa se alergijske reakcije češće pojavljuju kod primjene materijala koji u svome sastavu imaju leguru nikal-titan (10). Iako su oba metala zastupljena u podjednakim omjerima, ipak se ioni nikla otpuštaju u većoj koncentraciji od iona titana ( $Ti^{4+}$ ). Fiksna ortodonska naprava dnevno otpusti oko 40  $\mu g$  nikla, no taj iznos s vremenom opada kako terapija prolazi. Također, dokazano je da pH sline te prisustvo fluorida ( $F^-$ ) iz vodice za ispiranje usne šupljine pridonose većem otpuštanju niklovih iona (11), ponajviše zbog povišenja pH vrijednosti nakon apliciranja vodice (30). S druge strane, udio nikla u nehrđajućem čeliku iznosi oko 8% pa su pojave alergijskih reakcija kod ortodontskih materijala od nehrđajućega čelika vrlo rijetke. Razlog tome je taj što je nikal čvrsto zarobljen u kristalnoj rešetci te nije dostupan za reakciju s drugim metalima koji bi uzrokovali njegovu koroziju (10).

Alergijska reakcija odgovor je imunološkog sustava na stranu tvar. U ovome slučaju, nikal izaziva kontaktni dermatitis, koji je odgođeni imunološki odgovor preosjetljivosti tipa IV. Simptomi, kao što je prikazano na slici 7, mogu biti intraoralni (stomatitis od blagog do pojačanog eritema, gubitak okusa ili pojava metalnog okusa, utrnulost usne šupljine te peckanje, bolnost na bočnim stranama jezika, kutni heilitis i gingivitis) i ekstraoralni (generalizirana urtikarija, prošireni ekcem te bol na mjestu ekcema, crvenilo gingive i usana (29).



**Slika 9.** Intraoralna (lijevo) i ekstraoralna (desno) alergijska reakcija na nikal kao komponente ortodonske naprave *edgewise* tipa. (22)

Smatra se da se osjetljivost na nikal može povećati mehaničkom iritacijom, maceracijom kože ili ozljedom sluznice usne šupljine (što se sve može dogoditi u ortodontskom liječenju). Doduše, alergija na nikal se može prethodno dijagnosticirati ukoliko je pacijent imao pojave simptoma alergije nakon nošenja naušnica/satova s metalnom narukvicom (33) ili ukoliko se pojave simptomi alergije nedugo nakon početnog umetanja ortodontskih komponenata koje sadrže nikal. U slučaju potvrđene alergije, bravice od nehrđajućeg čelika se smiju koristiti zbog već spomenutog malog udjela nikla u svome sastavu (10).

### **1.1.2.3. Molibden (Mo)**

Molibden se smatra esencijalnim elementom (u tragovima) za mikroorganizme, biljke, životinje i čovjeka. Otkrio ga je švedski kemičar Karl Scheele 1778. godine (37), a izolirao francuski kemičar Henri Moissan 1893. godine (9). Riječ je o prijelaznome metalu srebrno-bijele boje ili crno-bijelome prahu, čija atomska masa iznosi 95,94, a gustoća  $10200 \text{ kg/m}^3$  (5). Visoka toplinska vodljivost, niska specifična toplina zagrijavanja te visoke temperature vrelišta ( $4612 \text{ }^\circ\text{C}$ ) i tališta ( $2617 \text{ }^\circ\text{C}$ ) omogućuju mu upotrebu u proizvodnji svemirskih vozila, raketa i ratne artiljerije (35). Osim toga, molibden pronalazi upotrebu u legiranju nehrđajućega čelika i lijevanoga željeza (povećava otpornost na koroziju, čvrstoću i toplinsku vodljivost) (9), u kemijskoj industriji kao katalizator, proizvodnji gnojiva za mahunarke (5), proizvodnji anoda te rešetki i nosača za niti u žaruljama i elektroničkim cijevima (35).



**Slika 10.** Molibden.

(izvor: <https://www.livescience.com/34687-molybdenum.html>)

Molibden se u prirodi ne pojavljuje kao metal, već u obliku ruda (npr. molibdenit, jordicit, vulfenit) (41) Oksidacijska stanja molibdena variraju od -2 do +6 (5), a pri nižim oksidacijskim stanjima poprima bazični karakter, dok pri višim stanjima kiseli. Najstabilniji oblik je pri najvišem oksidacijskom stanju, tj. +6. Iznimno je otporan na većinu kaustičnih otopina, kao i na klorovodičnu, sumpornu te fluorovodičnu kiselinu. Vodena para, sumporov dioksid te dušikov oksid oksidiraju molibden pri visokim temperaturama, dok je pri niskim temperaturama molibden kemijski inertan pod djelovanjem ugljikova dioksida i dušika (35).

Kao što je već rečeno, molibden je esencijalni element za normalnu funkciju organizma. Prvenstveno, molibden biljkama i mikroorganizmima omogućuje redukciju nitrata u nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) te fiksaciju dušika u ciklusu dušika (40). S druge strane, molibden je iznimno bitan za normalnu funkciju četiriju enzima čovjekova organizma tijekom djetinjstva, a svaki od tih enzima kataliziran je tricikličkim molibdenskim kofaktorom (Mo-Co) koji, osim molibdena, sadrži pterin, ditiolen te piranski prsten. Prvi takav enzim je sulfat oksidaza, koja se nalazi u mitohondriju (37) i odgovorna je za metaboličku razgradnju sumpornih aminokiselina (cistein i metionin), oksidirajući sulfatnu skupinu u sulfatnu i oksidirajući  $\text{Mo}^{6+}$  u  $\text{Mo}^{4+}$  (5). Drugi enzim je ksantin oksidaza, koja je najvećim dijelom prisutna u jetri, plućima, bubrezima i crijevima (36). Glavna joj je uloga prevođenje hipoksantina u ksantin, a potom ksantina u mokraćnu kiselinu. Ukoliko je aktivnost ovog enzima narušena, hipoksantin, koji je spontano nastao deaminacijom adenina, će se spariti s citozinom (umjesto s timinom) i uzrokovati DNA mutacije. Treći enzim, aldehid oksidaza, najvećim je dijelom prisutna u jetri (37), gdje sudjeluje u prvoj fazi biotransformacije lijekova, kao što je alopurinol (antihiperuricemik) (36). Četvrti i posljedni enzim je novootkriveni mARC (mitohondrijski amidoksim), koji surađuje s

citokromom b<sub>5</sub> tipa B i NAD(H) citokrom b<sub>5</sub> reduktazom, smanjujući raznolikost N-hidroksiliranih supstrata.

Preporučeni dnevni unos molibdena iznosi oko 0,15-0,5 mg/danu za odrasloga čovjeka. Dokazan je negativan učinak prehrane osiromašenom molibdenom kod koza (smanjena reprodukcija i preživljavanje fetusa) i pilića (smanjeno preživljavanje fetusa i abnormalan rast mladih) (36). Osim toga, smanjeni unos molibdena može rezultirati mutacijom molibdenskih enzima u čovjeka zbog nemogućnosti sinteze molibdenskoga kofaktora, iako se takav slučaj javlja u 1/100 000-200 000 ljudi. Stanje je karakterizirano poteškoćama u hranjenju te ozbiljnim kašnjenjem u razvoju. S godinama stanje može prijeći u neurodegenerativan oblik i konačno - rezultirati smrću u djetinjstvu (37). Primjer mutacije molibdenskog enzima (sulfid oksidaze) datira iz 1967. godine u mentalno zaostalo djeteta s konvulzijama, grčevima mišića i dislokacijom leće (39). Stoga, molibden je esencijalni element za normalan razvoj i funkciju čovjeka i može se pronaći u različitim namirnicama. Najbogatijim izvorom molibdena smatraju se grah, grašak, žitarice (pšenica, zob) i riža, lisnato povrće te mahunarke (9, 36). Jetra i bubrege se, također, mogu smatrati dobrim izvorom molibdena, a mlijeko i mliječni proizvodi, iako ne toliko bogati izvori, su glavni izvor molibdena tijekom odrastanja. Molibden se, osim što omogućuje normalan razvoj organizma, uzima kao suplement u liječenju određenih stanja, točnije Wilsonove bolesti. Razlog nastajanja bolesti leži u akumulaciji bakra u tkivima (umjesto da je vezan za ceruloplazmin), oštećujući jetru, živčani sustav te mozak. Molibden stvara kompleks s bakrom i ceruloplazminom te tako sprječava bakrovo daljnje akumuliranje u tkiva (37).

U okolišu (voda, zemlja, zrak) molibden se može pronaći zahvaljujući antropogenim izvorima. Primjerice, rad industrija, komunalni kanalizacijski mulj te izgaranje ugljena smatraju se glavnim antropogenim izvorima molibdena (9). Koncentracije molibdena u zraku urbanoga područja (0,01-0,03  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) veće su od koncentracija u zraku ruralnoga područja (0,001-0,003  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ). U prosjeku, koncentracije molibdena u tlu iznose oko 0,1-10 mg/kg tla (5), no taj broj ovisi o prirodi tla. Primjerice, kisela tla su poprilično siromašna molibdenom (0,2 mg/kg), dok su sedimentna tla bogatija (0,7 mg/kg). Osim toga, molibden kontaminira komunalnu kanalizacijsku mulj preko tla, a koncentracije mogu iznositi između 1-40 mg/kg suhe tvari. Koncentracije molibdena u oceanima iznose otprilike 0,01 mg/L, a koncentracija u površinskim vodama blizu industrija može iznositi 0,02-0,04 mg/L, dok u podzemnim vodama do 25 mg/L. Visoke vrijednosti pH poboljšavaju topljivost i ispiranje molibdena, dok kiseli pH oslabljuje prijenos molibdena iz tla u vode (9).

### 1.1.2.3.1. Toksikologija molibdena

Hidrofilni spojevi molibdena, poput molibdenova trioksida ( $\text{MoO}_3$ ), brzo se apsorbiraju kroz pluća i gastrointestinalni trakt, dok se hidrofobni sulfidi i hidroksidi sporije apsorbiraju. Čestice promjera  $> 5 \mu\text{m}$  talože se u gornjim dišnim putevima (izvantorakalne, traheobronhijalne regije) iz kojih se mukocilijarnim transportom prenose u gastrointestinalni sustav. Čestice promjera  $< 5 \mu\text{m}$  talože se u plućnoj regiji (terminalni bronhioli i alveole), iz kojega se u krvotok prenose apsorpcijom, limfnom drenažom, fagocitozom ili migracijom makrofaga. Osim inhalatornog otrovanja, čovjek se može otrovati molibdenom i per os. Dokazano je da se više molibdena (94%) apsorbira ukoliko je unesen pićem, dok je taj postotak nešto manji kada je unesen hranom (83%) (25). Nakon apsorpcije, molibden se brzo pojavljuje u krvi, gdje se veže za  $\alpha_2$ -makroglobuline u obliku molibdata ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) ili za proteine membrane (spektrine) eritrocita, i distribuira po tijelu. Najveće razine molibdena najčešće su pronađene u dugim kostima i hrskavicama (5), jetri, slezeni i bubrezima (41). Molibden, također, može reagirati i s kožnim kolagenom, kojemu mijenja mehaničko-kemijska svojstva. Najveće koncentracije molibdena u zubima pronađene su u dentinu i cementu, a manjim dijelom u caklini (5). Istraživanja na ljudima i životinjama dokazala su prisustvo molibdena u majčinome mlijeku, ali i sposobnost molibdena da prolazi kroz transplacentarnu membranu (25). Oblici molibdena, koji interferiraju s enzimskim sustavom biotransformacije, su  $\text{Mo}^{6+}$  i  $\text{MoO}_4^{2-}$ . Nakon što se molibdat unese u stanicu, on se ugrađuje u molibdopterin, tvoreći molibdinski kofaktor (Mo-Co), koji dalje zadovoljava potrebe staničnih enzima ovisnih o molebdinskom kofaktoru. Molibdat, također, tvori komplekse s bakrom i sulfatom te se veže na proteine plazme u obliku bakar-molibden-sumporovog (Cu-Mo-S) kompleksa (25). Molibden se poprilično brzo eliminira iz organizma. Prisutnost visokih razina bakra i sulfata u prehrani pojačavaju eliminaciju molibdena blokirajući proteinske nosače te inhibirajući tubularnu reapsorpciju molibdena (9). Iako je eliminacija mokraćom primarni put eliminacije, eliminacija stolicom također može biti prisutna (40). Pri velikoj apsorpciji molibdena, taj omjer iznosi otprilike 90 (mokraća) : 10 (stolica). Izvor molibdena u stolici je djelomično neapsorbirani molibden i djelomično endogeni molibden, koji se izlučuju u gastrointestinalni sustav putem žuči (5).

Kako bi došlo do akutnog otrovanja molibdenom u čovjeka, potrebno je unijeti ogromne količine molibdena u organizam (41). Iako su takva otrovanja iznimno rijetka, to ne znači da se ne mogu pojaviti. Primjerice, kako opisuje Momčilović (1997.), u slučaju prekomjernog unosa molibdena *per os* javljaju se sljedeći simptomi: anksioznost, uznemirenost, psihotične

halucinacije, nesanice, epileptični napadaji, dijareja i bolovi te hladnoća ekstremiteta. Nakon nekog vremena, navedeni simptomi mogu prijeći u depresiju i poremećaj seksualne funkcije, a potom u poteškoće s pamćenjem i učenjem. Uzrok ovakvim simptomima je molibdenovo naseljavanje masnog tkiva mozga. Njegovim naseljavanjem sive tvari mozga dolazi do razgradnje različitih neurotransmitera te proizvodnje štetnih proteina koji uzrokuju gore navedene simptome. S druge strane, simptomi kroničnog otrovanja molibdenom očituju se smanjenim apetitom, općom slabošću i umorom, gubitkom težine, glavoboljom, tremorom ruku, mialgijom, bolovima u prsima (poslije dijagnosticirana pneumonikoza), neproduktivnim kašljem te proljevom i pojačanim znojenjem. (39).

Prekomjerne doze molibdena negativno utječu na spolni sustav i žena i muškaraca. U žena se pojavljuju menstrualne nepravilnosti i promijenjeni početak puberteta te menopauze, promijenjeno seksualno ponašanje, promijenjeno trajanje trudnoće i problemi s laktacijom. U muškaraca, osim gore navedenog poremećaja seksualne funkcije povezuje se i s poremećenom funkcijom spermija, ali i atrofijom testisa (9).

#### **1.1.2.4. Krom (Cr)**

Krom, kao element, otkriven je 1978. godine u Sibiru kao dio minerala krokoita ( $\text{PbCrO}_4$ ) (24). Javlja se u nekoliko oksidacijskih stanja (od -2 do +6), no industrijski najvažnija stanja su 0, +2, +3 i +6. Dok se elementarni krom (0) ne pronalazi u prirodi, ostali oblici kroma mogu se pronaći kao halogenidi, sulfidi ili oksidi (9). Divalentni krom snažno je redukcijsko sredstvo koje se brzo oksidira u zraku ili vodi (5), stvarajući kemijski inertniji i najstabilniji oblik,  $\text{Cr}^{3+}$ , koji se najčešće javlja u obliku ruda (poput ferokroma) (25). Heksavalentni krom ( $\text{Cr}^{6+}$ ) drugi je najstabilniji oblik kroma i predstavlja jako oksidacijsko sredstvo, posebice u kiselome mediju. Takav oblik kroma najčešće se javlja u obliku oksida ili oksohalida (kisik i halogeni element vezani za jedan element). Zbog svoje nestabilnosti, tetravalentni i pentavalentni oblici kroma se ne pronalaze u prirodi (9).

Krom je, generalno, prijelazni srebrno-bijeli metal, čija relativna atomska masa iznosi 51,9961, gustoća  $7150 \text{ kg/m}^3$ , temperatura vrelišta  $2671 \text{ }^\circ\text{C}$  i temperatura tališta  $1907 \text{ }^\circ\text{C}$ . (23)





**Slika 11.** Krom (23)

(izvor: <https://delachaux.com/activities/chromium/>)

Korištenje kroma i njegovih spojeva datira još iz drevnih vremena. Hetiti, indoeuropski narod iz Male Azije, premazivali su svoje noževe/mačeve slojem kromova (III) oksida ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) još davne 1300. g. pr. Kr. (9), a isti postupak uočen je i kod kineske dinastije Qin koja je istim spojem premazivala brončane samostrelne vijke i čelične mačeve. (23)

Danas je upotreba kroma i njegovih spojeva raznovrsna. Zbog svoje tvrdoće i visoke otpornosti na koroziju krom svoju primjenu pronalazi prvenstveno u metalurškim industrijama. Ta se činjenica može pripisati otkriću kako nehrđajući čelik postaje otporniji na koroziju i promjenu boje ukoliko je premazan slojem ferokroma (legura željeza i kroma) (9). Upravo je krom taj koji nehrđajući čelik čini nehrđajućim (24). Nadalje, krom se koristi u procesu „kromiranja“, tj. oblaganja metala slojem kroma u dekorativne ili funkcionalne svrhe. Ukoliko su u pitanju dekorativne svrhe, koristit će se tanji sloj kroma ( $0,1-5 \mu\text{m}$ ) (9) u obliku kiseline ili topljivih spojeva trovalentnoga kroma koji će pridonijeti sjaju obloženoga metala (24). S druge strane, ukoliko su u pitanju funkcionalne svrhe, koristit će se deblji sloj kroma ( $5-250 \mu\text{m}$ ) u obliku kiseline i pridonijet će otpornosti obloženoga metala na koroziju (23). Visoko talište te otpornost na djelovanje kiselina i lužina savršene su karakteristike kroma za korištenje u vatrostalnim industrijama, primjerice u proizvodnji visokih i cementnih peći, kalupa za pečenje

opeka i sl. (9, 23). Najčešće se koristi najstabilniji  $\text{Cr}^{3+}$  u obliku oksida, a može se koristiti samostalno ili u kombinaciji s drugim vatroostalnim oksidima, poput željezova, aluminijeva ili magnezijeva oksida. Sljedeća upotreba kroma može se pronaći u štavljenju kože, proces koji kožu čini elastičnijom i otpornijom na vodu (24). Najčešće se koriste soli  $\text{Cr}^{3+}$ , poput alauna (krom (III) kalijev sulfat dodekahidrat -  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ) ili kromov (III) sulfat dodekahidrata ( $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ), koji umrežavaju kolagenska vlakna te tako stabiliziraju kožu (23). Ostale upotrebe kroma mogu se pronaći u proizvodnji boja i pigmenata, sredstava za zaštitu drva od gljiva, bakterija te insekata i dr. (5)

Većina kroma u okolištu proizlazi iz antropogenih izvora. Izgaranje i prerada ruda ispušta  $\text{Cr}^{3+}$  u okoliš kao  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , dok se malene količine  $\text{Cr}^{6+}$  pojavljuju u lebdećem pepelu elektrana na ugljen i s mjesta proizvodnje kromata ( $\text{Cr}^{4+}$ ). Najveće količine  $\text{Cr}^{6+}$  nastaju pri procesima proizvodnje kromata, ferokroma i pigmenata od kroma, pri procesu kromiranja te zavarivanja nehrđajućega čelika (9)

U tlu se krom javlja u obliku trovalentnih netopivih soli koje su u tlo dospjele taloženjem komercijalnih proizvoda na odlagalištima otpada, dok se glavnim izvorom kroma u vodenim sustavima smatraju kućanske otpadne vode. Koncentracije kroma u jezerima i rijekama iznose između 1-10  $\mu\text{g/L}$ , dok je taj iznos u morskoj vodi nešto niži (0,1-5  $\mu\text{g/L}$ ).  $\text{Cr}^{6+}$  pojavit će se više u plitkim podzemnim vodama gdje prevladava pH 6-8, dok će se  $\text{Cr}^{3+}$  pojaviti u dubokim podzemnim vodama gdje prevladava kiseli pH (9).  $\text{Cr}^{6+}$  i  $\text{Cr}^{3+}$  su esencijalni elementi i kod ljudi i kod životinja jer igraju bitnu ulogu u metabolizmu glukoze, masti te proteina potencirajući djelovanje inzulina (25). Glavni izvori kroma u namirnicima su meso i povrće (grah, brokula) (9), dok nerafinirani šećer, bijela riba, voće i biljno ulje predstavljaju siromašnije izvore kroma (5). Zamrznuto ili konzervirano voće i povrće, kokošja jaja, plodovi mora te meso mogu sadržavati oko 200  $\mu\text{g Cr/kg}$ , a preporučeni dnevni unos kroma za odrasle iznosi 50-200  $\mu\text{g}$ . Koncentracije kroma u duhanu kreću se između 0,24-14,6 mg Cr/kg, no valencija i količina kroma koja se apsorbira kao posljedica pušenja nije poznata (9).

#### **1.1.2.4.1. Toksikologija kroma**

Kada je u pitanju apsorpcija kroma, ona se može odviti na nekoliko načina. Zbog visoke temperature vrelišta plinoviti krom rijetka je pojava, no može ga se inhalirati ukoliko je otopljen u kapljicama ili vezan za čestice zraka. Neke komponente heksavalentnoga kroma, poput kalijeva ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) i natrijeva dikromata ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) te kalijeva ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) i natrijeva ( $\text{Na}_2\text{CrO}_4$ ) kromata mogu nagristi kožu i uzrokovati transdermalnu apsorpciju (25). Apsorpcija kroma u

crijevima vrlo je slaba (0,5-2 %) te su toksični učinci poprilično rijetki. Razlog tome može se pripisati sposobnosti želuca da reducira  $\text{Cr}^{6+}$  u stabilni  $\text{Cr}^{3+}$  prije ulaska u tanko crijevo. Također,  $\text{Cr}^{3+}$  vrlo teško zaobilazi stanične membrane te mu je ulazak u stanice otežan. Stoga, potrebne su ogromne doze  $\text{Cr}^{6+}$  kako bi se zaobišao kiseli reducirajući kapacitet želuca i razvio toksični učinak kroma. Kada je apsorpcija  $\text{Cr}^{3+}/\text{Cr}^{6+}$  u krvotok uspješno izvršena, krom počinje stvarati komplekse s aminokiselinama, proteinima plazme (globulini) i organskim kiselinama male molekulske mase (26). Takav se kompleks veže za transferin, pomoću kojega krom prodire u eritrocite, gdje se veže za  $\beta$ -lanac hemoglobina (9). Nadalje, krom se krvlju distribuira u različite organe. Ukoliko se apsorpcija izvršila transdermalno, krom će se distribuirati u srce, krv, mišiće i bubrege. Pri oralnoj apsorpciji distribucija će se vršiti u jetru, gušteraču, bubrege, mozak i testise, dok će se krom pri inhalacijskoj apsorpciji distribuirati u limfne čvorove, pluća, slezenu, jetru i bubrege (25). Također, krom može dospjeti i to fetusa putem majčina mlijeka, budući da posjeduje sposobnost prolaza kroz transplacentarnu membranu (27). Koncentracija kroma u distribuiranim organima/organskim sustavima se starenjem smanjuje, osim u plućima. Većina se inhaliranoga kroma te kroma apsorbiranoga preko kože eliminira putem bubrega iz organizma (mokraćom), dok se ingestirani krom većinom eliminira fecesom. Krom se, također, može eliminirati i preko noktiju i kose (9).

Pri inhalaciji  $\text{Cr}^{6+}$  nadražuje kožu i sluznice gornjih dišnih puteva, uzrokujući ulceracije i perforacije nosnih pregrada taloženjem kromata na sluznicama (5). Dokazano je da neki spojevi  $\text{Cr}^{6+}$  (kromna kiselina, kalijev dikromat) posjeduju snažan korozivni učinak (9), uzrokujući ulceracije kože (ponajviše na mjestima poput podlaktice, korijena nokta i sl.) (5), dok spojevi  $\text{Cr}^{3+}$  imaju slab ili gotovo nikakav korozivni učinak. Također,  $\text{Cr}^{6+}$  te u manjoj mjeri  $\text{Cr}^{3+}$  (ukoliko su osobe vrlo osjetljive na  $\text{Cr}^{6+}$ ) (28) mogu uzrokovati alergijski dermatitis (9) u osoba različitih profesija (drvoprerađivači, kožari, zavarivači i sl.) (5).  $\text{Cr}^{6+}$  snažno iritira pluća, uzrokujući hiperemiju, ulceracije i druge upalne promjene sluznice respiratornoga trakta. Kod osjetljivijih radnika, koji profesionalno dolaze u kontakt s kromovim spojevima, može doći do pojave bronhospazma i anafilaktičkih reakcija (9), popraćenih dispnejom, kašljem i šištanjem (25).  $\text{Cr}^{3+}$  blaže nadražuje pluća, no prekomjerno izlaganje može dovesti do razvoja profesionalne astme. Šesterovalentni spojevi kroma prepoznati su kao humani kancerogeni (9), uzrokujući karcinome pluća, bronha i nosne šupljine (25). Osim navedenoga, kromovi spojevi mogu uzrokovati i karcinome kostiju, želuca, prostate, bubrega, mokraćnoga mjehura te krvi (9).

Akutno otrovanje (inhalacija, transdermalno) spojevima  $\text{Cr}^{6+}$  uzrokuje pojavu akutnoga nefritisa, akutne tubularne nekroze (5), izraženih intersticijskih promjena te akutnog zatajenja bubrega (popraćenih proteinurijom, hematurijom te oligurijom ili anurijom) (25), dok se navedeni simptomi ne mogu povezati s izloženošću spojevima  $\text{Cr}^{3+}$  (9). Akutno otrovanje ingestijom karakterizirano je peckanjem i korozijom dijelova usne šupljine te gornjega dijela dušnika (28), mučninom, povraćanjem (žuto-zelena boja), vrtoglavicom i općom slabošću, povećanom žeđi, bolovima u truhu, gastrointestinalnim krvarenjem te akutnim gastroenteritisom. Osim toga, ukoliko se radi o ingestiji velike količine kromovih spojeva (1,5-2 g) pojavljuje se i nekroza jetre. Također, obdukcije su dokazale veliki afinitet  $\text{Cr}^{6+}$  prema jetri, s obzirom da gotovo 80% kroma od ukupne ingestirane količine završi upravo u jetri (9).

Genotoksični učinci kroma mogu se pojaviti u *in vivo* te *in vitro* uvjetima. Mutacije gena uočene su kod *Drosophila melanogaster*, dok su kromosomske aberacije, izmjene sestrinskih kromatida, delecije baza te oštećenja DNA lanca uočeni kod ljudskih limfocita te leukocita (25). Osim navedenoga, genotoksični učinak kroma uočava se pri ometanju prevođenja m-RNA (56). No, kromovo genotoksično djelovanje u *in vivo* uvjetima može se umanjiti uzimanjem vitamina C, koji djeluje kao reducens  $\text{Cr}^{6+}$ . Osim genotoksičnoga djelovanja, kao što je već rečeno,  $\text{Cr}^{6+}$  može prolaziti kroz transplacentarnu membranu te uzrokovati teratogene učinke. Neke od utvrđenih malformacija na životinjskim modelima su smanjena tjelesna masa, mikroftalmija, kratki i iskrivljeni udovi te ektopično srce (5).

#### **1.1.2.4.2. Toksični učinci kroma u ortodontiji**

Iako  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  i  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  (32) stvaraju pasivni film kojim štite ortodontske bravice i prstenove od korozije, ioni kroma se, kao i ioni nikla, oslobađaju iz navedenih materijala pod utjecajem korozije koja je uzrokovana povišenjem pH vrijednosti nakon korištenja vodice za ispiranje usne šupljine i tretmana visokim temperaturama lemljenja. Najveća se koncentracija iona u slini javlja na početku terapije (2. tjedan najveća), dok se ta koncentracija s vremenom smanjuje. (30)

Dokazom oslobađanja iona kroma iz ortodontskih bravica i prstenova smatra se pojava crno-zelenih mrlja na materijalima (32). Oslobađanje iona kroma u usnu šupljinu rezultirati će reakcijom preosjetljivosti, iako ne u tolikoj mjeri kao kod iona nikla. Reakcije preosjetljivosti češće pogađaju žene nego muškarce, i to u dobi od 10-20 godina, kada se i najčešće aplicira fiksna ortodontska naprava (33). Reakcija se manifestira lezijama uzrokovanim kontaktnim stomatitisom, eritemom, gubitkom okusa, utrnuošću jezika te osjećajem pećenja zahvaćenoga

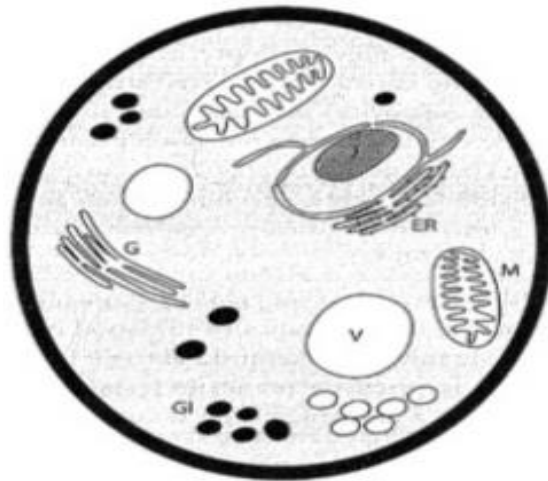
područja (32). Kako bi se smanjila njezina izraženost, pacijentima se preporučuje korištenje zubnih pasti te vodica za ispiranje usta koje ne sadrže fluoride.

### 1.1.3. Kvasci

Kvasci su eukariotski organizmi koji, uz plijesni i mesnate gljive, čine carstvo gljiva (*Fungi*). Zbog nepresutnosti klorofila, kvasci ne posjeduju sposobnost obavljanja fotosinteze (46), već kemijskim procesima sami sebi stvaraju energiju metaboliziranjem ugljikohidrata. Stoga se svrstavaju u skupinu kemoheterotrofa. No, gljivama su za njihov rast, osim hranjivih tvari, potrebni i određeni mikronutrijenti ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{4+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) i makronutrijenti ( $\text{C}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{P}_4$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) (43).

Kvasci su organizmi koji se najčešće razmnožavaju nespolno, tj. pupanjem, no neki se kvasci razmnožavaju i spolno. Kvasci nespolnoga razmnožavanja nazivaju se nesavršenim, mitospornim ili anamorfnim kvascima (npr. *Cryptococcus neoformans* ili *Candida utilis*), dok se kvasci spolnoga razmnožavanja nazivaju savršenim, meiospornim ili teleomorfnim kvascima (npr. *Pichia jadiniz* ili *Filobasidiella neoformans*) (42). Kvasci su fakultativni anaerobi, što znači da provode proces disanja u prisutnosti kisika, stvarajući vodu i  $\text{CO}_2$ . S druge strane, pri nedovoljnoj količini kisika kvasci energiju proizvode procesom fermentacije, stvarajući etanol i  $\text{CO}_2$  (44).

Stanica kvasca naziva se blastokonidija (grč. *blastos*-klica i *conia*-prašina), a veličina joj iznosi 5-7  $\mu\text{m}$  te može biti okruglog, ovalnog ili izduženog oblika. Osnovu građe stanice čini vanjski sloj stanične stijenke, ispod koje se nadovezuje stanična membrana. Unutrašnjost blastokonidije (citoplazmu) čine sljedeće komponente: endoplazmatski retikulum, jezgra, mitohondrij, vakuola, glikogenska zrnca i Golgijev aparat (43).



**Slika 12.** Poprečni presjek blastokonidije (J-jezgra, ER-endoplazmatski retikulum, M-mitohondrij, V-vakuola, GI-glikogenska zrnca, G-Golgijev aparat). (75)

Stanična stijenka odgovorna je za oblik i čvrstoću blastokonidije, no također sudjeluje u koloniziranju površine tkiva te u prodiranju kroz unutrašnjost istoga (43). Osim toga, stanična stijenka pruža stanici zaštitu od mehaničkog oštećenja ili osmolitičke lize stanice (48). Čini otprilike 30% suhe mase stanice, a sastoji se od ugljikohidrata ( $\beta$ -glukani, manani, hitin) (77-85%), proteina (3-6%) i lipida (2%). Doduše, sastav stanične stijenke mijenja se starenjem stanice te uvjeta rasta iste. Stanična stijenka na sebi može imati kapsulu i fimbrije. Kapsula čini jedan od čimbenika virulencije te omogućava stanici kvasca preživljavanje u nepovoljnim uvjetima (43), dok fimbrije služe stanici kao pokretno sredstvo i omogućuju joj adherenciju na druge stanice (48). Stanična membrana drugi je stanični sloj blastokonidije i čini oko 15% suhe mase stanice. Osnovu građe čini joj dvosloj lipida (fosfatidilkolin i fosfatidiletanolamin) te steroli (47). Stanična membrana ciljno je mjesto mnogih antimikotika, a komponenta koja je najviše pogođena djelovanjem antimikotika je ergosterol (48). Uloga stanične membrane je kontrola transporta tvari u i izvan stanice. Osim toga, stanična membrana u sebi sadrži enzime (hitin-sintetaza i manan-sintetaza) koji su odgovorni za sintezu komponenti stanične stijenke. Prostor između stanične stijenke i stanične membrane naziva se periplazmatski prostor ili periplazma, u kojoj se nalaze proteini poput fosfataza i invertaza (43), čija je uloga metaboliziranje komponenti koje ne mogu proći kroz membranu (47). Ostatak organela nalazi se u citoplazmi - vodenoj otopini stanice, čiji pH iznosi oko 5,2 (47). Glavni sastojak joj je voda, a sadrži različite organske i anorganske molekule (43).

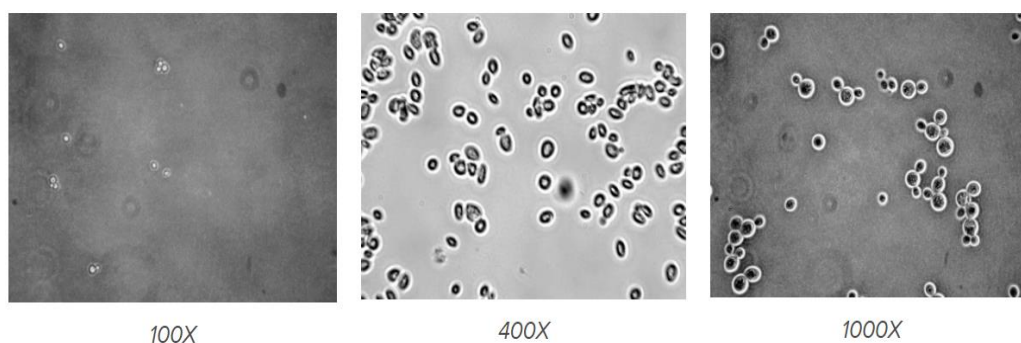
Danas je u svijetu identificirano više od 1500 vrsta kvasaca, a smatra se da su milijunima godina prisutni na Zemlji (42). Smatra se da su prva piva bila proizvedena u drevnoj Kini, i to oko 7000. g. pr. Kr, iako postoje tvrdnje da se kvasac koristio i prije (10 000. g. pr. Kr.) kod dizanja tijesta (50). Babilonci i stanovnici drevne regije Sumera koristili su kvasac u procesu vrenja piva još davne 6000. g. pr. Kr., dok je u Egiptu kvasac bio korišten za dizanje tijesta (47).

Kao i u prošlim vremenima, kvasci se i danas koriste u različite svrhe. Otkriće kvaščeve uloge u fermentaciji prepisuje se danskome mikologu i fermentacijskome fiziologu, Emilu Christianu Hansenu. Naime, prvo je francuski kemičar i biolog, Louis Pasteur, pokazao kako nastajanje alkohola u vinu i pivu nije spontana kemijska reakcija, već je za njegovo stvaranje potreban živi organizam. Tom se pretpostavkom vodio Hansen koji je uspio izolirati kvasac odgovoran za fermentaciju piva. Vrsta kvasca, koju je Hansen izolirao, bila je *Saccharomyces carlsbergensis* (poslije preimenovan u *Saccharomyces pastorianus*), a za kojega je nedavno dokazano da je hibrid *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces eubayanusa* (50).

Upravo zbog njihova jednostavnog i brzog uzgoja, kvasci su danas ponajviše korišteni u pekarskim industrijama, gdje sudjeluju u proizvodnji CO<sub>2</sub>, pomoću kojega se diže tijesto, ali i doprinosi elastičnosti, okusu i aromi tijesta. Osim toga, kvasci se koriste i u procesu fermentacije vina i piva, a najčešća vrsta korištena u takvim procesima je kvasac *Saccharomyces*, rod *cerevisiae*. Glavni razlog njihovoj primjeni u navedenoj djelatnosti leži u njihovom podnošenju visokih i niskih temperatura, niskih vrijednosti pH te visokih koncentracija alkohola (preživljavaju i do 15%) (45). Međutim, pri temperaturama višim od 30 °C, a nižim od 10 °C kvasci postaju osjetljiviji na alkohol (53). Koriste se i u proizvodnji drugih fermentiranih proizvoda, poput mliječnih proizvoda (kefir, fermentirano mlijeko, jogurt), sira, kobasica, kaka, kave, fermentiranih maslina te probiotika (42) Osim pronalaska svoje svrhe u različitim industrijama, kvasci se često koriste u istraživanjima, gdje služe kao modeli ljudskih eukariotskih stanica. Razlog tome leži u činjenici da su kvasci ipak sličniji životinjama, nego biljkama (prvenstveno zbog nemogućnosti vršenja fotosinteze), ali i zaobilaze etičke probleme. Kao takvi su se počeli koristiti u tridesetim godinama prošloga stoljeća, a popularnost i primjena im je iz godine u godinu rasla (49). Kvasci, također, imaju važnu ulogu u poljoprivredi kao agensi biokontrole i bioremedijacije te kao pokazatelji kvalitete okoliša (42).

### 1.1.3.1. Pekarski/pivski kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*)

Pekarski/pivski se kvasac (lat. *Saccharomyces cerevisiae*) smatra najpoznatijim predstavnikom roda *Saccharomyces*, a često se *Saccharomyces* koristi kao sinonim za kvasce (46). Ime je izvedeno iz grčkih riječi *sakcharon* (šećer) i *mykes* (gljiva), a identificiran je 1838. godine. Pod digitalnim se mikroskopom stanice pekarskoga kvasca vide kao svijetlo-kremaste cilindrične, ovalne ili okrugle nakupine (53) koje u svome sastavu imaju ugljik (48%), kisik (31%), dušik (8%) te vodik (7 %) (46).



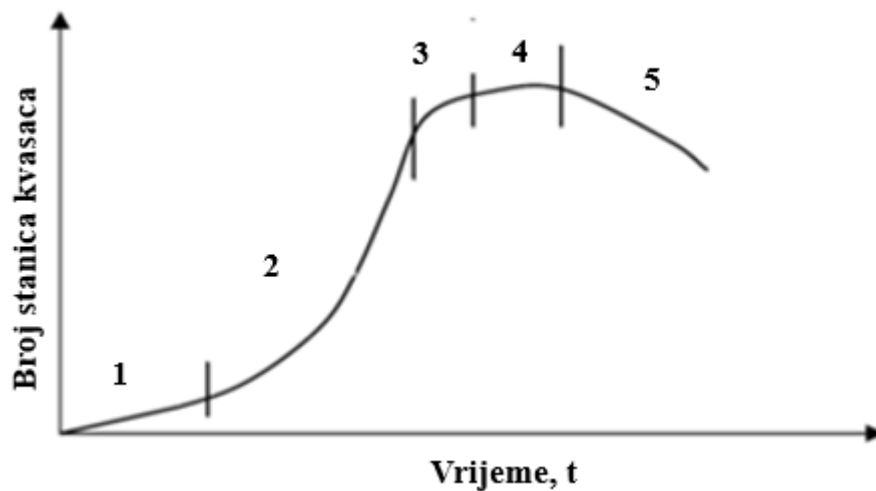
**Slika 13.** Stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* promatrane digitalnim mikroskopom pod tri povećanja (x100, x400 i x1000).

(izvor: <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/microscopy>)

Hranidbena podloga za uzgoj ove vrste kvasca sadrži šećer heksozu (D-fruktoza, D-glukoza, D-manoza, D-maltoza) kao izvor ugljika, peptonsku vodu te kvašćev ekstrakt, a temperatura pod kojom kvasac najbolje/najbrže raste iznosi 25-35 °C (51), uz pH vrijednost 4,5-6,5. Doduše, temperatura uzgoja spušta se ispod optimuma ukoliko se fokus stavlja na prinos stanica, a ne brzina rasta. Većina sojeva *Saccharomyces* može rasti i na D-galaktozi, škrobu i pektinu, sukrozi te maltotriozi i fermentirati ih, no međutim, niti jedan ne može koristiti laktozu, pentoze (osim ksiluloze), citrate i alditole kao izvore ugljika, kao ni bilo koji oblik L-šećera. Osim toga, ovaj rod kvasaca specifičan je po činjenici da je jedan od rijetkih kvasaca čiji se rast može odvijati u semianaerobnim ili anaerobnim uvjetima, fermentirajući šećer uz stvaranje CO<sub>2</sub> i etanola, ali i enzima, aldehida i kiselina koje doprinose senzorskim svojstvima proizvoda (53). Krivulja rasta kvasaca, kao što prikazuje slika 14, ide u sljedećih pet faza:



- I. FAZA PRILAGODBE
- II. LOG (EKSPONENCIJALNA) FAZA
- III. POST LOG FAZA
- IV. STACIONARNA FAZA
- V. FAZA UGIBANJA



**Slika 14.** Krivulja rasta kvasaca u pet faza. (52)

U prvoj fazi kvasci se prilagođavaju novim uvjetima rasta te u ovoj fazi ne dolazi do rasta broja stanica. U drugoj fazi, kao što je vidljivo na gornjoj slici, postiže se najveća brzina rasta stanica, dok se u trećoj fazi ta brzina rasta smanjuje, bez obzira na daljnji eksponencijalni rast broja stanica. Četvrta, odnosno stacionarna faza, predstavlja trenutak kada dolazi do istovremenog nastajanja i ugibanja stanica kvasaca, a ona nastupa kada koncentracija limitirajućeg nutrijenta (šećer) ne može pratiti brzinu rasta kvasaca. U posljednjoj fazi dolazi do pada broja stanica kvasaca, a razlog tome leži u činjenici da brzina ugibanja stanica nadmašuje brzinu stvaranja stanica kvasaca. (52)

Godišnja svjetska proizvodnja *S. cerevisiae* iznosi više od 1 000 000 tona, što premašuje kombiniranu proizvodnju ostalih industrijskih mikroorganizama za dva reda veličine. Ovaj soj kvasca, osim u pekarskoj industriji te proizvodnji alkoholnih pića, svoju upotrebu pronalazi i u proizvodnji metaboličkih produkata (npr. enzimi, vitamini, karoteni, lipidi i sl.), sredstava za autolizu te biomasa. Svoju upotrebu, uz kvasce poput *Komagatella (Pichia) pastoris* i *Ogataea (Hansenula) polimorfa*, pronalazi i u heterolognoj proizvodnji proteina i proteinskih lijekova

(42). No, kao što je već rečeno, kvasci se koriste i kao modeli eukariotskih stanica u različitim istraživanjima. Upravo kvasci vrste *Saccharomyces*, soja *cerevisiae* su najistraživaniji i najrazumljiviji kvasci u svijetu znanosti koji se koriste u istraživanju biologije eukariota (53). Koristi se u proučavanju starenja, regulacije ekspresije gena, transdukcije signala, staničnih ciklusa, metabolizma te brojnih drugih procesa u eukariota (54). Kratko vrijeme udvostručavanja (oko 80 min) te niska cijena komponenti hranidbenih podloga omogućuju jednostavan i brz uzgoj ovih kvasaca. Uz to, *S. cerevisiae* može se genetski manipulirati, tj. mogu mu se dodavati novi ili brisati postojeći geni pomoću mnoštva homolognih tehnika rekombinacije gena. Također, *S. cerevisiae* bio je prvi eukariotski organizam čiji je genom u potpunosti sekvenciran (12 156 677 parova baza, 6275 gena i 16 kromosoma) (42). Kada se sagledaju navedena saznanja o ovom organizmu, činjenica da je *S. cerevisiae* najkorišteniji model eukariotskih stanica i nije toliko iznenađujuća.

## 2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj iona metala (prvenstveno  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{4+}$  i  $\text{Cr}^{3+}$ ), koji se oslobađaju iz ortodontskih bravica i prstenova na vitalnost (životnost) i vijabilnost dvaju sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: W303 i divlji tip. Vitalnost stanica pratila se promjenom broja stanica na početku i na kraju uzgoja u iscrpinama metala. U pokusu su korištene 2 vrste iscrpina - umjetna slina i kvašćeva podloga u kojoj su ortodontski materijali stajali 3, 7 i 14 dana. Vijabilnost se pratila na nekoliko načina: Live/Dead Yeast Viability Kitom, XTT-testom te mjerenjem unutarstanične oksidacije. Mjerenja su rađena uspoređivanjem dobivenih vrijednosti u odnosu na kontrolu, podlogu ili umjetnu slinu bez metalnih iona.

### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Radni kvasac**

U ovom je istraživanju korišten soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 i *Saccharomyces cerevisiae* divlji tip (dalje u tekstu DT), koji je uzgojen na krutoj hranidbenoj podlozi, a za potrebe pokusa se submerzno uzgajao po *Scale-up* principu.

##### **3.1.2. Detalni materijali**

- ortodontski prstenovi, Dentaurem, Njemačka (nehrđajući čelik (10-13% nikal, 2-2,5% molibden i 16,5-18,5% krom)
- ortodontske bravice, Dentaurem, Njemačka (nehrđajući čelik (17-19% krom i 8-10,5% nikal)

#### **3.2. Uređaji, laboratorijski pribor i kemikalije**

- stakleno posuđe (tikvice od 250 mL, 500 mL, 1000 mL; čaše, epruvete)
- automatske pipete, Eppendorf, Njemačka
- pH-metar MP 220, Mettler Toledo, EU
- tehnička vaga PCB 1000-2, Kern-Sohn, Njemačka
- analitička vaga Explorer, OHAUS, Švicarska
- magnetska miješalica MR Hei Standard, Heidolph, Njemačka
- fluorescentni mikroskop Olympus BX51; Olympus, Tokyo, Japan
- tresilica Unimax 1000, Heidolph, Njemačka
- Bürker-Türk-ova komorica
- svjetlosni mikroskop Olympus BX40F; Olympus, Tokyo, Japan
- koncentrirana otopina klorovodične kiseline (HCl), Merck
- glukoza, Biolife, Italija
- pepton, Liofilchem, Italija

- kvaščev ekstrakt, Biolife, Italija
- LIVE/DEAD Yeast Viability Kit, Thermo Fisher -Scientific, SAD
- Acridine Orange/Propidium Iodide Stain, Logos Biosystems, Južna Koreja
- LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter, Logos Biosystems, Južna Koreja
- autoklav za sterilizaciju, CertoClav, Austrija
- vorteks/mješalica, Technokartell TK3S, Australija
- optički čitač Tecan EL 808, Austrija

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Priprema hranidbene podloge

YPD (eng. *Yeast Extract-Peptone-Dextrose*) tekuća je hranidbena podloga za uzgoj kvasaca u ovom istraživanju. Za pripremu 1 L ove hranidbene podloge potrebni su sljedeći sastojci u sljedećim količinama, koji su prikazani u tablici 2.

**Tablica 2.** Prikaz sastojaka i njihovih količina potrebnih za pripremu 1 L YPD hranjive podloge.

**Priprema 1 L YPD hranjive podloge**

Sastojak	g/L
Glukoza	20
Peptonska voda	20
Kvaščev ekstrakt	10

Kada se sastojci u navedenim omjerima izmiješaju, dodaje se oko 950 mL destilirane vode te se, miješajući magnetom na magnetnoj mješalici, vrši korekcija pH. Dodavanjem 1M klorodovične kiseline pH poprima vrijednost od 5,5 – što odgovara optimalnoj pH vrijednosti za rast stanica kvasaca. Nakon podešavanja pH vrijednosti, dodaje se ostatak volumena

destilirane vode za 1 L hranidbene pologe. Potom, određeni se volumen podloge prebacuje u epruvete ili tikvice, koje se stavljaju na sterilizaciju na 15 min pri 121 °C.

### **3.3.2. Nacjepljivanje i uzgajanje kvasaca**

Jednom sterilizirana hranidbena podloga se odvaja u dvije epruvete (kao tekuća podloga) i dvije Petrijeve zdjelice (kao kruta podloga). Potom, sterilnom ezom pri sterilnim uvjetima uzima se smrznuta kultura stanica *S. cerevisiae* w303 i nacjepljuje u jednu epruvetu i jednu Petrijevu zdjelicu. Isti postupak se ponavlja sa smrznutom kulturom stanica *S. cerevisiae* DT. Jednom nacjepljeni kvasci se s podlogama stavljaju na 24-satnu inkubaciju na tresilici, pri 30 °C.

### **3.3.3. Priprema metalnih iscrpina (YPD)**

Pripremljeno je po šest uzoraka iscrpina, tako da su ortodontski prstenovi i ortodontske bravice ostajale u YPD podlozi 3, 7 i 14 dana. Postupak pripreme ide tako da se 20 ortodontskih bravica stavljaju u Erlenmeyerove tikvice, uz dodavanje 30 mL YPD podloge, a isti se postupak ponavlja s 4 ortodontska prstena. Erlenmeyerove se tikvice, potom, stavljaju na sterilizaciju pri uvjetima 121 °C/15 min, nakon čega se tikvica stavlja na tresilicu pri 30 °C. Dvije se tikvice (jedna s prstenovima, druga s bravicama) skidaju s tresilice nakon 3 dana, potom nakon 7 dana i na kraju nakon 14 dana. Prstenovi i bravice se uklanjaju iz tikvica za daljnje analize, a iscrpine (umjetna slina + ioni) spremaju za daljnji tijek istraživanja.

### **3.3.4. Priprema umjetne sline**

Kako bi se što točnije postigli uvjeti tijekom ortodontskih tretmana, pripremljena je „Tani-Zucchi *artificial saliva*“. Za pripremu 1 L umjetne sline potrebni su sljedeći sastojci u sljedećim količinama, koji su prikazani u tablici 3.

**Tablica 3.** Prikaz sastojaka i njihovih količina potrebnih za pripremu 1 L umjetne sline.

**Priprema 1 L umjetne sline Tani-Zucchi**

Sastojak	g/L
Kalijev klorid	1,5
Natrijev hidrogenkarbonat	1,5
Natrijev dihidrogenfosfat hidrat	0,5
Kalijev tiocijanat	0,5
Mliječna kiselina	0,9

Dodavanjem 950-980 mL destilirane vode, tikvica se s otopinom stavlja na magnetnu mješalicu, a pH se korigira na vrijednost od 5,5. pomoću 1M NaOH ili 1M HCl. Iako je po originalnom protokolu pH sline 4,8, za potrebe ovog istraživanja korištena su otopine s pH 5,5.

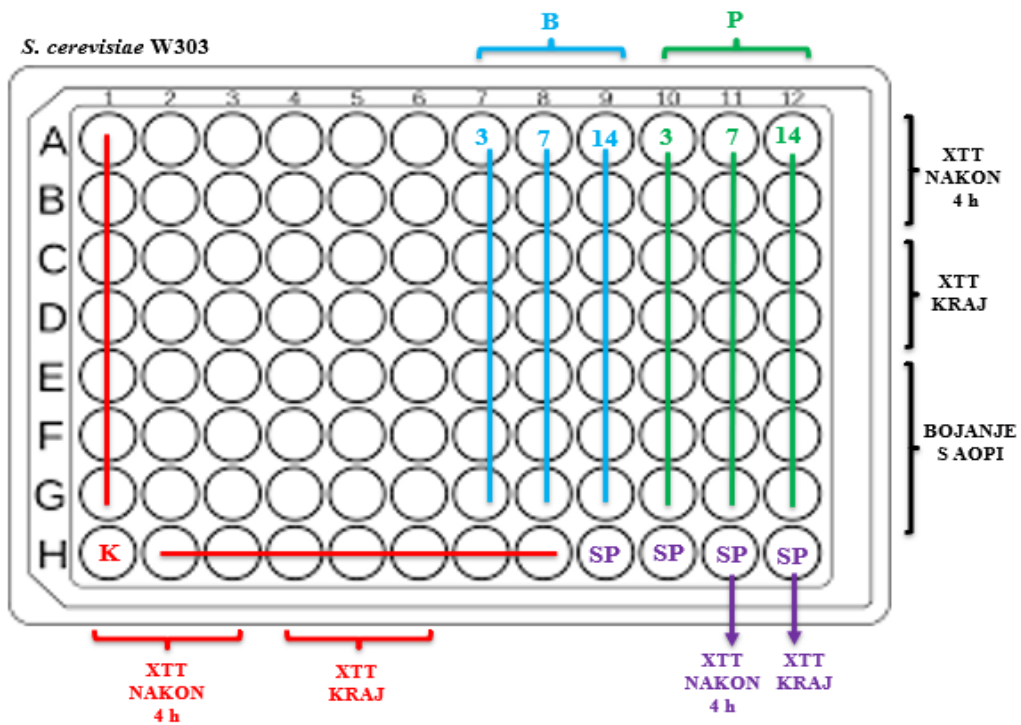
**3.3.5. Priprema metalnih iscrpina (umjetna slina)**

Pripremljeno je po šest uzoraka iscrpina, tako da su ortodontski prstenovi i ortodontske bravice ostajale u umjetnoj slini 3, 7 i 14 dana. Postupak pripreme ide tako da se 20 ortodontskih bravica stavljaju u Erlenmeyerove tikvice, uz dodavanje 40 mL umjetne sline. a isti se postupak ponavlja s 4 ortodontska prstena. Erlenmeyerove se tikvice, potom, stavljaju na sterilizaciju pri uvjetima 121 °C/15 min, nakon čega se tikvica stavlja na tresilicu pri 30 °C. Dvije se tikvice (jedna s prstenovima, druga s bravicama) skidaju s tresilice nakon 3 dana, potom nakon 7 dana i na kraju nakon 14 dana. Prstenovi i bravice se uklanjaju iz tikvica za daljnje analize, a iscrpine (umjetna slina + ioni) spremaju za daljnji tijek istraživanja.

**3.3.6. Protokol određivanja broja stanica kvasca**

Prebrojavanje stanica provodi se na aparatu LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter. Prije samoga korištenja aparata, potrebno je pripremiti razrjeđenje koje će LUNA-FL™ moći očitati (preporučeno 10<sup>6</sup> stanica/jažici). Ono se provodi tako što se prebroje netretirane stanice kvasca obe vrste iz hranidbenih podloga. Ukoliko očitana vrijednost odskoče od ciljane vrijednosti, kvasci se razrjeđuju s destiliranom vodom dok se ne postigne broj stanica

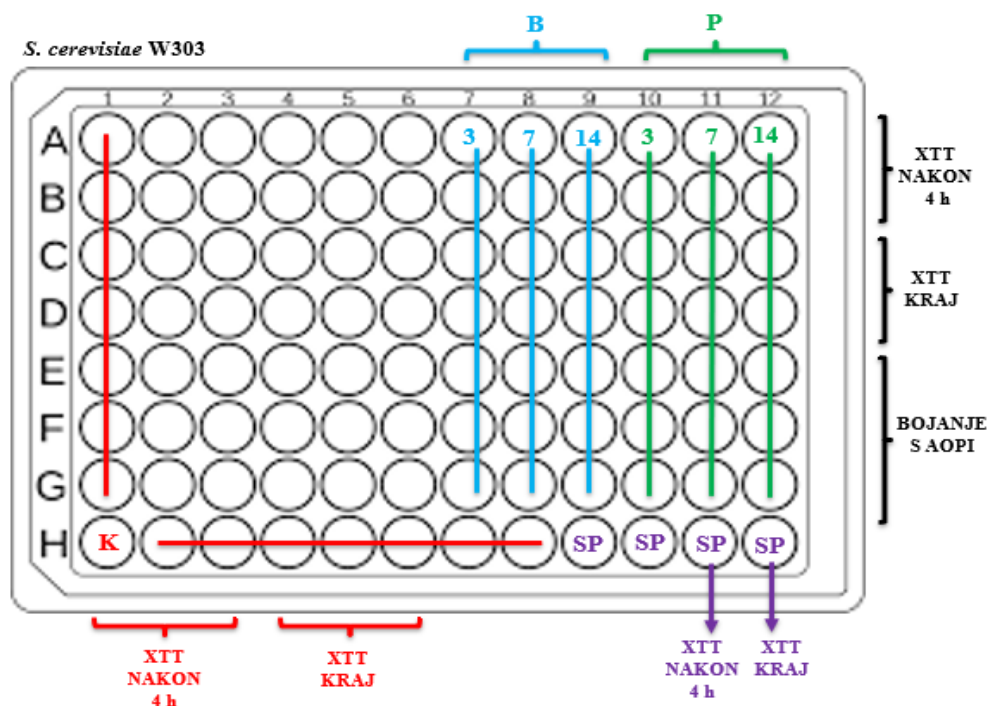
oko  $10^5$ . Kada se pronade željeno razrjeđenje kvasci:destilirana voda (određeno 400:600), uređaj LUNA-FL™ određuje omjer razrijeđenih kvasaca i određenog tretmana (prstenovi 3, 7 i 14 dana te bravice 3, 7 i 14 dana) unutar 200  $\mu$ L/jažici. Nakon određenoga razrjeđenja, u svaku se jažicu dodaje 200  $\mu$ L komponenti sa slika 15 i 16.



**Slika 15.** Prikaz sheme mikrotitarske pločice za određivanje broja stanica kvasca *Sacharomyces cerevisiae* W303 te XTT testa

(K – kontrola, SP – slijepa proba, B – bravica, P – prstenovi, 3/7/14 – broj dana tretmana).





**Slika 16.** Prikaz sheme mikrotitarske pločice za određivanje broja stanica kvasca *Sacharomyces cerevisiae* DT te XTT testa

(K – kontrola, SP – slijepa proba, B – bravica, P – prstenovi, 3/7/14 – broj dana tretmana).

Kontrolu čini 200  $\mu$ L netretiranih stanica kvasca i umjetne sline, dok slijepu probu čini 200  $\mu$ L umjetne sline. Nakon završenog dodavanja komponenti prema gore prikazanim shemama, pločica se stavlja na tresilicu pri uvjetima od 30 °C na 24 sata.

Kao što je već rečeno, prebrojavanje stanica vrši se na uređaju LUNA-FL<sup>TM</sup>, i to pomoću fluorescentne boje - AOPI (eng. *Acridine Orange/Propidium Iodide*). Riječ je o boji koja služi za prebrojavanje stanica na fluorescentnome polju, i to isključivo na LUNA-FL<sup>TM</sup> uređaju. Boja djeluje tako da uzrokuje zelenu fluorescenciju u živih, a crvenu fluorescenciju u mrtvih stanica. AO je propustan i za žive i za mrtve stanice, unutar kojih se veže za njihovu DNA te uzrokuje zelenu fluorescenciju, dok je PI propustan isključivo za mrtve stanice, unutar kojih se također veže za DNA, apsorbira zelenu fluorescenciju te fluorescira svijetlo-narančasto/crveno.

### 3.3.7. Prebrojavanje stanica kvasca

Omjer tretiranih stanica i boje mora iznositi 1:1, odnosno 10  $\mu$ L:10  $\mu$ L. Prvo se pipetom uzima 10  $\mu$ L suspenzije iz bilo koje jažice (E-G) unutar svakoga stupca (7-12), a potom

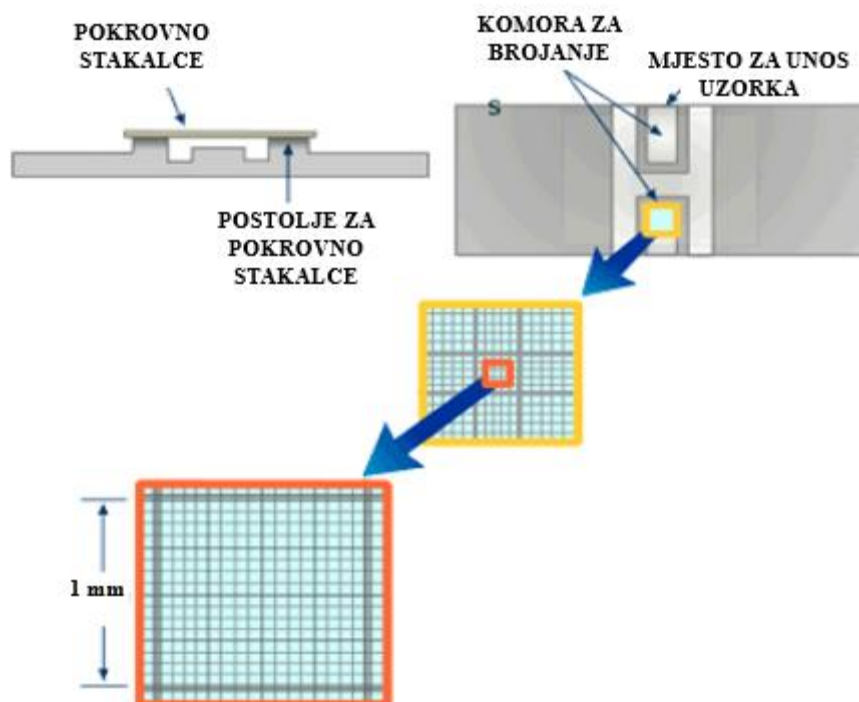
promiješa s već pripremljenih 10  $\mu\text{L}$  AOPI boje na parafilmu. Potom, pipetom se uzima 12-13  $\mu\text{L}$  i stavlja na pločicu posebno dizajniranu za LUNA-FL<sup>TM</sup>. Na uređaju je potrebno odabrati opciju „*Fluorescence Cell Counting*“ te prije samoga brojanja stanica namjestiti slike na „*brightfield-u*“, „*red field-u*“ i „*green field-u*“ tako da stanice ne budu niti presvijetle niti pretamne. Kada se sve navedene radnje izvrše, može se započeti brojanje stanica.



**Slika 17.** LUNA-FL<sup>TM</sup> Dual fluorescence cell counter.

(izvor: [https://www.sciencewerke.com/all\\_products/logos-biosystems-luna-fl-dual-fluorescence-cell-counter/](https://www.sciencewerke.com/all_products/logos-biosystems-luna-fl-dual-fluorescence-cell-counter/))

Osim uređaja LUNA-FL<sup>TM</sup>, za prebrojavanje stanica kvasaca korištena je i Burker-Türkova komorica na svjetlosnome mikroskopu. Komoricu čini kvadratna mreža od 16 velikih kvadrata (4 $\times$ 4), a svaki kvadrat sadrži 25 manjih kvadrata (5 $\times$ 5).



**Slika 18.** Shematski prikaz B-Turkove komorice za brojanje stanica.

(izvor:

<https://www.dlsweb.rmit.edu.au/Toolbox/Laboratory/laboratory/studynotes/SNHaemo.htm>)

Potrebno je prethodno razrijediti suspenziju kvasaca, a potom ju prenijeti (oko 10  $\mu\text{L}$ ) na komoricu te prekriti pokrovnim stakalcem. Svjetlosnim se mikroskopom pronade mali kvadrat na povećanju od 400 puta te je potrebno prebrojati najmanje 4 kvadratića. Potom, izračunava se aritmetička sredina koja predstavlja ukupan broj stanica. To se može izračunati prema sljedećoj formuli:

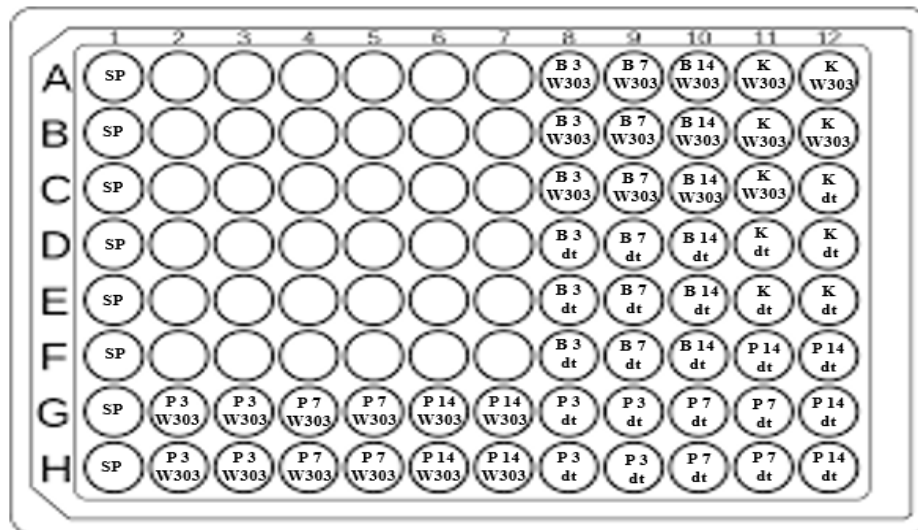
$$\frac{CFU}{mL} = (16 \times \frac{n_{sr}}{V}) \times rf \quad (4)$$

Gdje je:

- $n_{sr}$  – aritmetička vrijednost broja stanica
- $V$  – volumen komorice ( $10^{-4}$  mL)
- $rf$  – recipročna vrijednost faktora razrjeđenja.

### 3.3.8. Određivanje krivulje rasta stanica

Krivulja rasta određuje se pomoću optičkoga čitača mikrotitarskih pločica. Procedura je vrlo slična kao kod prebrojavanja stanica – prvo je potrebno pronaći razrijeđenje kvasac:tretman tako da broj stanica u jažici iznosi oko  $10^6$ , a potom se mikrotitarska pločica popunjava prema shemi na slici 19.



Slika 19. Prikaz sheme mikrotitarske pločice za određivanje krivulje rasta kvasca

(K – kontrola, SP – slijepa proba, B – bravica, P – prstenovi, 3/7/14 – broj dana tretmana).

Kontrolu čini umjetna slina i netretirane stanice kvasca (svake vrste posebno), a slijepu probu 200  $\mu$ L čiste umjetne sline.

### 3.3.9. Protokol određivanja metaboličke aktivnosti kvasca

Metabolička aktivnost kvasca *S. cerevisiae* W303 i DT određena je pomoću LIVE/DEAD Yeast Viability Kit-a koji sadrži dvije boje – dvobojnu fluorescentnu boju FUN-1 i jednoboju Calcofluor White M2R boju. FUN-1 boja, koja je klorirana cijaninska proba, može se koristiti ili samostalno ili u kombinaciji s Calcofluor White M2R bojom u fluorescentnoj mikroskopiji, a djeluje tako što prodire stanične membrane kvasaca. Upravo prevođenje njezine zelene fluorescencije u narančasto-crvenu zahtjeva metaboličku aktivnost stanica te integritet stanične membrane.

Calcofluor White M2R boji sve stanice (i mrtve i žive) plavo-ljubičasto te daje podatak o ukupnome broju stanica kvasca. S druge strane, FUN-1 boja služi za razlikovanje metabolički aktivnih, metaboličkih inaktivnih i mrtvih stanica. Ukoliko stanica u svojoj citoplazmi prevede FUN 1 boju iz zeleno-žute boje u boju koja se na fluorescentnom mikroskopu vidi kao crvena cilindrična struktura u vakuoli (tzv. CIVS – eng. *Cylindrical IntraVacuolar Structures*), stanica se na mikroskopu vidi kao plava s crvenom točkicom te se ubraja u žive i metabolički aktivne stanice. S druge strane, stanica je živa, ali metabolički inaktivna ukoliko je došlo do pretvorbe zelene FUN-1 boje u crvenu, no zbog oštećenja vakuole nije došlo do stvaranja crvenih cilindričnih struktura pa se stanica na mikroskopu vidi kao crvena. Ukoliko stanica ne prevodi FUN-1 boju iz zelene boje u crvenu te ne stvara crvene cilindrične structure u svojoj vakuoli, stanica je mrtva te se na mikroskopu vidi kao zelena.

Kao i u prethodnim metodama, pomoću aparata LUNA-FL™ odredi se broj stanica i izračuna potrebno razrjeđenje kako bi broj stanica kvasca u 10 mL iscrpine iznosio oko  $10^6$ . Kada se razrjeđenje odredi, potrebno je pripremiti radne otopine. Sljedeći se dan u eppendorf tubice dodaje 1 mL otopine iz svake od četiriju prethodno navedene falkonice. Eppendorf tubice se stavljaju na centrifugiranje ( $10\ 000\times g/5\ min$ ) te odbacuje supernatant. Nakon odbacivanja supernatanta, u svaku se eppendorf tubicu dodaje 1 mL prethodno pripremljenog pufera za ispiranje (GH pufer) uz vorteksiranje. Priprema 1 mL GH pufera vrši se miješanjem komponenata u određenim količinama navedenim u tablici 4.

**Tablica 4.** Prikaz sastojaka i njihovih količina potrebnih za pripremu 1 mL GH pufera.

#### Priprema 1 mL GH pufera

Sastojak	V/ $\mu$ L
0,1M HEPES (pH=7,2)	100
20%-tna otopina D-glukoze	100
Super čista voda (dd H <sub>2</sub> O)	800

Potom, u svaku se eppendorf tubicu dodaje 1  $\mu\text{L}$  FUN-1 boje te 5  $\mu\text{L}$  Calcofluor White M2R boje, nakon čega se eppendorf tubice vorteksiraju te inkubiraju na 30 °C kroz 30 minuta (preferira se mračni prostor zbog boljšega razvoja boje). Nakon završene inkubacije, 5  $\mu\text{L}$  obojene suspenzije se otpipetira na stakalce te prekrije pokrovnim stakalcem kojeg je potrebno učvrstiti za predmetnicu. Jednom tako fiksirani preparat spreman je za promatranje pod fluorescentnim mikroskopom pomoću filtera odgovarajućih valnih duljina.



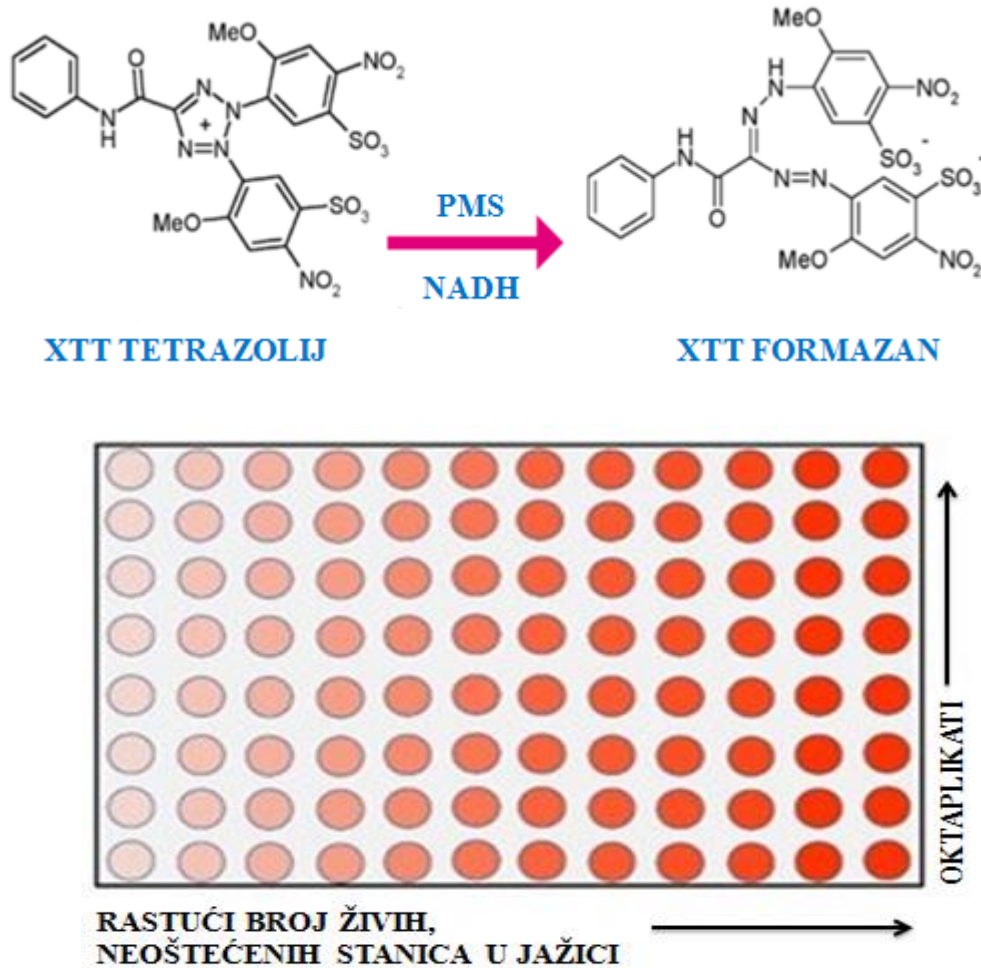
**Slika 20.** Fluorescentni mikroskop Olympus BX51.

(izvor: <https://microscopecentral.com/products/olympus-bx51-fluorescence-microscope>)

### 3.3.10. XTT test

XTT (2,3-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolij-5-kasboksanilid) test predstavlja kolorimetrijsku metodu kvantifikacije citotoksičnosti i stanične proliferacije. Riječ je o žutoj tetrazolijskoj soli koja, djelovanjem enzima (NADH) i elektronskih nosača, prelazi u narančasti, u vodi topljivi formazan, čija se apsorbancija mjeri čitačem mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 450 nm. Navedeni enzim stvaraju mitohondriji, što znači da samo metabolički aktivne i žive stanice, čije su mitohondrijske i stanične membrane neoštećene, mogu prevesti XTT u narančasti formazan pomoću NADH. Također, potreban je i akceptor elektrona, a ta uloga pripada fenazin metosulfatu (PMS). Komponente koje oštećuju navedene

membrane i ometaju respiratorni lanac mitohondrija inaktivirajući djelovanje enzima, kao i razvijanje narančaste boje formazana, kao što je vidljivo na slici 21 (donja slika).



**Slika 21.** Kemijski prikaz prijelaza tetrazolijske soli u formazan (gornja slika) i shematski prikaz razvijanja boje i proporcionalnosti jačine boje s brojem živih stanica (donja slika).

(izvor: [https://www.itwreagents.com/download\\_file/info\\_point/IP-029/en/IP-029\\_en.pdf](https://www.itwreagents.com/download_file/info_point/IP-029/en/IP-029_en.pdf) i <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-xtt-assay>)

Prema shemama sa slika 15 i 156, u obilježene jažice dodadno je 50  $\mu$ L XTT testa koji se pomoću optičkoga čitača mjerio nakon 4 sata te nakon 24 sata.

### 3.3.11. Protokol određivanja unutarstanične oksidacije

Unutarstanična oksidacija određivana je pomoću nefluorescentnog 2',7'-diklorfluoresceina ( $H_2DCF$ ), korištenog u obliku 2',7'-diklorfluorescein diacetata ( $H_2DCFDA$ ). Navedeni spoj posjeduje mogućnost reagiranja s oksidansima, a djeluje tako da prodire staničnu membranu stanica, unutar kojih se esterificira nespecifičnim esterazama.  $H_2DCF$  potom oksidira u fluorescentni 2',7'-diklorfluorescin ( $DCF$ ), koji se određuje fluorimetrijski.

Najprije se 2 mL tretiranih stanica centrifugiraju ( $14\ 000\times g/5$  min) uz odbacivanje supernatanta. Potom, zaostali se sediment ispiru s 50 mM K-fosfatnim puferom ( $K_3PO_4$ ) (pH 7,8), nakon čega slijedi resuspendiranje u 50 mM K-fosfatnom puferu na 10% uz dodavanje ROS osjetljive boje  $H_2DCFDA$ . Mikrotitarske pločice inkubiraju se na  $28\ ^\circ C$  kroz 30 minuta, nakon čega se fluorescencija staničnih suspenzija očitava pomoću čitača mikrotitarskih pločica pri valnim duljinama od 480 i 520 nm. Rezultati su izraženi kao relativne jedinice fluorescencije (RFU), normalizirane na broj stanica kvasca.

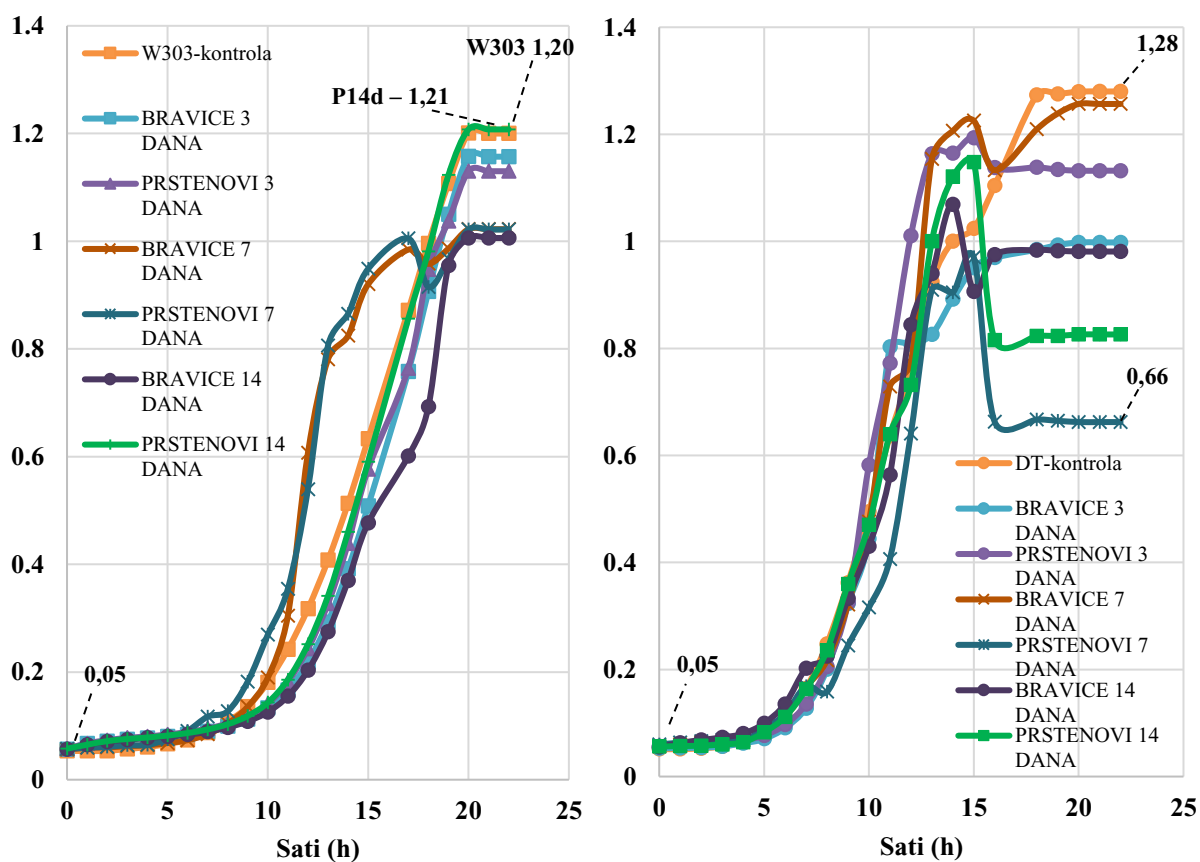


## 4. Rezultati

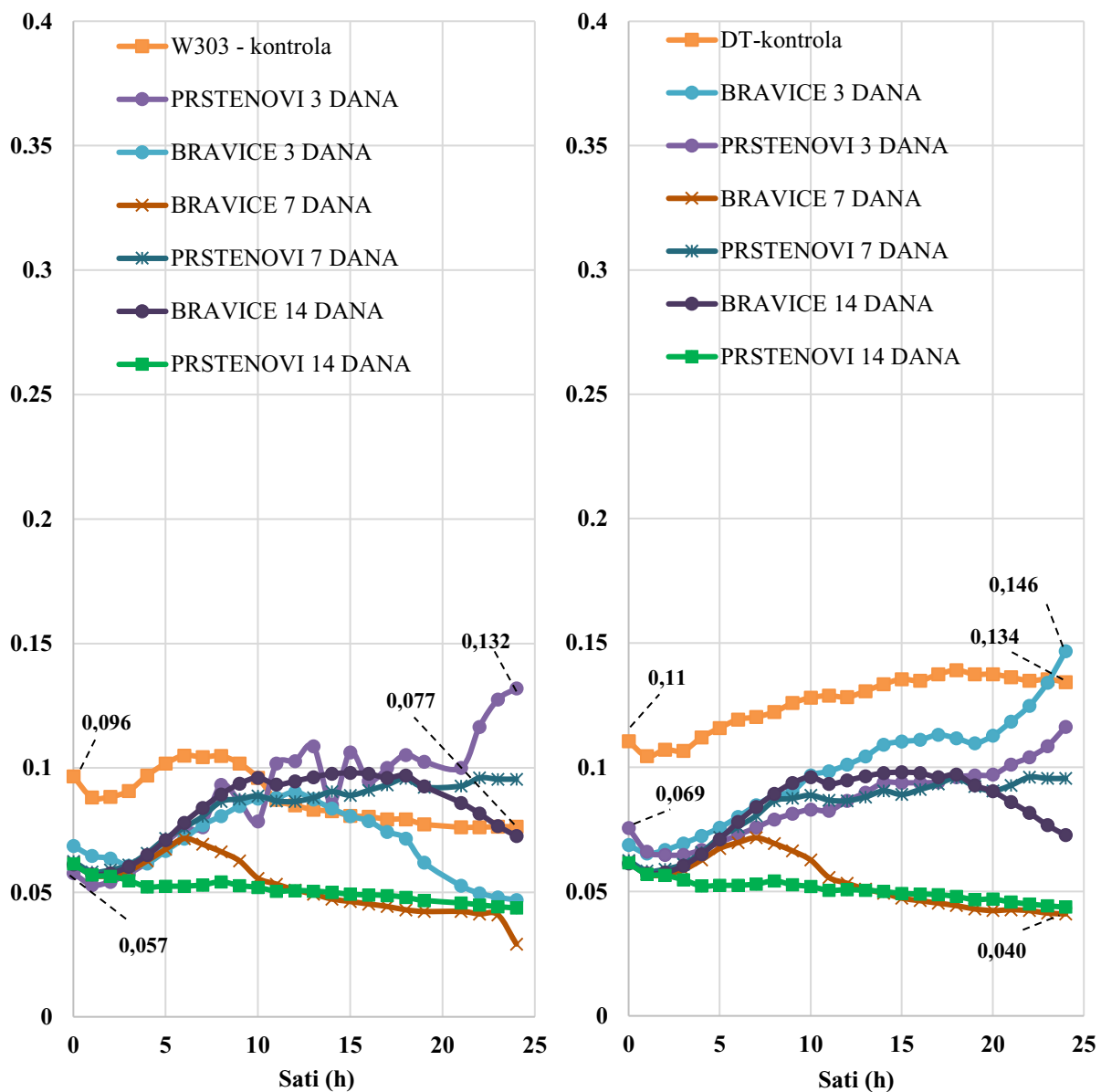
### 4.1. Određivanje vijabilnosti

#### 4.1.1. Određivanje krivulja rasta

Krivulje rasta određene su pomoću Tecan optičkoga čitača mikrotitarskih pločica, prateći optičku gustoću, odnosno porast broja stanica kvasaca oba soja na tretiranim YPD podlogama te umjetnoj slini kroz 20 sati. Krivulje su u oba slučaja uspoređene s netretiranim uzorcima (kontrolama), a konačni rezultati prikazani su na slikama 22 i 23.



**Slika 22.** Krivulje rasta kvasaca na YPD podlogama nakon tretmana ionima ortodontskih bravica i ortodontskih prstenova (lijeva slika prikazuje soj *S. c. W303*, a desna *S. c. DT*).



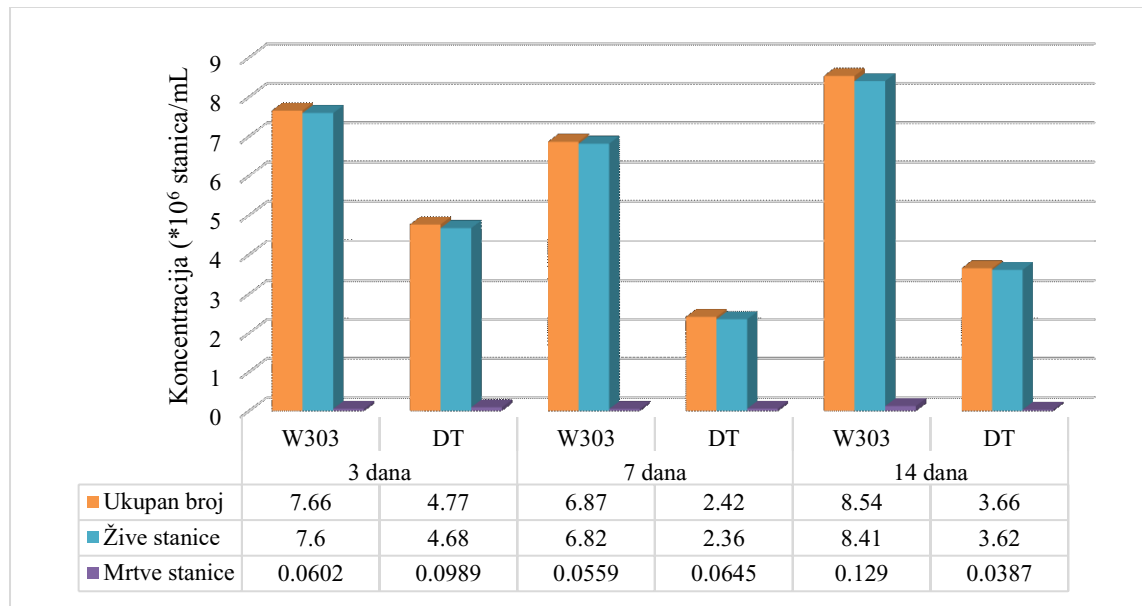
**Slika 23.** Krivulje rasta kvasaca u umjetoj slini nakon tretmana ionima ortodontskih bravica i ortodontskih prstenova (lijeva slika prikazuje soj S. c. W303, a desna S. c. DT).

#### 4.1.2. Određivanje vijabilnosti stanica prebrojavanjem stanica LUNA-FL™

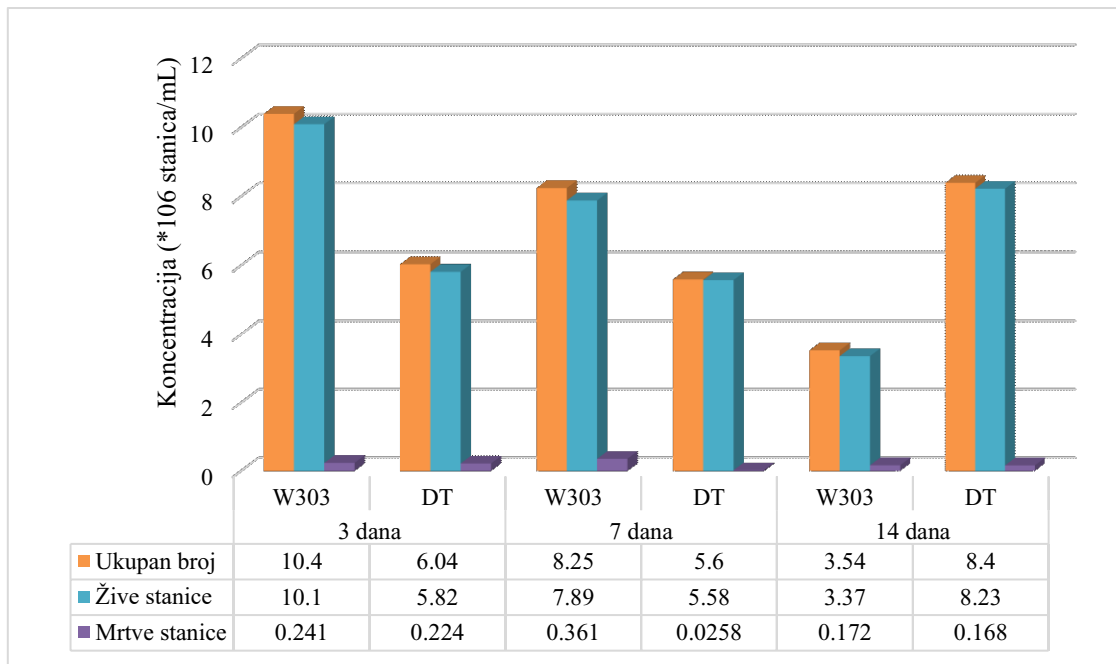
##### Dual fluorescence cell counter-om

Pomoću fluorescentne boje AOPI te LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter-a određeno je nekoliko komponenti vezanih uz vijabilnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 i DT.

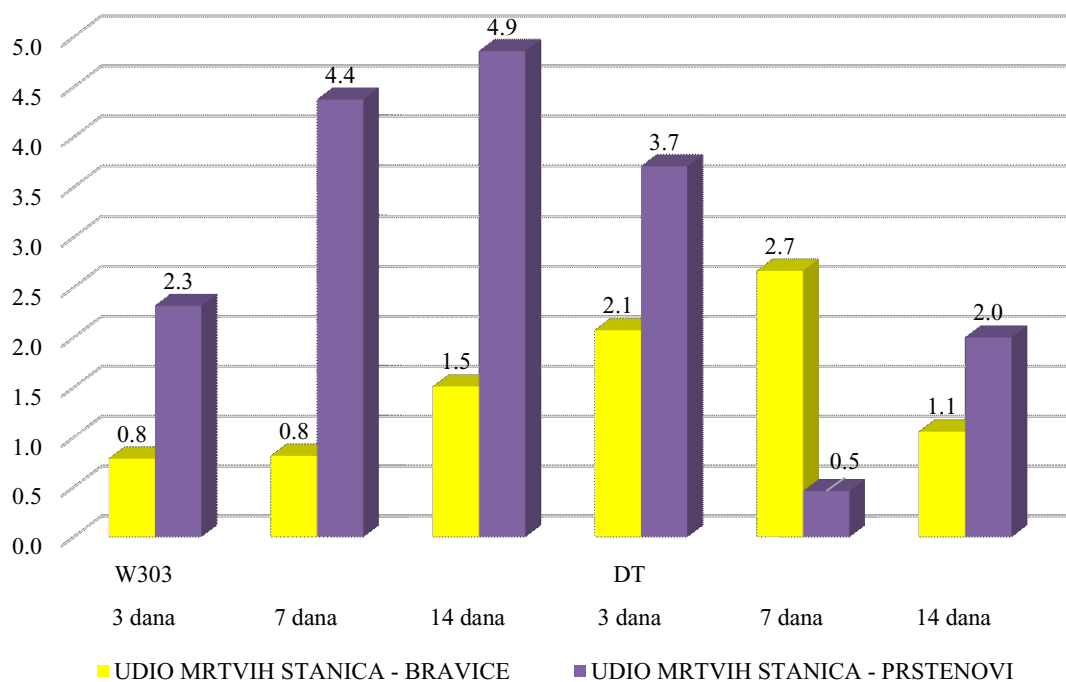
Vijabilnost se određivala i na YPD podlozi i na umjetnoj slini. Najprije su određene koncentracije stanica oba soja kvasca koji su rasli na YPD-podlogama u kojima su bili uronjeni ortodontski materijali kroz određena razdoblja (3, 7 i 14 dana). Grafički prikazi navedenih koncentracija prikazane su na slikama 24 i 25, a slika 26 prikazuje grafički prikaz udjela mrtvih stanica kod oba tretmana.



**Slika 24.** Grafički prikaz promjene koncentracije stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 i DT tijekom izloženosti ionima ortodontskih bravica na YPD podlozi. Bravice su u podlogama bile uronjene 3, 7 i 14 dana te nakon toga korištene u pokusu.



**Slika 25.** Grafički prikaz promjene koncentracije stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 i DT tijekom izloženosti ionima ortodontskih prstenova na YPD podlozi. Prstenovi su u podlogama bili uronjeni 3, 7 i 14 dana, te nakon toga korišteni u pokusu.



**Slika 26.** Grafički prikaz udjela mrtvih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 i DT nakon izloženosti ionima ortodontskih bravica i prstenova na YPD podlozi odstajalih 3, 7 i 14 dana.

Osim podataka o promjeni koncentracija stanica oba soja kvasca, dobiveni su podaci o broju nakupina stanica (tzv. *Clusters*) kod svakoga tretmana na YPD podlozi. Podaci o nakupinama stanica prikazani su tablično, i to u tablicama 5 i 6.

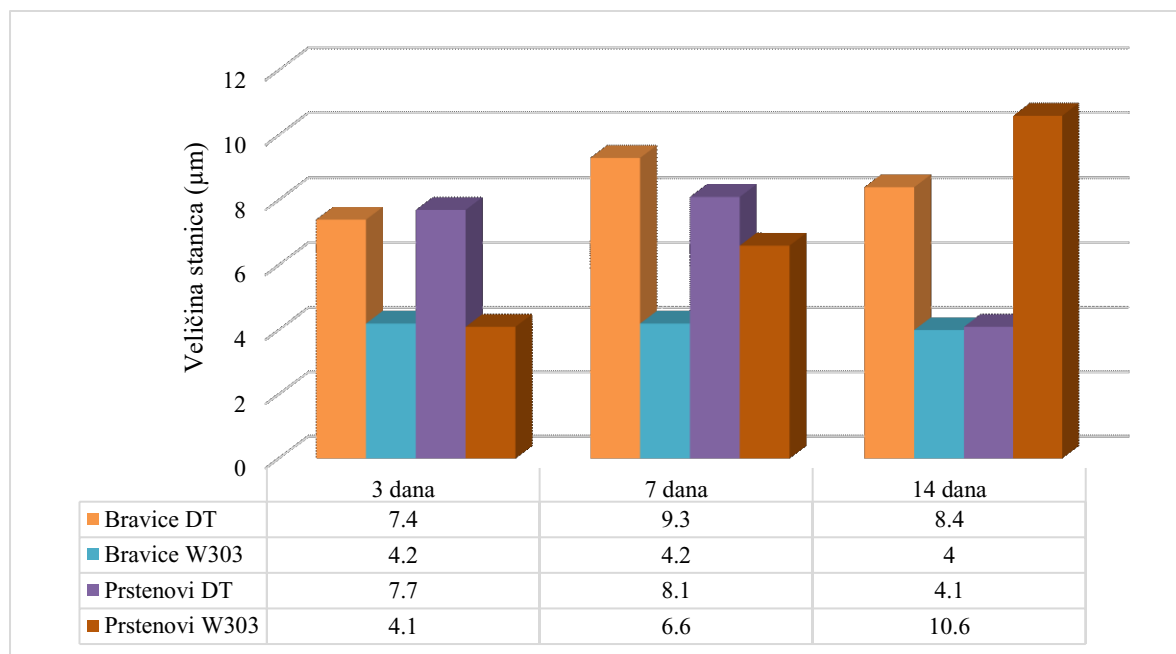
**Tablica 5.** Usporedba formiranja nakupina stanica kvasaca divljeg soja i soja W303 nakon tretmana ionima ortodontskih bravica na YPD podlozi. Bravice su u podlogama bile uronjene 3, 7 i 14 dana te nakon toga korištene u pokusu.

DIVLJI SOJ (ortodontske bravice)				SOJ W303 (ortodontske bravice)			
Broj nakupina stanica	3 dana	7 dana	14 dana	Broj nakupina stanica	3 dana	7 dana	14 dana
1	96,80%	94,60%	94,90%	1	88,20%	94,10%	93,10%
2	2,60%	4,30%	3,90%	2	7,70%	5,50%	6,10%
3	0,40%	0,80%	0,90%	3	3,20%	0,20%	0,50%
4	0,10%	0,20%	0,40%	4	0,70%	0,10%	0,20%
5	0,00%	0,00%	0,00%	5	0,20%	0,00%	0,10%
6	0,00%	0,00%	0,00%	6	0,00%	0,00%	0,00%
7	0,00%	0,00%	0,00%	7	0,00%	0,00%	0,00%
7+	0,10%	0,20%	0,00%	7+	0,10%	0,00%	0,00%

**Tablica 6.** Usporedba formiranja broja stanica kvasaca divljeg soja i soja W303 nakon tretmana ionima ortodontskih prstenova na YPD podlozi. Prstenovi su u podlogama bili uronjeni 3, 7 i 14 dana te nakon toga korišteni u pokusu.

DIVLJI SOJ (ortodontski prstenovi)				SOJ W303 (ortodontski prstenovi)			
Broj nakupina stanica	3 dana	7 dana	14 dana	Broj nakupina stanica	3 dana	7 dana	14 dana
1	93,60%	95,20%	88,20%	1	94,40%	92,10%	97,10%
2	5,60%	3,90%	8,10%	2	5,00%	6,70%	2,80%
3	0,50%	0,80%	3,00%	3	0,50%	1,00%	0,10%
4	0,20%	0,10%	0,70%	4	0,00%	0,10%	0,00%
5	0,00%	0,00%	0,10%	5	0,00%	0,00%	0,00%
6	0,10%	0,00%	0,00%	6	0,00%	0,00%	0,00%
7	0,00%	0,00%	0,00%	7	0,00%	0,00%	0,00%
7+	0,00%	0,00%	0,00%	7+	0,00%	0,10%	0,00%

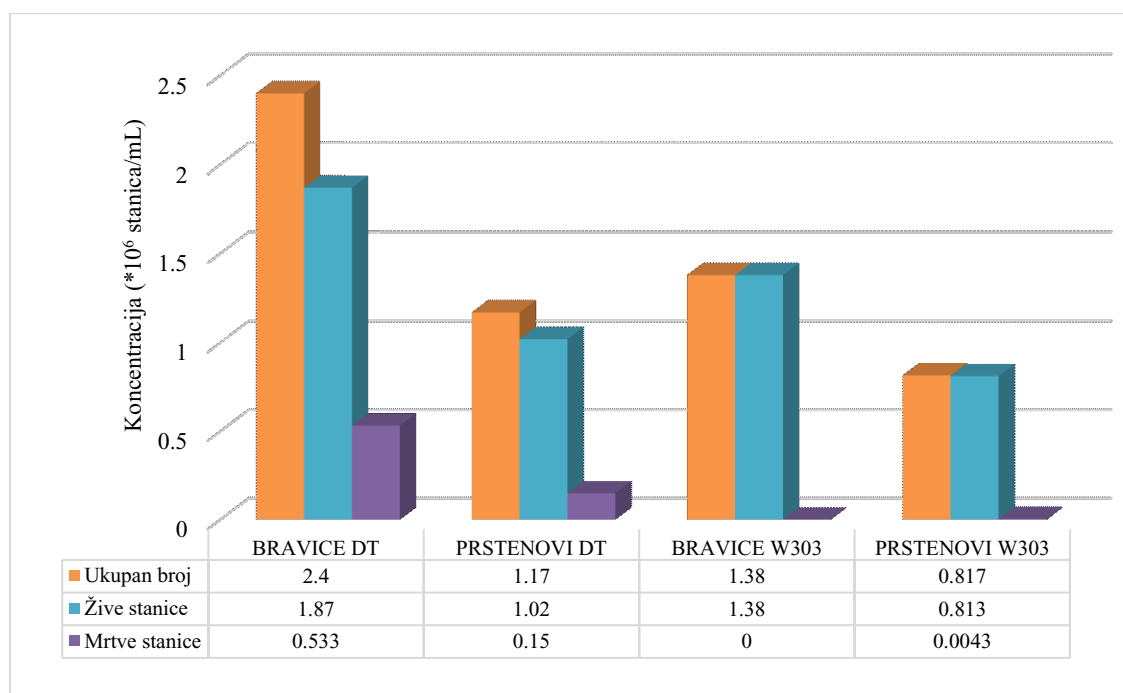
Također, određene su i vrijednosti prosječnih veličina stanica oba soja kvasca kod svih tretmana na YPD podlozi, a prikazane su na slici 27. Prosječne veličine stanica izražene su u mikrometrima.



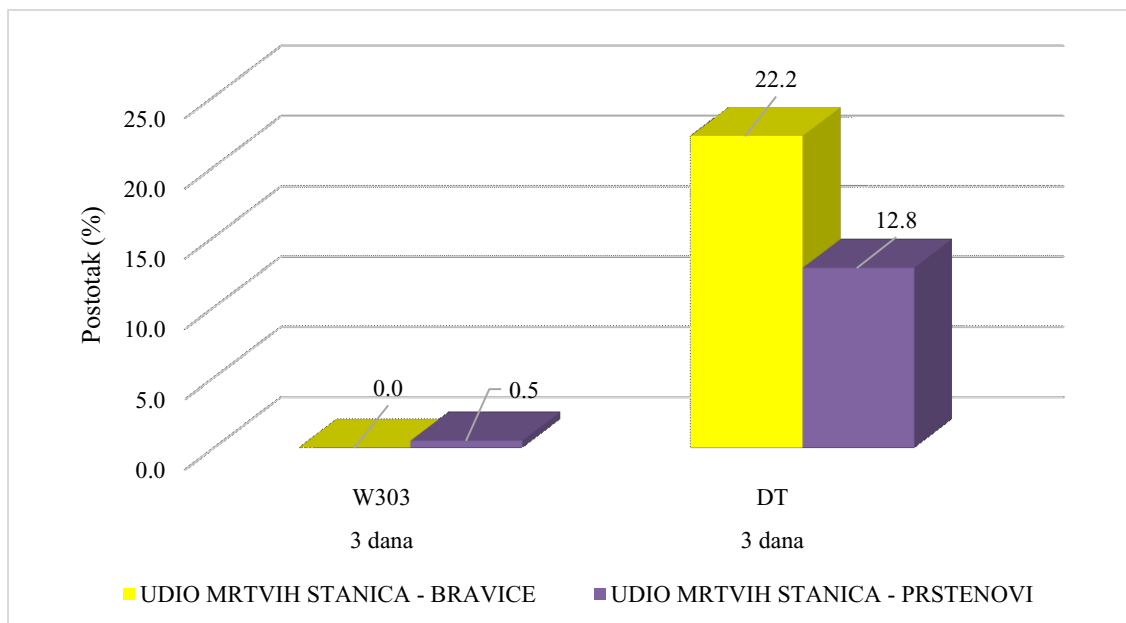
**Slika 27.** Grafički prikaz promjene prosječne veličine stanica obaju sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na YPD podlozi nakon tretiranja ionima ortodontskih bravica i prstenova kroz 3, 7 i 14 dana.

Isti parametri iskazani su grafički i tablično za tretmane kvasaca ionima ortodontskih materijala u umjetnoj slini. Slika 28 prikazuje promjene u koncentraciji stanica oba soja kvasaca, nakon tretmana stanica s iscrpinama u kojima su materijali stajali 3 dana, nakon koje slijedi slika 29 s grafičkim prikazom udjela mrtvih stanica oba soja. No, pri prebrojavanju navedenih stanica došlo je do greške od strane uređaja koja je prikazana slikom 30.

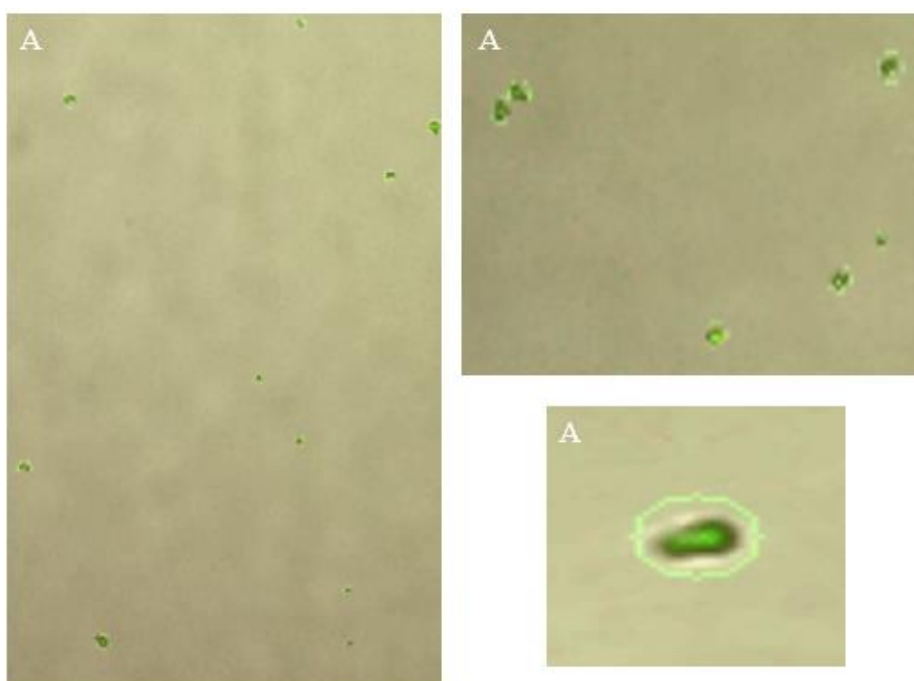
Tablice 7 i 8 prikazuju razlike u učestalosti formiranja određenog skupa stanica, dok slika 31 prikazuje razliku u prosječnim veličinama stanica oba soja kvasca pri svim tretmanima.



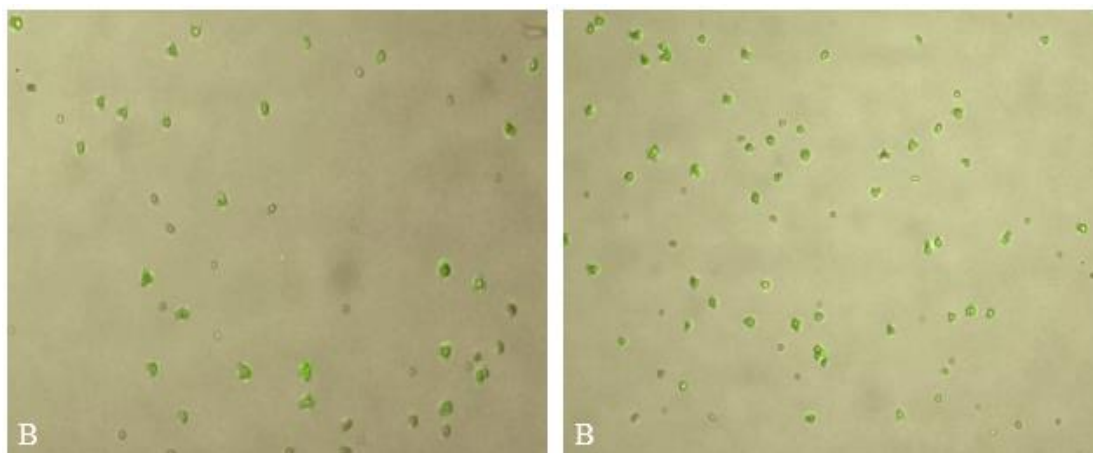
**Slika 28.** Grafički prikaz promjene koncentracije stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 i DT nakon izloženosti ionima ortodontskih bravica i prstenova odstajalih u umjetnoj slini 3 dana.



**Slika 29.** Grafički prikaz udjela mrtvih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 i DT nakon izloženosti ionima ortodontskih bravica i prstenova odstajalih u umjetnoj slini 3 dana.







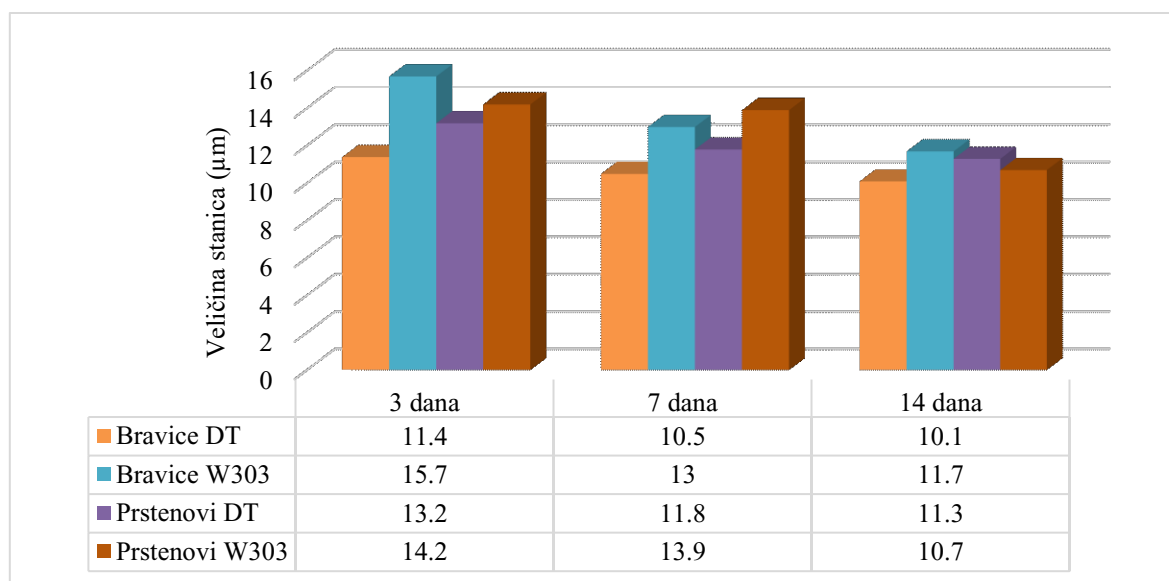
**Slika 30.** Mikroskopski prikaz pogrešnog prebrojavanja stanica oba soja kvasca uređajem LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter (a – tretman ionima ortodontskih bravica, b – tretman ionima ortodontskih prstenova).

**Tablica 7.** Usporedba formiranja broja stanica kvasaca divljeg soja i soja W303 nakon tretmana ionima ortodontskih bravica u umjetnoj slini.

DIVLJI SOJ (ortodontske bravice)				SOJ W303 (ortodontske bravice)			
Broj nakupina stanica	3 dana	7 dana	14 dana	Broj nakupina stanica	3 dana	7 dana	14 dana
1	91,40%	91,00%	93,30%	1	100,00%	89,80%	79,70%
2	6,90%	9,00%	5,80%	2	0,00%	8,10%	14,40%
3	1,00%	0,00%	0,90%	3	0,00%	2,00%	4,60%
4	0,60%	0,00%	0,00%	4	0,00%	0,20%	1,10%
5	0,20%	0,00%	0,10%	5	0,00%	0,00%	0,30%
6	0,00%	0,00%	0,00%	6	0,00%	0,00%	0,00%
7	0,00%	0,00%	0,00%	7	0,00%	0,00%	0,00%
7+	0,00%	0,00%	0,00%	7+	0,00%	0,00%	0,00%

**Tablica 8.** Usporedba formiranja broja stanica kvasaca divljeg soja i soja W303 nakon tretmana ionima ortodontskih prstenova u umjetnoj slini.

DIVLJI SOJ (ortodontski prstenovi)				SOJ W303 (ortodontski prstenovi)			
Broj nakupina stanica	3 dana	7 dana	14 dana	Broj nakupina stanica	3 dana	7 dana	14 dana
1	95,70%	93,70%	94,80%	1	83,10%	87,50%	85,80%
2	3,00%	5,90%	3,70%	2	14,30%	10,50%	11,60%
3	0,60%	0,20%	0,80%	3	1,60%	1,40%	2,70%
4	0,00%	0,10%	0,40%	4	0,60%	0,30%	0,00%
5	0,00%	0,00%	0,30%	5	0,30%	0,00%	0,00%
6	0,00%	0,00%	0,00%	6	0,00%	0,00%	0,00%
7	0,00%	0,00%	0,00%	7	0,00%	0,00%	0,00%
7+	0,60%	0,00%	0,00%	7+	0,00%	0,30%	0,00%



**Slika 31.** Grafički prikaz promjene prosječne veličine stanica obaju sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u umjetnoj slini nakon tretiranja ionima ortodontskih bravica i prstenova odstajalih u umjetnoj slini 3, 7 i 14 dana.

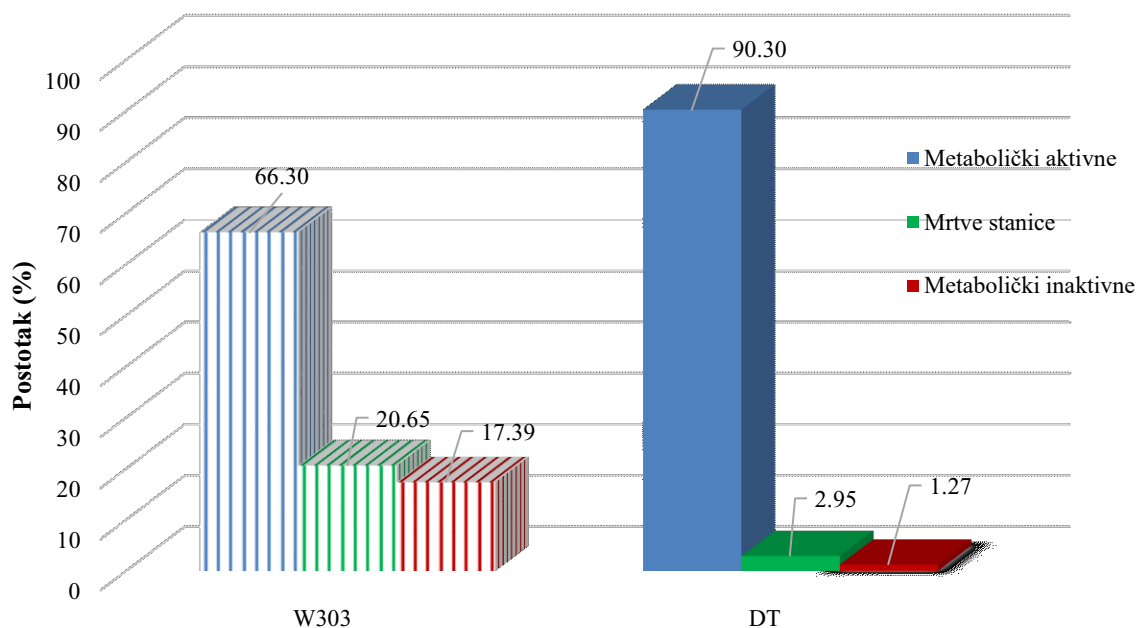
#### 4.1.3. Određivanje metaboličke aktivnosti

Tablica 9 prikazuje broj različitih vrsta stanica obaju sojeva kvasaca tretiranih ionima ortodontskih bravica, a dobivenih pomoću fluorescentnoga mikroskopa. Tablicu slijedi slika 32 koja prikazuje udjele navedenih stanica u ukupnom broju stanica obaju sojeva kvasaca nakon tretmana ionima ortodontskih bravica. Kao što je u materijalima i metodama opisano, za

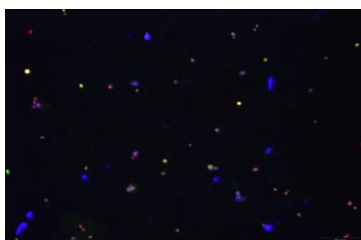
određivanje metaboličke aktivnosti korišten je LIVE/DEAD Yeast Viability Kit koji se sastoji od FUN-1 i Calcofluor White M2R boje. Njihovo zajedničko djelovanje na preklopljenoj mikroskopskoj slici prikazano je na slici 33.

**Tablica 9.** Broj različitih stanica kvasaca obaju sojeva kvasaca nakon tretmana ionima ortodontskih bravica.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DT				<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303			
Plave stanice	Metabolički aktivne stanice	Crvene stanice	Zelene stanice	Plave stanice	Metabolički aktivne stanice	Crvene stanice	Zelene stanice
66	58	2	3	40	28	7	7
40	36	0	0	24	17	4	10
63	60	1	1	28	16	5	2
24	24	0	1				
23	21	0	0				
21	15	0	2				



**Slika 32.** Grafički prikaz prosječnog udjela pojedinih vrsta stanica kvasaca *S. cerevisiae* W303 i DT nakon tretmana ionima ortodontskih bravica.



**Slika 33.** Preklopljena mikroskopska slika stanica *Saccharomyces cerevisiae* DT tretiranim s ionima ortodontskih bravica, a obojanih kombinacijom boja FUN 1 i Calcofluor white M2R (P=400x).

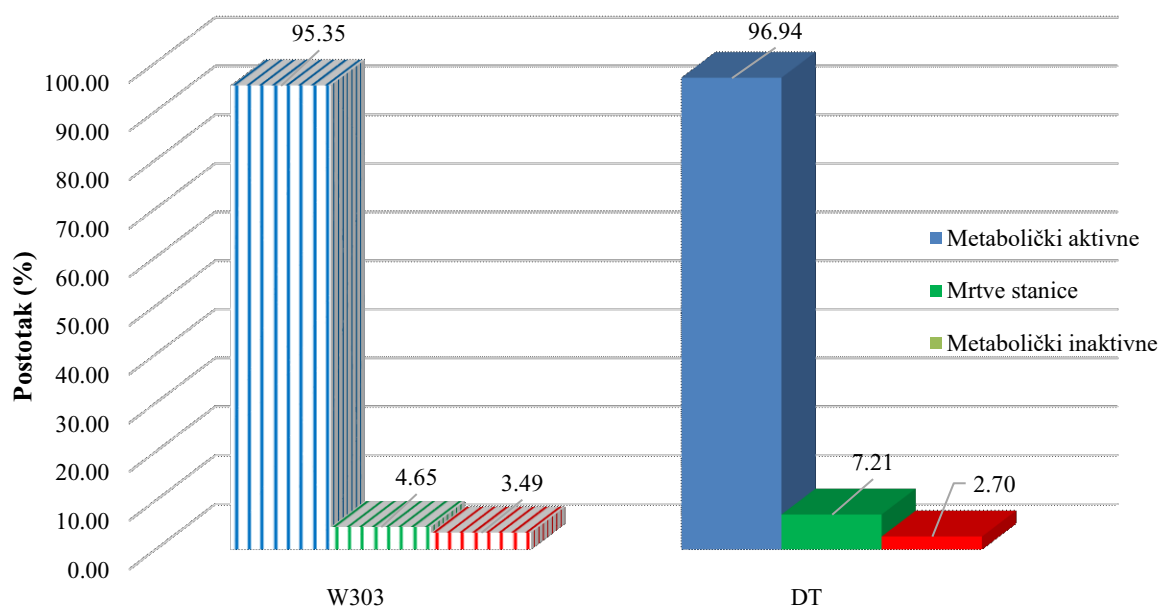
Tablica 10 prikazuje broj različitih vrsta stanica obaju sojeva kvasaca tretiranih ionima ortodontskih bravica, a određenih pomoću fluorescentnoga mikroskopa. Tablicu slijedi slika 34 koja prikazuje udjele navedenih stanica u ukupnom broju stanica obaju sojeva kvasaca određenih fluorescentnim mikroskopom nakon tretmana ionima ortodontskih prstenova.

Slika 35 prikazuje mikroskopske slike preparata tretiranih ortodontskim prstenovima (7 dana, US) te obojenih bojama iz LIVE/DEAD Yeast Viability Kit-a – FUN-1 bojom i Calcofluor White M2R bojom.

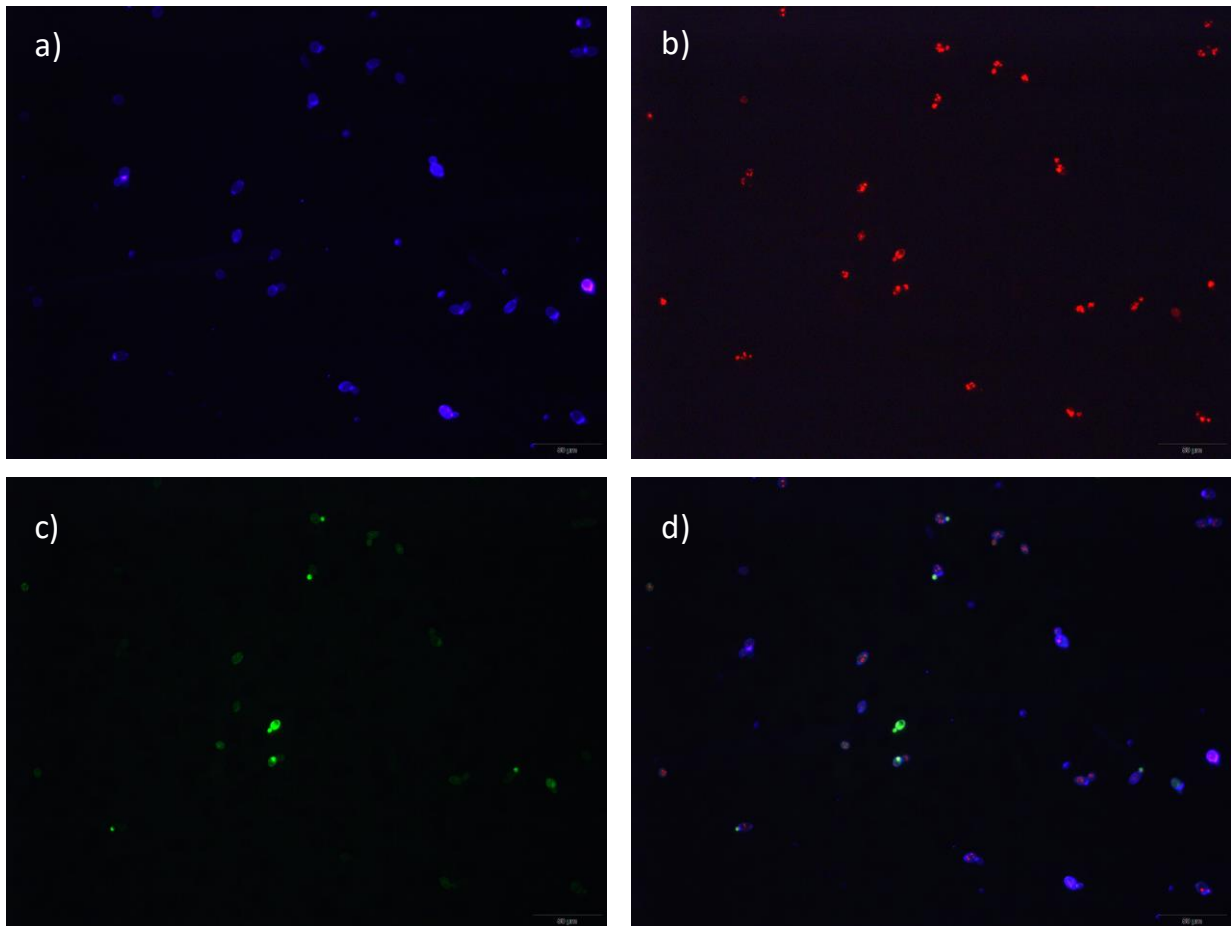
**Tablica 10.** Broj različitih stanica kvasaca obaju sojeva kvasaca nakon tretmana ionima ortodontskih prstenova.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303
------------------------------------	--------------------------------------

Ukupan broj	Metabolički aktivne stanice	Metabolički inaktivne	Mrtve stanice	Ukupan broj	Metabolički aktivne stanice	Metabolički inaktivne	Mrtve stanice
31	22	0	1	26	26	0	0
22	18	2	5	19	17	2	3
22	19	0	2	9	9	0	0
29	27	2	3	12	11	1	1
22	22	2	1	20	19	0	0
42	38	0	3				
54	47	0	1				



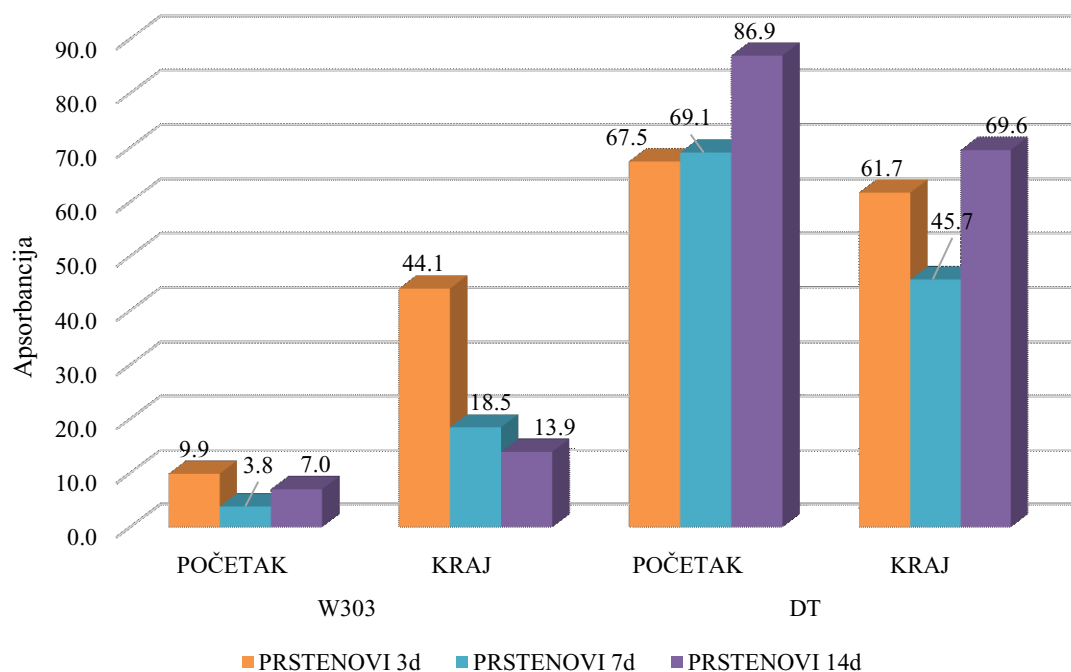
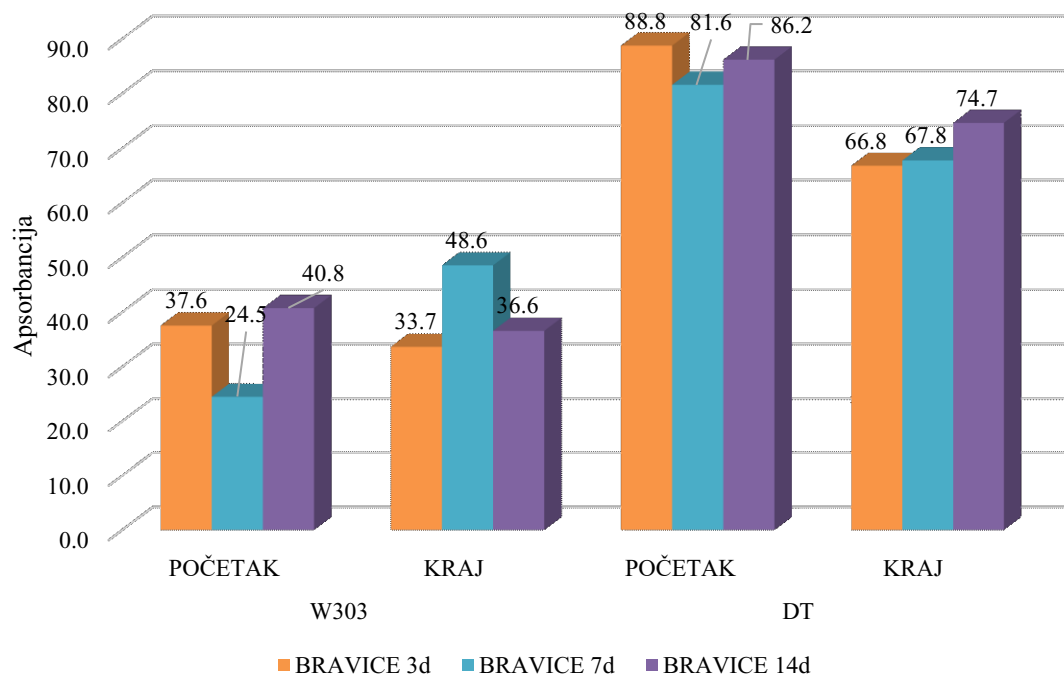
**Slika 34.** Grafički prikaz prosječnoj udjela pojedinih vrsta stanica kvasca *S. cerevisiae* W303 i DT nakon tretmana ionima ortodontskih prstenova.



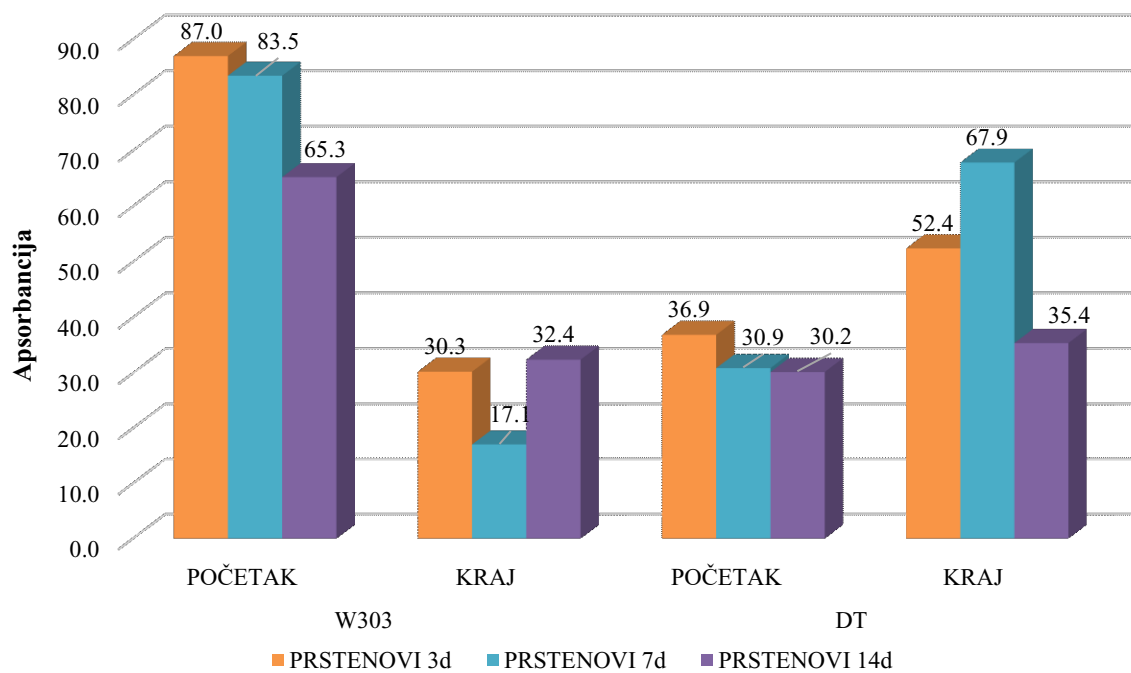
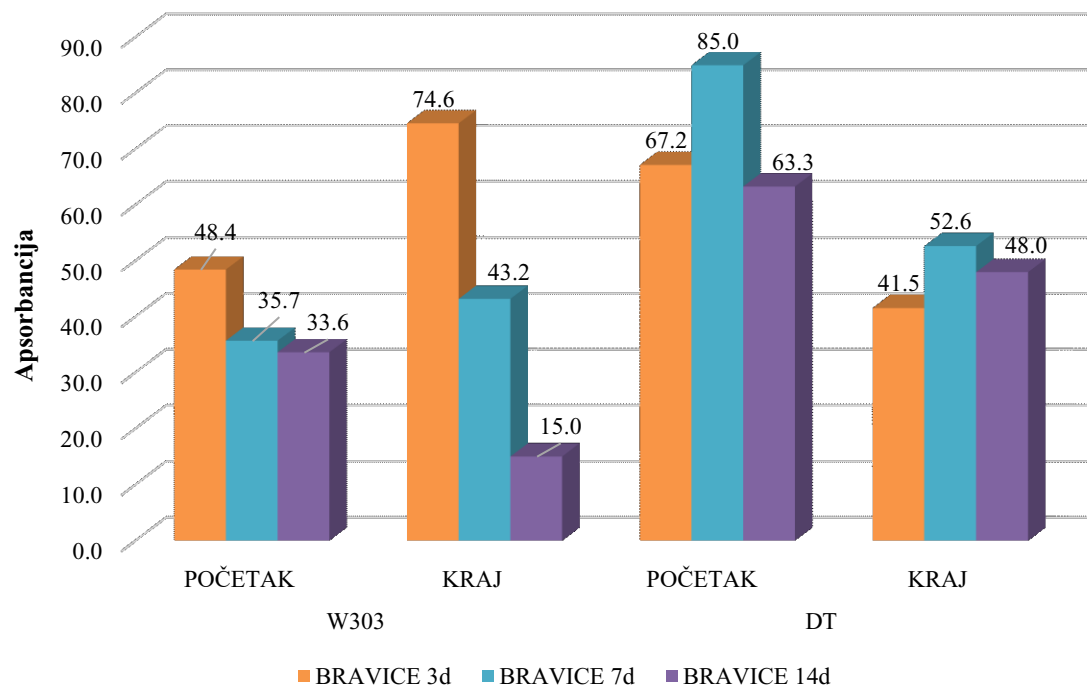
**Slika 35.** Mikroskopske slike stanica kvasaca *S. cerevisiae* DT tretiranih iscrpinom prstenova (7 dana/US) obojene FUN-1 (crvena – b i zelena – c) i Calcofluor White M2R bojom (plava – a i preklopljena slika – d).

#### 4.1.4. Određivanje stanične proliferacije i citotoksičnosti XTT testom

Za određivanje stanične proliferacije i citotoksičnosti korišten je XTT test. Pomoću čitača mikrotitarskih pločica dobivene su vrijednosti apsorbancija formazana (koji nastaje enzimatskim transformiranjem XTT-a) koje su prikazane na slikama 36 i 37. Slika 36 predstavlja vrijednosti apsorbancija pri tretmanima na YPD podlozi, dok slika 37 vrijednosti apsorbancija pri tretmanima u umjetnoj slini. Vrijednosti „početak“ označavaju period nakon 4 sata rasta, a vrijednosti „kraj“ predstavljaju završetak reakcije, odnosno nakon 24 sata rasta kvasca na podlogama (bilo YPD ili umjetnoj slini).



**Slika 36.** Grafički prikazi izmjerenih apsorbancija nakon tretiranja stanica kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* W303 i DT na YPD podlozi iscrpinama ortodontskih materijala na početku i na kraju rasta na podlozi.



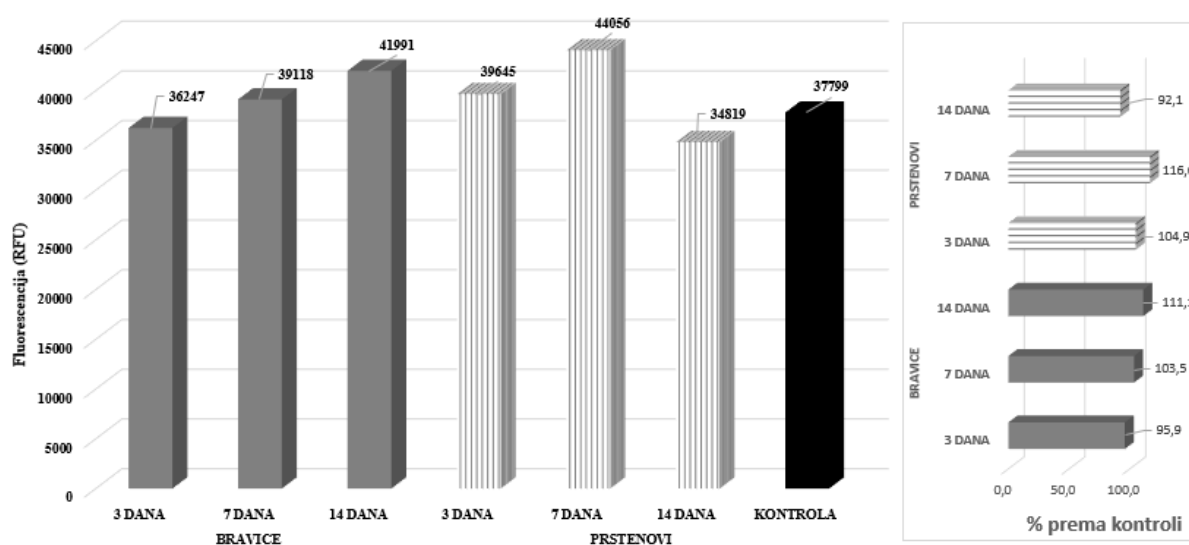
**Slika 37.** Grafički prikazi izmjerenih apsorbancija nakon tretiranja stanica kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* W303 i DT u umjetnoj slini iscrpinama ortodontskih materijala na početku i na kraju rasta na podlozi.



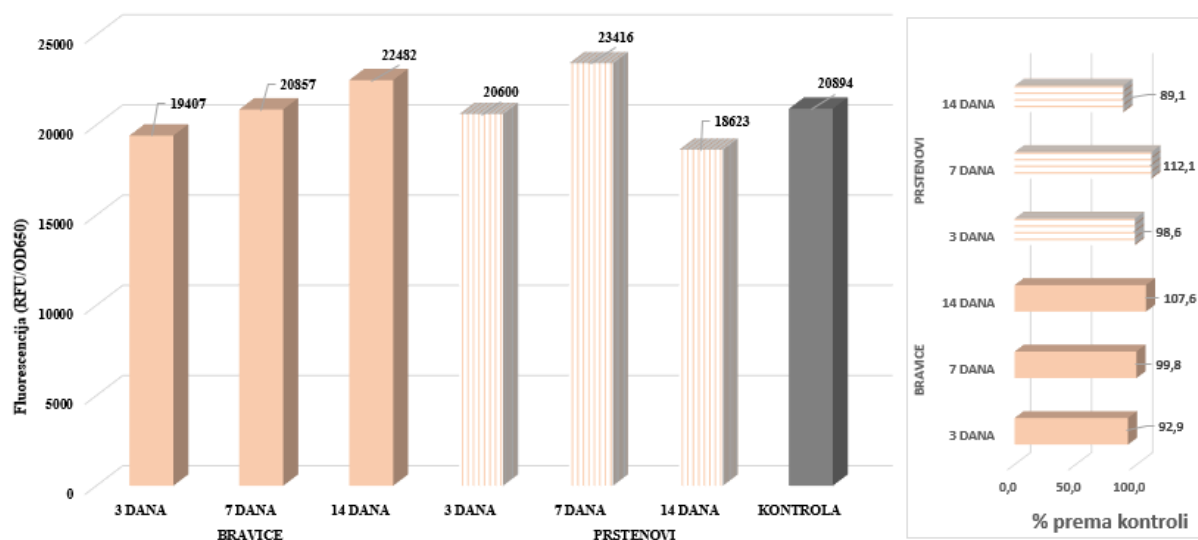
## 4.2. Određivanje unutarstanične oksidacije

Tijekom unutarstanične oksidacije stvaraju se i reaktivne vrste kisika, koji su okidači oksidativnoga stresa. Oksidativni stres se uobičajeno određuje na kraju stresnog djelovanja. Stoga su mjerenja izvršena nakon završenog rasta stanica kvasca *S. cerevisiae* W303 na YPD podlozi s iscrpinama bravica, odnosno prstenova, a vrijednosti su prikazane slikama 38 i 40. Slika 38 prikazuje izmjerene vrijednosti unutarstanične oksidacije stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 nakon rasta na iscrpinama metalnih iona iz ortodontskih prstenova i bravica, odstajalih u podlogama 3, 7 i 14 dana, dok slika 40 prikazuje iste parametre, no samo za divlji soj.

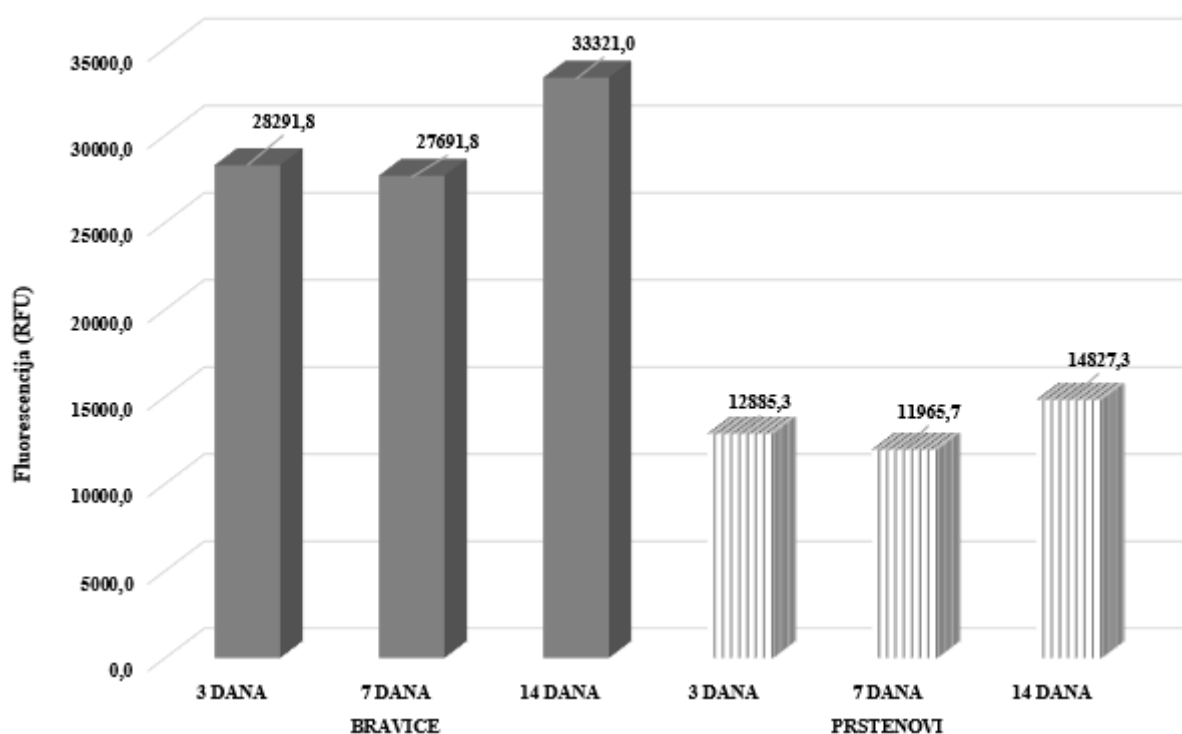
Slike 39 i 41 prikazuju iste omjere sa slika 38 i 40, no vrijednosti fluorescencije su podijeljene s optičkom gustoćom stanica pri 650 nm.



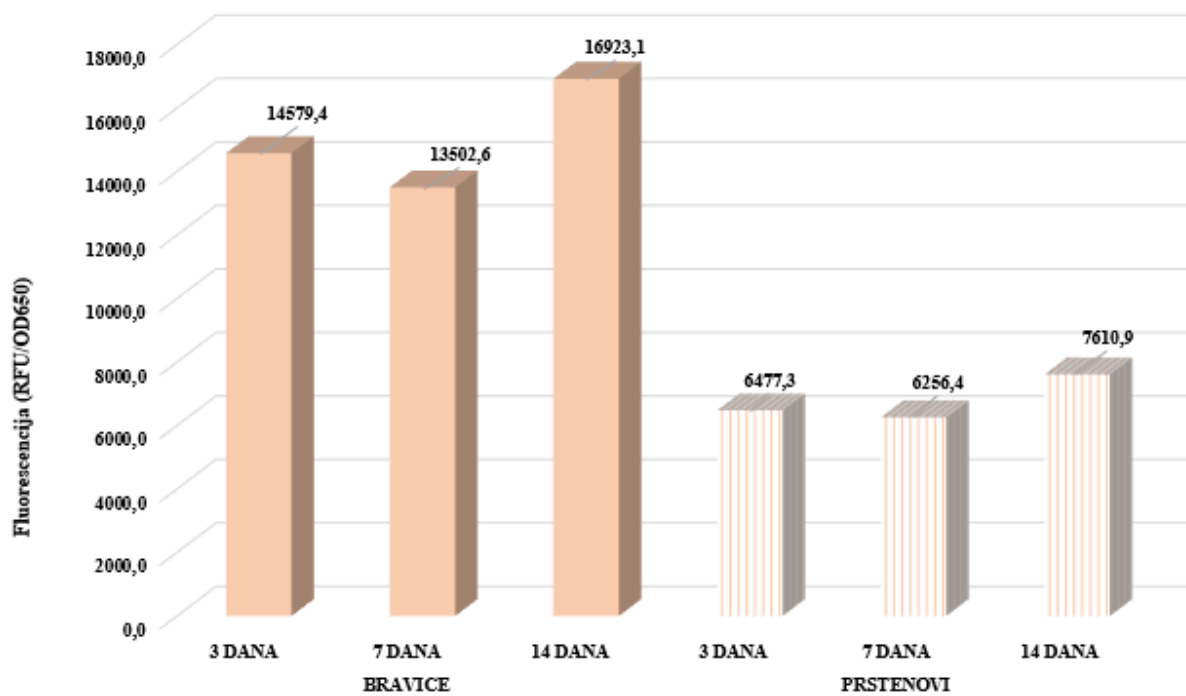
**Slika 38.** Grafički prikaz usporedbe unutarstanične oksidacije stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 nakon tretmana ionima ortodontskih bravica i prstenova. Vrijednost je izražena relativnom fluorescencijom (RFU).



**Slika 39.** Grafički prikaz usporedbe unutarstanične oksidacije stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 nakon tretmana ionima ortodontskih bravica i prstenova. Vrijednost je izražena omjerom fluorescencije i optičke gustoće stanica pri 650 nm.



**Slika 40.** Grafički prikaz usporedbe unutarstanične oksidacije stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* DT nakon tretmana ionima ortodontskih bravica i prstenova. Vrijednost je izražena relativnom fluorescencijom (RFU).



**Slika 41.** Grafički prikaz usporedbe unutarstanične oksidacije stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* DT nakon tretmana ionima ortodontskih bravica i prstenova. Vrijednost je izražena omjerom fluorescencije i optičke gustoće stanica pri 650 nm.

## 5. Rasprava

### 5.1. Određivanje vijabilnosti

#### 5.1.1. Određivanje krivulje rasta

Određene su krivulje rasta za oba soja kvasca tijekom 24-satnog rasta na YPD podlozi (slika 22) te umjetnoj slini (slika 23). Umjetna slina i YPD podloga su prethodno tretirane iscrpinama koje su u sebi sadržavale ione ortodontskih bravica i prstenova. Dobivene krivulje rasta uspoređene su s kontrolnim uzorkom, odnosno krivuljom rasta za oba soja kvasca u netretiranoj umjetnoj slini/YPD podlozi.

Ono što je odmah vidljivo jest velika razlika u izgledu (od forme krivulje do broja stanica) krivulja određenih na YPD podlozi i krivulja određenih u umjetnoj slini. Razlog tomu može ležati u činjenici da YPD podloga u svojem sastavu sadrži šećer (glukoza), dok kod umjetne sline to nije slučaj. Općenito, kvasci energiju (ATP) za svoj rast i razvoj dobivaju metaboliziranjem ugljika te upravo količina dostupnog ugljika određuje kako će se rast kvasca odvijati. Kvasci svoju metaboličku aktivnost mogu vršiti ili putem fermentacije (glukoza, fruktoza i sl.) ili putem mitohondrijske respiracije (glicerol, acetat, laktat, etanol), ovisno od fenotipa do fenotipa. No, s obzirom da je *S. c.* fenotip koji koristi fermentaciju (79) za metaboliziranje ugljika, YPD podloga može poslužiti kao izvrsna podloga za rast stanica *S. c.* oba soja, kao što je i vidljivo iz slike 22. S druge strane, ista činjenica može se uzeti kao obrazloženje slabijem rastu stanica u umjetnoj slini, kao što je vidljivo iz grafičkoga prikaza na slici 23. Kao što je već rečeno, umjetna slina ne sadrži šećere koje bi kvasac mogao fermentirati za proizvodnju ATP-a. Stoga, kvasci se različitim mehanizmima moraju prilagoditi rastu u mediju s ograničenim hranjivim uvjetima (80), kao što je umjetna slina. Prvenstveno, kvasci svoj brzi mitotički rast u bogatim medijima mogu zamijeniti siromašnim rastom zbog traženja hrane u ograničenim hranidbenim uvjetima. Također, tijekom izgladnjivanja stanice kvasca mogu se hraniti sadržajem vlastitog citosola procesom autofagije, dok se neke stanice izgladnjivanju suprotstavljaju sporulacijom, odnosno stvaranjem spora pomoću kojih preživljavaju u nepovoljnim uvjetima. Neke stanice, također, mogu ući u stanje „mirovanja“, koje karakterizira zadebljanje stanične membrane, povećano skladištenje ugljikohidrata, kompaktan kromatin te otpornost na toplinu i oksidativni stres. Ove navedene tvrdnje mogu se pretpostaviti kao razlozi gotovo nikakvom porastu broja stanica u umjetnoj slini.

Osim toga, razlike u pH vrijednostima umjetne sline i YPD podloge ne smiju se zanemariti. pH hranidbene podloge iznosi 5,5, što ujedno odgovara i optimalnoj vrijednosti pH za rast kvašćevih stanica. S druge strane, pH vrijednost umjetne sline iznosi oko 4,8, što je vrlo blizu minimalnom pH (4,5) pri kojemu stanice kvasca mogu rasti.

Lag faze (faza suzdržanog rasta) svih šest krivulja kvasca soja W303 na YPD podlozi traju između 5-10 sati, nakon kojih se idućih 10-ak sati stanice kvasca udvostručavaju jednakom brzinom u log fazi (fazi eksponencijalnoga rasta). No, kod krivulja rasta „prstenovi 7 dana“, „bravice 7 dana“ te „bravice 14 dana“ uočava se odstupanje od ostalih krivulja. Kod navedenih tretmana od 7 dana eksponencijalni rast je brži, no manji u usporedbi s ostalim krivuljama. S druge strane, kod navedenog tretmana 14 dana također je uočljiv manji, ali i sporiji eksponencijalni rast u usporedbi s ostalim krivuljama. Ipak, svih šest krivulja dosežu svoju stacionarnu fazu oko 20. sata rasta. Osim toga, vidljiva je očita odsutnost faze odumiranja kod svih šest krivulja. Naime, stacionarna faza može se odvijati satima unutar kojih kvasac, uz ostale mehanizme preživljavanja u nepovoljnim uvjetima koji su na početku navedeni, može koristiti mrtve stanice kao nadoknadu odsutnih nutrijenata. Također, moguće je da su stanice kvasca tijekom lag faze stvorile imunost na ione metala koji su se kasnije počeli ponašati kao induktori njihova rasta. Činilo bi se da kontrolni uzorak pokazuje najveći eksponencijalni rast, kao što je i očekivano, no „pobjedu“ za svega 0,01 ipak odnosi krivulja rasta uzorka tretiran iscrpinom ortodontskih prstenova od 14 dana, što je i iznenađujući podatak. No, mogući razlog takvom rezultatu nije pronađen u literaturama.

Iako krivulje nisu toliko ujednačene kao kod soja W303, ovoga puta krivulja rasta kontrolnog uzorka (DT) pokazuje najveći eksponencijalni rast. Također, uočljivo je podjednako trajanje lag faze rasta. Ipak, razlike su uočljive kod eksponencijalnih faza koje idu različitim brzinama te imaju različiti doseg, usprkos praktički sličnim vremenima postizanja stacionarnih faza. Kao i u slučaju stanica soja W303, ponovno je odsutna faza odumiranja kod svih šest krivulja, a razlozi navedeni u prethodnome odlomku mogu se pripisati i ovome slučaju.

Krivulje rasta stanica kvasca soja W303 i DT u umjetnoj slini, osim neprepoznatljivih faza rasta, pokazuju i drastično manji porast broja stanica u odnosu na porast stanica na YPD podlogama. Razlog se može pripisati vrsti podloge (uz nižu pH vrijednost umjetne sline), odnosno sastavu umjetne sline koja ne posjeduje hranjive tvari koje bi kvasci mogli fermentirati za svoj rast i razvoj. No također, iz nepravilnih oblika krivulja rasta obaju kontrolnih uzoraka može se posumnjati na kontaminaciju uzoraka tijekom ispitivanja. Ipak, jedna zanimljivost se

može izvući iz oba grafička prikaza. Krivulje rasta stanica oba soja kvasca tretiranih iscrpinama ortodontskih bravica od 7 dana i ortodontskih prstenova od 14 dana pokazuju najveća odstupanja od svih krivulja obaju sojeva. Štoviše, krivulja rasta stanica kvasca DT tretiranih bravicama od 7 dana jedina je krivulja koja pokazuje potencijalnu fazu umiranja oko 23. sata rasta.

Niske vrijednosti pH umjetne sline pospješuju razvijanje korozije, što rezultira otpuštanjem iona nikla koji se smatraju moćnim induktorima oksidativnoga stresa, pri tome oštećujući proteine, lipide i molekulu DNA. Wendl i sur. (73) navode kako ortodontski prstenovi oslobađaju veću količinu metalnih iona pri nižim pH vrijednostima od ortodontskih bravica. Također, Kuhta i sur. (74) dokazali su kako se količina otpuštenih iona pri nižim pH vrijednostima gotovo ustrojući u usporedbi s otpuštenom količinom iona kod viših pH vrijednosti ( $\geq 5,5$ ). Navedene činjenice također mogu se uzeti kao razlog smanjenome porastu stanica u umjetnoj slini nego na YPD podlozi, no Wendlov zaključak u ovome slučaju ne vrijedi, s obzirom da se najveći pomor stanica uočava kod tretmana stanica iscrpinom ortodontskih bravica od 7 dana.

### **5.1.2. Određivanje vijabilnosti stanica prebrojavanjem stanica LUNA-FL™**

#### **Dual fluorescence cell counter-om**

Vijabilnost (životnost) kvasaca oba soja na YPD podlozi te umjetnoj slini određena je korištenjem fluorescentne AOPI boje te brojača stanica LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter-a. Rezultati dobiveni brojačem stanica daju uvid u vijabilnost stanica kvasaca oba soja preko triju parametara: promjene broj/koncentracije stanica i postotka mrtvih stanica, promjene u veličini stanica te promjena u broju nakupina stanica.

Slike 24 i 25 prikazuju grafičke prikaze promjena ukupnoga broja stanica obaju sojeva kvasaca te broja živih i mrtvih stanica po tretmanima na YPD podlozi nakon tretmana iscrpinama s ionima ortodontskih bravica, odnosno prstenova.. Iz dvaju navedenih grafičkih prikaza načinjen je poseban grafički prikaz, kao na slici 26, gdje su prikazani i uspoređeni udjeli mrtvih stanica obaju sojeva kvasaca po tretmanima iscrpinama ortodontskih bravica i prstenova.. Iako je vidljivo da je koncentracija živih stanica daleko veća od koncentracije mrtvih stanica, udio mrtvih stanica obaju sojeva kvasaca veći je kod svih tretmana ionima ortodontskih prstenova na YPD podlozi, osim kod tretmana od 7 dana – DT. Rezultat i nije toliko iznenađujući kada se u obzir uzme činjenica da ortodontski prstenovi imaju veću tendenciju za otpuštanjem iona od ortodontskih bravica, što je i potvrđeno rezultatima

dobivenim ICP-MS analizom (ti rezultati nisu prikazani u ovom radu) na Institutu Ruđer Bošković (dalje u tekstu IRB). Otpušteni ioni, osim što oštećuju staničnu membranu kvasca i njegovu metaboličku aktivnost, mogu uzrokovati i oksidativni stres kojega karakteriziraju reakcije lipidne peroksidacije, oštećenja makromolekula (DNA molekula, proteini, lipidi) te oštećenje/ubijanje stanica.

Slika 28 prikazuje grafički prikaz promjene ukupnoga broja stanica obaju sojeva kvasaca te broja živih i mrtvih stanica po tretmanima u umjetnoj slini nakon tretmana iscrpinama s ionima ortodontskih bravica, odnosno prstenova. No, rezultati su prikazani samo za tretmane od tri dana. Prema podacima iz grafa, ioni ortodontskih bravica nisu oštetile/usmrtili niti jednu stanicu kvasca W303, dok se kod kvasca DT vidi ogroman postotak mrtvih stanica, što se može iščitati iz grafičkoga prikaza sa slike 29. Ioni ortodontskih prstenova rezultirali su sličnim ishodom – 0,5% stanica kvasca W303 su mrtve, dok kod stanica kvasca DT taj postotak iznosi 12,8. Ipak, ta razlika ne može se uzeti kao realan rezultat, a razlog ovoj ogromnoj razlici u postocima mrtvih stanica leži u prikazu sa slike 30. Uređaj LUNA-FL™ radi na principu izoštravanja slike do te razine da se svaka stanica na preparatu uspije raspoznati kao zasebna. No, to nije slučaj kod kvasca W303. Kao što je vidljivo na slici, iako se na preparatu mogu uočiti nakupine stanica, uređaj je cijelu nakupinu od, npr. 5-6 stanica prebrojao kao jednu stanicu te ju uvrstio u žive stanice. Upravo se zbog toga ne može dobiti realna slika o tretmanu stanica kvasca W303 iscrpinama ortodontskih bravica i prstenova od tri dana.

Slike 27 i 31 prikazuju veličine stanica obaju sojeva kvasca na YPD podlozi, odnosno u umjetnoj slini pri tretmanima iscrpina ortodontskih materijala. Može se uočiti da je prosječna veličina stanica kvasaca na YPD podlozi (oko 7  $\mu\text{m}$ ) daleko manja od prosječne veličine stanica kvasca u umjetnoj slini (oko 11  $\mu\text{m}$ ). Podloga koja stanici osigurava sve potrebno za rast i diobu omogućuje joj upravo to – rast i diobu. Manje stanice na YPD rezultat su intenzivnog rasta, dok su na umjetnoj slini ti procesi zaustavljeni i stanica je u veličini u kojoj se zatekla dostizanjem stacionarne faze, odnosno nešto je većega promjera.

### **5.1.3. Određivanje metaboličke aktivnosti**

Metabolička aktivnost određena je LIVE/DEAD Yeast Viability Kit-om, nakon čega su stanice promatrane pod fluorescentnim mikroskopom.

Slika 35 prikazuje stanice kvasca obojane FUN-1 bojom ((crvena – b) i zelena – c)) i Calcofluor White M2R bojom (plava – a). Calcofluor White M2R boja služi za dobivanje ukupnog broja stanica tako što sve stanice oboji plavo-ljubičasto, kao što je prikazano na slici

35 – a. S druge strane, FUN-1 boja služi za razlikovanje stanica prema metaboličkoj aktivnosti, tj. služi za razlikovanje metabolički aktivnih stanica od metabolički inaktivnih i mrtvih stanica. Žive i metabolički aktivne stanice prevode difuzno zeleno-žutu FUN-1 boju u crvenu boju u svojim citoplazmama (točnije – vakuoli), pri tome stvarajući crvene cilindrične strukture (CIVS) koje se na slici vide kao crveno tjelešce unutar plavo obojane stanice (slika 35 – d). Mehanizam nastajanja CIVS-a opisali su Van der Heggen i sur. (76). Prema njihovom izvještaju, djelovanjem enzima FUN-1 boja u citosolu reagira s reduciranim glutationom (GSH), stvarajući konjugate glutationa. Nakon biokemijskih modifikacija, takva FUN-1 boja transportira se i sekvstrira u vakuolu te prelazi u CIVS.

GSH i vakuola sudjeluju u detoksikaciji određenih metala. Vakuola služi kao mjesto za odlaganje štetnih iona koji mogu reagirati s komponentama stanice u citosolu, čime narušavaju metaboličku aktivnost stanice. S druge strane, GSH reagira s ionima metala, stvarajući komplekse te time smanjuje koncentraciju štetnih iona koji mogu oštetiti stanicu (76). Ukoliko dođe do oštećenja vakuole stanice kvasca, stanica tada ostaje živa, no postaje metabolički inaktivna. Kwolek-Mirek i Zadrąg-Teczko (78) objašnjavaju kako neki ioni ne moraju nužno dovesti do smrti stanice, već mogu uzrokovati fiziološke promjene (metaboličke, unutarstanične, morfološke), uzrokujući nemogućnost daljnjeg dijeljenja stanica. Takve stanice FUN-1 boju prevode iz zeleno-žute u crvenu, ali ne dolazi do stvaranja CIVS-a unutar vakuole zbog njezina oštećenja. Stoga, takve se stanice pod fluorescentnim mikroskopom vide crveno, kao što je prikazano na slici 35 – b. Slika 35 – c prikazuje mrtve stanice kvasca. Stanica se smatra mrtvom ukoliko nije u mogućnosti prevesti FUN-1 boju u crvenu niti stvoriti CIVS unutar svoje vakuole. Takva stanica je cijela obojena intenzivno zeleno. Ipak, treba razlikovati „zelenu mrtvu“ od „zelene žive“ stanice. Naime, metabolički aktivne stanice obojane su u početnoj fazi prozirno zelenom bojom, koja nakon nekog vremena (kad se u stanicama stvore CIVS) nestane.

Slike 32 i 34 prikazuju prosječne postotke metabolički aktivnih, metabolički inaktivnih i mrtvih stanica oba soja kvasca nakon tretmana ionima ortodontskih bravica (slika 32), odnosno ionima ortodontskih prstenova (34). Ukoliko se svih 12 stupaca međusobno usporede, odstupanje je vidljivo jedino kod stanica kvasca W303 tretiranih ionima ortodontskih bravica, gdje je koncentracija metabolički aktivnih stanica daleko niža, a koncentracije mrtvih i metabolički inaktivnih stanica daleko viša od ostalih 9 tretmana. U tome slučaju, samo 66% stanica kvasca su metabolički aktivne, dok udio mrtvih stanica iznosi visokih 20%, kao i udio metabolički inaktivnih stanica koji iznosi visokih 17%. Prema tome, može se pretpostaviti da



je došlo do velike apsorpcije nikla kroz stanične membrane stanica kvasca W303 nakon izloženosti ionima ortodontskih bravica te oštećenja vakuola u citoplazmi. Suprotno soju W303, kod soja DT kvasca priča je drugačija, kod kojega udio metabolički aktivnih stanica iznosi 90%, a udio mrtvih i metabolički aktivnih stanica iznose manje od 8%. Isto se može reći i za stanice kvasca oba soja nakon izloženosti ionima ortodontskih prstenova gdje udjeli metabolički aktivnih stanica iznose preko 95%, a udjeli mrtvih i metabolički inaktivnih stanica iznose također ispod 8%. Također, ako se uzme u obzir razlika između udjela metabolički inaktivnih i mrtvih stanica kvasca DT tretiranih ionima ortodontskih prstenova, koja iznosi oko 1%, može se pretpostaviti da je gotovo svaka metabolički inaktivna stanica ujedno i mrtva stanica.

#### **5.1.4. Određivanje stanične proliferacije i citotoksičnosti**

U ovome dijelu istraživanja korišteni su XTT test i čitač mikrotitarskih pločica. XTT test radi na principu sposobnosti živih i metabolički aktivnih stanica, čije su stanične i mitohondrijske membrane neoštećene, da prevedu žuti XTT u narančasti formazan, čija se apsorbanacija mjeri čitačem mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 450 nm.

Slika 37 prikazuje izmjerene vrijednosti apsorbanacija XTT testa na početku rasta s iscrpinama metalnih iona u umjetnoj slini te na kraju. Za samu reakciju potrebno je određeno vrijeme, tako da se početak može izmjeriti tek nakon 4 h (odnosno, u fazi kad su stanice iz lag-faze već prešle u eksponencijalnu fazu rasta)- i na kraju eksponencijalne faze (nakon 24 sata rasta na podlogama) za oba soja kvasca. Osim kod stanica kvasca W303 – kraj tretiranih iscrpinama ortodontskih prstenova, kod svih ostalih tretmana stanica oba soja iscrpinama ortodontskih materijala od 14 dana izmjerene su najmanje apsorbanacije, koje ujedno predstavljaju najmanji broj živih i metabolički aktivnih stanica. Kod ovoga rezultata otvara se diskusija. S jedne strane, ovakav bi rezultat bio i očekivan, budući da bi iscrpine koje sadrže ione ortodontskih materijala nakon 14 dana trebale posjedovati i najveću količinu spomenutih iona kada bi se zbrojile njihove masene koncentracije. Duža izloženost većoj količini štetnih iona opterećivala bi antioksidativni sustav stanica kvasca, narušavajući metaboličku aktivnost. Takva oslabljena metabolička aktivnost rezultira bi slabijim prevođenjem XTT-a u narančasti formazan (kao u ovome slučaju), posljedično uzrokujući slabije izmjerenu apsorbanaciju. Uz to, Mariano da Silva i sur. (81) dokazali su da niže vrijednosti pH (pH umjetne sline iznosi 4,8) povećavaju apsorpciju  $\text{Ni}^{2+}$ , što dodatno potvrđuje ovu hipotezu. No s druge strane, ICP-MS analizom dokazano je ogromno izlučivanje iona kroma i, neočekivano – željeza u iscrpinama s ortodontskim prstenovima nakon 7 dana, a ne 14 dana. Oba metala su redoks-aktivni metali i za pretpostaviti je da će djelovati u sinergiji. Toksični učinci iona  $\text{Fe}^{3+}$  (uz ione  $\text{Pb}^{2+}$ ) na stanice

kvasca *S. cerevisiae*, istraživan je i dokazan za stanice *S. cerevisiae* W303 u istraživanju Čanadi Jurešić i sur. (77). Prema tome, najmanje izmjerene apsorbancije ipak su očekivanije kod tretmana ortodontskih prstenova nakon 7 dana, što ovdje nije slučaj.

Na dalje, na slici 36 koja prikazuje izmjerene vrijednosti apsorbancija XTT testa nakon 4- i 24-satnog tretiranja stanica oba soja kvasca iscrpinama ortodontskih materijala na YPD podlozi ne može se uočiti slična situacija kao na slici 37. Kao i u prethodnome slučaju, najmanje izmjerene apsorbancije, odnosno najmanje koncentracije živih i metabolički aktivnih stanica očekivane su kod tretmana iscrpinama ortodontskih materijala od 14 dana. Na YPD podlozi takav tretman pokazuje očekivani rezultat samo u jednom mjerenju – kod stanica kvasca W303 – kraj, tretiranih iscrpinama ortodontskih prstenova, koji su u prethodnome primjeru bili jedina iznimka s najvećom apsorbancijom. No, u čak 4 slučaja (W303 – početak, DT – početak, W303 – početak i DT – kraj) najmanja apsorbancija izmjerena je kod tretmana iscrpinama ortodontskih materijala od 7 dana. Stanice s malom izmjerenom apsorbancijom najvjerojatnije imaju oštećene mitohondrijske membrane (što ujedno narušava i mitohondrijsku respiraciju), budući da se XTT test bazira na prevođenju žutoga XTT u narančasti formazan pomoću enzima (NADH) kojega stvaraju upravo – mitohondriji. No, prema već spomenutim rezultatima ICP-MS analize s IRB-a, iscrpine ortodontskih materijala od 7 dana u sebi su najviše sadržavale ione  $\text{Cr}^{3+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ . Iako su u 4 prethodno navedena slučaja navedeni i kvasci DT, njihova apsorbancija (DT bravice – početak (81,6) i DT prstenovi – kraj (45,7)) je veća od apsorbancija soja W303 (W303 bravice – početak (24,5) i W303 prstenovi – početak (3,8)), što ponovno potvrđuje štetnije djelovanje željeza (odnosno kombinacije željeza i kroma) na soj W303 (77).

## 5.2. Određivanje unutarstanične oksidacije

Određivanje unutarstanične oksidacije bazira se na reakciji 2',7'-diklorfluorescein diacetata ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) s oksidansima prisutnim u stanicama kvasca. Nakon završene reakcije,  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  oksidira u fluorescentni 2',7'-diklorfluorescein (DCF) koji se potom određuje fluorimetrijski.

Slike 38 i 40 prikazuju uspoređene vrijednosti izmjerenih unutarstaničnih oksidacija u stanicama kvasca W303, odnosno kvasca DT nakon tretiranja iscrpinama ortodontskih materijala. Iako unutarstanična oksidacija kontrolnog uzorka kvasca DT nije izmjerena, prvo što se može uočiti uspoređujući slike 38 i 40 su daleko veće vrijednosti unutarstaničnih oksidacija prisutnih kod stanica kvasca W303 nego kod kvasca DT. Ovdje se ponovno može pozvati na rezultate dobivene ICP-MS analizom. Ogromne količine otpuštenih iona  $\text{Cr}^{3+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$

opterećuju antioksidativni sustav stanica kvasca soja W303, koji je podložniji toksičnom učinku željezovih iona od soja DT. Prema tome, činjenica da na slici 38 najveću izmjerenu vrijednost unutarstanične oksidacije imaju stanice kvasca W303 tretirane iscrpinama ortodontskih prstenova od 7, a ne 14 dana dana i nije toliko iznenađujuća. Kombinacija redoks aktivnih iona željeza i kroma, čije su koncentracije više u 7.-dnevnom tretmanu (u odnosu na 14 dana) vjerojatan su uzrok najvećih izmjerenih vrijednosti unutarstanične oksidacije upravo u toj točki.

No, slika 38 prikazuje jednu zanimljivost kod stanica kvasca W303 tretirane iscrpinom ortodontskih prstenova od 14 dana. Osim što navedene stanice imaju najmanje izmjerenu unutarstaničnu oksidaciju od ostala dva tretmana ortodontskim prstenovima, one također imaju najmanje izmjerenu vrijednost unutarstanične oksidacije i od svih tretmanima iscrpinama ortodontskih bravica. Osim toga, još jedna nepravilnost kod tretmana iscrpinama ortodontskim prstenovima može se uočiti na slici 40. Sva tri tretmana stanica kvasca DT iscrpinama ortodontskih prstenova imaju puno manje izmjerene vrijednosti unutarstaničnih oksidacija od vrijednosti izmjerenih kod tretmana iscrpinama ortodontskih bravica. Također, kada bi se zbrojile sve tri izmjerene vrijednosti kod tretmana ortodontskim prstenovima, zbroj unutarstanične oksidacije bio bi manji od izmjerene vrijednosti kod tretmana iscrpinom ortodontskih bravica od 14 dana.

Ortodontske bravice i prstenovi su relativno novija tema istraživanja znanstvenoga svijeta kada je u pitanju njihovo lučenje štetnih iona teških metala. Stoga, izbor literatura iz kojih bi se mogao donijeti nekakav zaključak vrlo je uzak te se ovi specifični rezultati unutarstaničnih oksidacija nisu mogli pomnije objasniti i obrazložiti.

## 6. Zaključci

Kada se sagleda cjelokupna slika dobivenih rezultata ovoga diplomskoga rada, može se zaključiti da ortodontske bravice i prstenovi:

- negativno utječu na rast tretiranih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 i DT u usporedbi s netretiranim uzorkom. Na rast utječu i vrsta tretmana, ali i podloga, budući da je porast broja stanica na YPD podlozi, koja sadrži mnoštvo nutrijenata za kvasce, dominantiji nego rast u umjetnoj slini koja ne posjeduje hranjive tvari koje bi kvasci mogli fermentirati. Osim toga, niži pH umjetne sline također narušava rast kvašćevih stanica oba soja. Kvasci soja W303 osjetljiviji su na ione ortodontskih bravica i prstenova nego što je kvasac DT.

-narušavaju vijabilnost stanica kvasca oba soja, a ponajviše soja W303. Ioni ortodontskih prstenova pokazuju jači potencijal narušavanja vijabilnosti stanica oba soja, uzrokujući veći postotak mrtvih stanica nego ioni ortodontskih bravica. Vijabilnost stanica kvasaca soja W303 narušenija je od vijabilnosti kvasca DT.

-narušavaju metaboličku aktivnost stanica oba soja, a ponajviše soja W303. Ioni ortodontskih bravica pokazuju veći potencijal narušavanja metaboličke aktivnosti stanica kvasca soja W303 nego ioni ortodontskih prstenova.

-oštećuju mitohondrije stanica kvasca oba soja, a ponajviše soja W303. Najveće oštećenje javlja se pri tretmanu iscrpinama s ionima ortodontskih materijala nakon 7 dana zbog oslobađanja željeza (uz nikel i krom) koji ima izrazito toksičan učinak na stanice kvasca soja W303.

-uzrokuju stvaranje reaktivnih vrsta kisika (ROS) unutar stanica kvasca oba soja, što stvara potencijalnu opasnost od oksidativnoga stresa. Veća unutarstanična oksidacija izmjerena je kod kvasca soja W303 nego kod kvasca DT.

## 7. Literatura

1. Blatz M. B., Chiche G., Bahat O., Roblee R., Coachman C. i Heymann, H. O. Evolution of Aesthetic Dentistry. *Journal of Dental Research*. (Internet). 2019 (pristupljeno 02.06.2021.);98(12):1294–1304. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31633462/>
2. Asbell M. B. A brief history of orthodontics. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. (Internet). 1990 (pristupljeno 02.06.2021.);98(3):206–213. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2206040/>
3. Katalinić A., Radica N., Špalj S. i Varga, S. *Ortodontski priručnik. Udžbenici Sveučilišta u Rijeci = Manualia universitatis studiorum fluminensis*, 2012;90(7):76-97.
4. Peck S. The contributions of Edward H. Angle to dental public health. *Community Dent Health*. (Internet). 2009 (pristupljeno 02.06.2021.);26(3):130-131. Dostupno na: <https://www.cdjournal.org/issues/26-3-september-2009/226-editorial-the-contributions-of-edward-h-angle-to-dental-public-health>
5. Friberg L., Fowler B. A., Nordberg G. F. i Nordberg M. *Handbook on the toxicology of metals (third (3<sup>rd</sup>) edition)*. (Internet). 2007 (pristupljeno 02.06.2021.):487-510, 731-741, 743-758. Dostupno na: <https://www.elsevier.com/books/handbook-on-the-toxicology-of-metals/nordberg/978-0-12-369413-3>
6. Von Fraunhofer J. A. Corrosion of orthodontic devices. *Seminars in Orthodontics*. (Internet). 1997 (pristupljeno 02.06.2021.);3(3):198–205. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9573881/>
7. Sifakakis I. i Eliades, T. Adverse reactions to orthodontic materials. *Australian Dental Journal*. (Internet). 2017 (pristupljeno 03.06.2021.);62:20–28. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28297095/>
8. Chaturvedi T. P. i Upadhayay S. N. An overview of orthodontic material degradation in oral cavity. *Indian journal of dental research*. (Internet). 2010 (pristupljeno 03.06.2021.);21(2):275-284. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20657101/>
9. Barceloux D. G. i Barceloux D. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. (Internet). 1999 (pristupljeno 04.06.2021.);37(2):173-194, 231-237, 239-258. Dostupno na: <https://www.tandfonline.com/toc/ictx19/37/2>
10. Price N. i Rahilly G. Nickel allergy in orthodontics. *Journal of orthodontics*. (Internet). 2003 (pristupljeno 04.06.2021.);30(2):171-174. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12835436/>

11. Pavlić A. Utjecaj nikla kao produkta korozije nikal-titanijske legure dentalnih materijala na komenzalne bakterije ljudskoga organizma (doktorska disertacija). Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet. (Internet). 2019 (pristupljeno 04.06.2021.). Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/1035224>
12. Das K. K. i sur. Primary concept of nickel toxicity – an overview. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. (Internet). 2018 (pristupljeno 04.06.2021.);30(2):1-12. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30179849/>
13. Bronner F. i Coburn J. W. *Disorders of Mineral Metabolism*, First (1<sup>st</sup>) edition. (Internet). 1981 (pristupljeno 05.06.2021.):201-232. Dostupno na: <https://www.elsevier.com/books/disorders-of-mineral-metabolism/bronner/978-0-12-135301-8>
14. Mršić-Pelčić. Specijalna toksikologija II. (Materijali s predavanja). Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci. Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva. 2020.
15. Das K. K. i Das S. N. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *The Indian Journal of Medical Research*. (Internet). 2008 (pristupljeno 05.06.2021.);128(4):412-425. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/23688113\\_Nickel\\_its\\_adverse\\_health\\_effects\\_oxidative\\_stress](https://www.researchgate.net/publication/23688113_Nickel_its_adverse_health_effects_oxidative_stress)
16. Doreswamy K. i sur. Nickel-Induced Oxidative Stress in Testis of Mice: Evidence of DNA Damage and Genotoxic Effects. *Journal of Andrology*. (Internet). 2004 (pristupljeno 05.06.2021.);25(6):996-1003. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15477375/>
17. Chen C.-Y., Wang Y.-F., Lin, Y.-H. i Yen S.-F. Nickel-induced oxidative stress and effect of antioxidants in human lymphocytes. (Internet). *Archives of Toxicology*. 2003 (pristupljeno 05.06.2021.);77(3):123–130. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12632251/>
18. Detel D. Prehrana i zdravlje. (Materijali s predavanja). Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci. Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva. 2020.
19. Das K. K. i Büchner, V. Effect of nickel exposure on peripheral tissues: Role of oxidative stress in toxicity and possible protection by ascorbic acid. *Reviews on Environmental Health*. (Internet). 2007 (pristupljeno 06.06.2021.);22(2):157-173. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17894205/>
20. Rinčić-Mlinarić M. Nikal-titanske ortodontske žice u interakciji s oralnim antisepticima: kemijski, mehanički i biološki učinak (doktorska disertacija). Zagreb: Sveučilište u

- Zagrebu, Stomatološki fakultet. (Internet). 2018 (pristupljeno 06.06.2021.). Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/971223?&rad=971223>
21. Katić V. Utjecaj sredstava za remineralizaciju cakline na koroziju ortodontskih nikal-titanskih žičanih lukova (doktorska disertacija). Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet. (Internet). 2016 (pristupljeno 06.06.2021.). Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/832530>
  22. Vara D. i Pula G. Reactive Oxygen Species: Physiological Roles in the Regulation of Vascular Cells. *Current Molecular Medicine*. (Internet). 2014 (pristupljeno 07.06.2021.);14(9):1-23. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/262845999\\_Reactive\\_Oxygen\\_Species\\_Physiological\\_Roles\\_in\\_the\\_Regulation\\_of\\_Vascular\\_Cells](https://www.researchgate.net/publication/262845999_Reactive_Oxygen_Species_Physiological_Roles_in_the_Regulation_of_Vascular_Cells)
  23. Lunk H.-J. Discovery, properties and applications of chromium and its compounds. *ChemTexts* 1. (Internet). 2015 (pristupljeno 07.06.2021.);6:1-23. Dostupno na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40828-015-0007-z>
  24. Barnhart J. (1997). Occurrences, Uses, and Properties of Chromium. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. (Internet) 1997 (pristupljeno 07.06.2021.);26(1):S3–S7. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0273230097911326>
  25. Wilbur S. i sur. Toxicological Profile for Chromium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US). (Internet). 2012 (pristupljeno 07.06.2021.). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK158851/>
  26. Goyer R. A. i Cherian M. G. Toxicology of metals. *Handbook of Experimental Pharmacology*. (Internet). 1995 (pristupljeno 09.06.2021.):115;215–228. Dostupno na: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-79162-8>
  27. EPA. Toxicological review of hexavalent chromium (pristupljeno 09.06.2021.). Dostupno na: [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris\\_documents/documents/toxreviews/0144tr.pdf](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/0144tr.pdf)
  28. Gad S. C. Acute and chronic systemic chromium toxicity. *Science of The Total Environment*. (Internet). 1989 (pristupljeno 09.06.2021.):86(1-2);149–157. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2690338/>
  29. Yassaei S., Dadfarnia S., Ahadian H., i Moradi, F. Nickel and chromium levels in the saliva of patients with fixed orthodontic appliances. *Orthodontics The Art and Practice of Dentofacial Enhancement*. (Internet). 2013 (pristupljeno 10.06.2021.):14(1);e76–81. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23646341/>
  30. Mirashemi A., Jahangiri S. i Kharrazifard M. Release of nickel and chromium ions from orthodontic wires following the use of teeth whitening mouthwashes. *Progress in*

- Orthodontics. (Internet). 2018 (pristupljeno 10.06.2021.);19(4):1-5. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29399703/>
31. Sfondrini M. F. i sur. Chromium Release from New Stainless Steel, Recycled and Nickel-free Orthodontic Brackets. The Angle Orthodontist. (Internet). 2019 (pristupljeno 10.06.2021.);79(2):361–367. Dostupno na: <https://meridian.allenpress.com/angle-orthodontist/article/79/2/361/59599/Chromium-Release-from-New-Stainless-Steel-Recycled>
32. Park H. Y. i Shearer T. R. In vitro release of nickel and chromium from simulated orthodontic appliances. American Journal of Orthodontics. (Internet). 1986 (pristupljeno 11.06.2021.);84(2):156–159. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6576640/>
33. Bhasin V. i sur. Assessment of Changes in Nickel and Chromium Levels in the Gingival Crevicular Fluid during Fixed Orthodontic Treatment. The Journal of Contemporary Dental Practice. (Internet). 2017 (pristupljeno 12.06.2021.);18(8):675-678. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28816188/>
34. Ramadan A. A.-F. Effect of nickel and chromium on gingival tissues during orthodontic treatment: a longitudinal study. World Journal of Orthodontics. (Internet). 2004 (pristupljeno 12.06.2021.);5(3):230-234. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15612342/>
35. Elwell W. T. i Wood D. F. Analytical Chemistry of Molybdenum and Tungsten. (Internet). 1971 (pristupljeno 15.06.2021.);47:1-11. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/book/9780080166735/analytical-chemistry-of-molybdenum-and-tungsten>
36. Rajagopalan K. V. Molybdenum - An Essential Trace Element in Human Nutrition. Nutrition Reviews. 2009 (pristupljeno 15.06.2021.);45(1):401-422. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3060171/>
37. Novotny J. A. i Peterson C. A. Molybdenum. Advances in Nutrition. (Internet). 2018 (pristupljeno 16.06.2021.);9(3):272–273. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29767695/>
38. Todd. G. D. i sur. Toxicological Profile for Molybdenum. (Internet). 2020 (pristupljeno 16.06.2021.):61-76. Dostupno na: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp212.pdf>
39. Berislav M. A Case Report of Acute Human Molybdenum Toxicity from a Dietary Molybdenum Supplement – A New Member of the »Lucor Metallicum« Family. Arh Hig Rada Toksikol. (Internet). 1999 (pristupljeno 17.06.2021.);50(3):289-297. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/2715>



40. Gupta R. C. Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles (second (2<sup>nd</sup>) edition). Academic Press. (Internet). 2012 (pristupljeno 18.06.2021.):544-548. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123859266000405>
41. Wexler P. Encyclopedia of Toxicology (third (3<sup>rd</sup>) edition). (Internet). 2014 (pristupljeno 18.06.2021.):383-388. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123864543008848>
42. Kurtzman C. P., Fell J. W. i Boekhout T. The Yeasts (fifth (5<sup>th</sup>) edition). (Internet). 2010 (pristupljeno 18.06.2021.):3-5, 21-44. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/book/9780444521491/the-yeasts>
43. Kalenić S., Missoni E. i sur. Medicinska bakteriologija i mikologija (drugi (2.) izdanje). Zagreb: Merkur A.B.D. 2005:421-426.
44. Duraković S. i Redžepović S. Uvod u opću mikrobiologiju. Zagreb: Kugler. 2003:231-232.
45. Grba S. i sur. Kvasci u biotehnoškoj proizvodnji. Zagreb: Plejada. 2010:238-244.
46. Vrsalović-Presečki A. Studij procesa pridobivanja enzima u rastućim stanicama pekarskog kvasca (magistarski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. (Internet). 2003 (pristupljeno 19.06.2021.). Dostupno na: [https://bib.irb.hr/datoteka/141973.Ana\\_Vrsalovi\\_Preseki\\_magistarski\\_rad.pdf](https://bib.irb.hr/datoteka/141973.Ana_Vrsalovi_Preseki_magistarski_rad.pdf)
47. Feldmann H. Yeast: Molecular and Cell Biology (first (1<sup>st</sup>) edition. Wiley Blackwell. (Internet). 2010 (pristupljeno 20.06.2021.):5-24.
48. Kalenić S. i sur. Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada – Zagreb. 2013:511-515.
49. Van der Klei I. J. i Veenhuis M. (2006). Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. (Internet). 2006 (pristupljeno 20.06.2021.);1763(12):1364–1373. Dostupno na: [https://www.academia.edu/19808678/Yeast\\_and\\_filamentous\\_fungi\\_as\\_model\\_organisms\\_in\\_microbody\\_research](https://www.academia.edu/19808678/Yeast_and_filamentous_fungi_as_model_organisms_in_microbody_research)
50. Nielsen J. Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. Biotechnology Journal. (Internet). 2019 (pristupljeno 20.06.2021.):1-9. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biot.201800421>
51. Dymond J. S. *Saccharomyces cerevisiae* growth media. Methods in enzymology. (Internet). 2013 (pristupljeno 21.06.2021.);533:191-204. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24182924/>
52. Andričić B. Vježbe iz biotehnoških procesa (skripta za internu uporabu. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnoški fakultet. (Internet). 2006 (pristupljeno 21.06.2021.). Dostupno na: [http://tkojetko.irb.hr/documents/16691\\_2126.pdf](http://tkojetko.irb.hr/documents/16691_2126.pdf)

53. Batt C. A. i Tortorello M. L. Encyclopedia of Food Microbiology (second (2<sup>nd</sup>) edition. (Internet). 2014 (pristupljeno 22.06.2021.):297-301, 309-315. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780123847331/encyclopedia-of-food-microbiology>
54. Karathia H., Vilaprinyo E., Sorribas A. i Alves R. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative study. PloS ONE. (Internet). 2011 (pristupljeno 23.06.2021.):6(2);1-10. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21311596/>
55. House K. Corrosion of orthodontic appliances—should we care? American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. (Internet). 2008 (pristupljeno 23.06.2021.);133(4):584-592. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18405823/>
56. Wysocki R. i Tamas M. J. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. FEMS Microbiology Reviews. (Internet). 2010 (pristupljeno 24.06.2021.);34(6):925-951. Dostupno na: <https://academic.oup.com/femsre/article/34/6/925/593039>
57. Ortiz A. J. i sur. Metallic ions released from stainless steel, nickel-free, and titanium orthodontic alloys: Toxicity and DNA damage. AJO-DO. (Internet). 2011 (pristupljeno 24.06.2021.);140(3):115-122. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21889059/>
58. Monnet-Corti V., Antezack A. i Pignoly, M. Comment parfaire l'esthétique du sourire : toujours en rose! L'Orthodontie Française. (Internet). 2018 (pristupljeno 25.06.2021.);89(1):71–80. Dostupno na: <https://ur.booksc.eu/book/72048813/d3bf3c>
59. Van der Geld P., Oosterveld P., Van Heck G. i Kuijpers-Jagtman A. M. Smile Attractiveness. Self perception and influence on personality. The Angle Orthodontist. (Internet). 2007 (pristupljeno 25.06.2021.);77(5):759–765. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17685777/>
60. Phulari B. S. History of orthodontics. US Krishna Nayak. (Internet). 2013 (pristupljeno 25.06.2021.): 1-24. Dostupno na: [https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=UNNhyMz\\_fowC&oi=fnd&pg=PA1808&dq=history+of+orthodontics&ots=MJ\\_gSZJqij&sig=dAoy2puyXu1PDKSyJNyjINfgWuQ&redir\\_esc=y#v=onepage&q=history%20of%20orthodontics&f=false](https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=UNNhyMz_fowC&oi=fnd&pg=PA1808&dq=history+of+orthodontics&ots=MJ_gSZJqij&sig=dAoy2puyXu1PDKSyJNyjINfgWuQ&redir_esc=y#v=onepage&q=history%20of%20orthodontics&f=false)
61. Will L. A. A century of development and debate. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. (Internet). 2015 (pristupljeno 26.06.2021.);148(6):901–913. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26672696/>

62. Anonymous. The history of orthodontics. (Internet). 2018 (pristupljeno 26.06.2021.). Dostupno na: <https://cephx.com/the-history-of-orthodontics/>
63. Katić V. i Špalj S. Ispitivanje svojstava materijala za uporabu u dentalnoj medicini. Medicina Fluminensis. (Internet). 2014 (pristupljeno 27.06.2021.);50(3):268-278. Dostupno na <https://hrcak.srce.hr/126274>
64. Špalj S. Pretklinička ortodoncija. (Materijali s predavanja). Rijeka. Sveučilište u Rijeci, Fakultet dentalne medicine i zdravstva. 2020.
65. Zheng L. W., Wang J. Y. i Yu R. Q. Encyclopedia of biomedical engineering, Chapter 3 – Biomaterials in dentistry. Reference Module in Biomedical Sciences. (Internet). 2018 (pristupljeno 27.06.2021.):1-12. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383110335>
66. Iijima M. i sur. Orthodontic brackets. Orthodontic Applications of Biomaterials. (Internet). 2017 (pristupljeno 30.06.2021.):75–96. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/312006957\\_Orthodontic\\_brackets](https://www.researchgate.net/publication/312006957_Orthodontic_brackets)
67. Retamoso L. B. i sur. Cytotoxicity of esthetic, metallic, and nickel-free orthodontic brackets: Cellular behavior and viability. American Journal of orthodontics and dentofacial orthopedics. (Internet). 2012 (pristupljeno 02.07.2021.);142(1):70-74. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22748992/>
68. Higuera V. Healthline – What are molar bands? (Internet). 2020 (pristupljeno 02.07.2021.). Dostupno na: <https://www.healthline.com/health/molar-bands>
69. Watson S. Verywell Health – Orthodontic Bands. (Internet). 2019 (pristupljeno 03.07.2021.). Dostupno na: <https://www.verywellhealth.com/orthodontic-band-definition-1059430>
70. Ardeshtna T. TruCare Dentistry – A Simple Guide To Know Everything About Molar Bands. (Internet). 2021 (pristupljeno 03.07.2021.). Dostupno na: <https://www.trucaredentistry.com/blog/know-everything-about-molar-bands/>
71. Anonymous. Ortis – Ortodontski prstenovi – što su i kakvu ulogu imaju? (Internet). 2021 (pristupljeno 05.07.2021.). Dostupno na: <https://ortis.co.rs/vesti/ortodontski-prstenovi-sta-su-i-kakvu-ulogu-imaju>
72. Wendl B. i sur. (2017). Metal release profiles of orthodontic bands, brackets, and wires: an in vitro study. Journal of Orofacial Orthopedics / Fortschritte Der Kieferorthopädie. (Internet). 2017 (pristupljeno 30.08.2021.);78(6):494–503. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28913542/>

73. Kuhta M i sur. Type of archwire and level of acidity: effects on the release of metal ions from orthodontic appliances. *Angle Orthod.* (Internet). 2009 (pristupljeno 04.09..2021.);79(1):102–110. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19123703/>
74. Mariano-da-Silva S. i sur. Effects of nickel on the mineral composition of Fleischmann's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Efeitos do níquel na composição mineral da levedura Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*). *Food Science and Technology International* (Internet). 2007 (pristupljeno 04.09.2021.);27(3):503-510. Dostupno na: <https://www.scielo.br/j/cta/a/zHBQYz5TLnLBBc9CvZySK4h/?format=pdf&lang=en>
75. Šaravanja I. Učinak iona metala koji se otpuštaju iz legura ortodontskih naprava na metaboličku aktivnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (završni rad). Rijeka. Sveučilište u Rijeci: Medicinski fakultet. (Internet). 2019 (pristupljeno 11.07.2021.). Dostupno na: <https://repository.medri.uniri.hr/islandora/object/medri%3A3372/datastream/PDF/view>
76. Van der Heggen M., Martins S., Flores G. i Soares E. V. Lead toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* (Internet). 2010 (pristupljeno 09.09.2021.);88(6):1355–1361. Dostupno na: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10934529909376885>
77. Čanadi Jurešić G. i sur. Response of *Saccharomyces cerevisiae* W303 to Iron and Lead Toxicity in Overloaded Conditions. *Current Microbiology.* (Internet). 2021 (pristupljeno 09.09.2021.);78(4):1188-1201). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33624192/>
78. Kwolek-Mirek, M., & Zadrag-Tecza, R. (2014). Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research.* (Internet). 2014 (pristupljeno 09.09.2021.);14(7):1068-1079. Dostupno na: <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202>
79. Olivares Marin I. K., González-Hernández J. C., Regalado-Gonzales C. i Madrigal-Perez L. A. *Saccharomyces cerevisiae* Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism. *Journal of Visualized Experiments.* 2018;139:1-10.
80. Broach J. R. Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. . (Internet). 2012 (pristupljeno 10.09.2021);192(1):73-105. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22964838/>
81. Mariano-da-Silva S. i sur. Effects of nickel on the mineral composition of Fleischmann's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Efeitos do níquel na composição mineral da levedura Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*). *Food Science and Technology International*

(Internet). 2007 (pristupljeno 04.09.2021.);27(3):503-510. Dostupno na:  
<https://www.scielo.br/j/cta/a/zHBQYz5TLnLBBc9CvZySK4h/?format=pdf&lang=en>

## 8. Prilozi

### 8.1. Popis slika

<b>Slika 1.</b> Estetski osmijeh unutar okvira lica.....	1
<b>Slika 2.</b> Prikaz „bandelette“, koju je dizajnirao Pierre Fauchard za proširenje zubnih lukova.	2
<b>Slika 3.</b> Edward H. Angle, otac moderne ortodoncije .....	3
<b>Slika 4.</b> Usporedba dvaju edgewise modela (slika A prikazuje Andrewsov luk, a slika B Angleov luk).....	4
<b>Slika 5.</b> Ortodontska bravica zasebno (lijevo) i kao dio ortodontske naprave (desno).....	5
<b>Slika 6.</b> Ortodontski prsten zasebno (lijevo) i primijenjen na zub (desno).....	7
<b>Slika 7.</b> Nikal .....	10
<b>Slika 8.</b> Mehanizam djelovanja vitamina C (gornja slika) i vitamina E (donja slika) pri detoksikaciji molekule ROS-a.....	16
<b>Slika 9.</b> Intraoralna (lijevo) i ekstraoralna (desno) alergijska reakcija na nikal kao komponente ortodontske naprave edgewise tip .....	18
<b>Slika 10.</b> Molibden.....	19
<b>Slika 11.</b> Krom.....	23
<b>Slika 12.</b> Poprečni presjek blastokonidije.....	28
<b>Slika 13.</b> Stanice kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> promatrane digitalnim mikroskopom pod tri povećanja (x100, x400 i x1000) .....	30
<b>Slika 14.</b> Krivulja rasta kvasaca u pet faza .....	31
<b>Slika 15.</b> Prikaz sheme mikrotitarske pločice za određivanje broja stanica kvasca <i>Sacharomyces cerevisiae</i> W303 te XTT testa.....	38
<b>Slika 16.</b> Prikaz sheme mikrotitarske pločice za određivanje broja stanica kvasca <i>Sacharomyces cerevisiae</i> DT te XTT testa .....	39
<b>Slika 17.</b> LUNA-FLTM Dual fluorescence cell counter .....	40
<b>Slika 18.</b> Shematski prikaz B-Turkove komorice za brojanje stanica .....	41
<b>Slika 19.</b> Prikaz sheme mikrotitarske pločice za određivanje krivulje rasta kvasca.....	42
<b>Slika 20.</b> Fluorescentni mikroskop Olympus BX51 .....	44
<b>Slika 21.</b> Kemijski prikaz prijelaza tetrazolijske soli u formazan (gornja slika) i shematski prikaz razvijanja boje i proporcionalnosti jačine boje s brojem živih stanica (donja slika) ...	45
<b>Slika 22.</b> Krivulje rasta kvasaca na YPD podlogama nakon tretmana ionima ortodontskih bravica i ortodontskih prstenova (lijeva slika prikazuje soj <i>S. c.</i> W303, a desna <i>S. c.</i> DT). ....	47

<b>Slika 23.</b> Krivulje rasta kvasaca u umjetnoj slini nakon tretmana ionima ortodontskih bravica i ortodontskih prstenova (lijeva slika prikazuje soj S. c. W303, a desna S. c. DT). .....	48
<b>Slika 24.</b> Grafički prikaz promjene koncentracije stanica kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303 i DT tijekom izloženosti ionima ortodontskih bravica na YPD podlozi. Bravice su u podlogama bile uronjene 3, 7 i 14 dana te nakon toga korištene u pokusu.....	49
<b>Slika 25.</b> Grafički prikaz promjene koncentracije stanica kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303 i DT tijekom izloženosti ionima ortodontskih prstenova na YPD podlozi. Prstenovi su u podlogama bili uronjeni 3, 7 i 14 dana, te nakon toga korišteni u pokusu.....	50
<b>Slika 26.</b> Grafički prikaz udjela mrtvih stanica kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303 i DT nakon izloženosti ionima ortodontskih bravica i prstenova na YPD podlozi odstajalih 3, 7 i 14 dana .....	51
<b>Slika 27.</b> Grafički prikaz promjene prosječne veličine stanica obaju sojeva kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na YPD podlozi nakon tretiranja ionima ortodontskih bravica i prstenova kroz 3, 7 i 14 dana.....	52
<b>Slika 28.</b> Grafički prikaz promjene koncentracije stanica kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303 i DT nakon izloženosti ionima ortodontskih bravica i prstenova odstajalih u umjetnoj slini 3 dana .....	53
<b>Slika 29.</b> Grafički prikaz udjela mrtvih stanica kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303 i DT nakon izloženosti ionima ortodontskih bravica i prstenova odstajalih u umjetnoj slini 3 dana .....	54
<b>Slika 30.</b> Mikroskopski prikaz pogrešnog prebrojavanja stanica oba soja kvasca uređajem LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter (a – tretman ionima ortodontskih bravica, b – tretman ionima ortodontskih prstenova) .....	55
<b>Slika 31.</b> Grafički prikaz promjene prosječne veličine stanica obaju sojeva kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> u umjetnoj slini nakon tretiranja ionima ortodontskih bravica i prstenova odstajalih u umjetnoj slini 3, 7 i 14 dana. ....	56
<b>Slika 32.</b> Grafički prikaz prosječnog udjela pojedinih vrsta stanica kvasca <i>S. cerevisiae</i> W303 i DT nakon tretmana ionima ortodontskih bravica.....	57
<b>Slika 33.</b> Preklopljena mikroskopska slika stanica <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DT tretiranim s ionima ortodontskih bravica, a obojanih kombinacijom boja FUN 1 i Calcofluor white M2R (P=400x).....	58
<b>Slika 34.</b> Grafički prikaz prosječnoj udjela pojedinih vrsta stanica kvasca <i>S. cerevisiae</i> W303 i DT nakon tretmana ionima ortodontskih prstenova. ....	59

<b>Slika 35.</b> Mikroskopske slike stanica kvasaca <i>S. cerevisiae</i> DT tretiranih iscrpinom prstenova (7 dana/US) obojene FUN-1 (crvena –b i zelena – c) i Calcoflour White M2R bojom (plava – a i preklopljena slika – d).....	60
<b>Slika 36.</b> Grafički prikazi izmjerenih apsorbancija nakon tretiranja stanica kvasaca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303 i DT na YPD podlozi iscrpinama ortodontskih materijala na početku i na kraju rasta na podlozi.....	61
<b>Slika 37.</b> Grafički prikazi izmjerenih apsorbancija nakon tretiranja stanica kvasaca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303 i DT u umjetnoj slini iscrpinama ortodontskih materijala na početku i na kraju rasta na podlozi.....	62
<b>Slika 38.</b> Grafički prikaz usporedbe unutarstanične oksidacije stanica kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303 nakon tretmana ionima ortodontskih bravica i prstenova .....	63
<b>Slika 39.</b> Grafički prikaz usporedbe unutarstanične oksidacije stanica kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303 nakon tretmana ionima ortodontskih bravica i prstenova .....	64
<b>Slika 40.</b> Grafički prikaz usporedbe unutarstanične oksidacije stanica kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DT nakon tretmana ionima ortodontskih bravica i prstenova. ....	64
<b>Slika 41.</b> Grafički prikaz usporedbe unutarstanične oksidacije stanica kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DT nakon tretmana ionima ortodontskih bravica i prstenova. ....	65

## 8.2. Popis tablica

<b>Tablica 1.</b> Prikaz najčešćih reaktivnih vrsta kisika. Lijevo stupac prikazuje strukturne formule, srednji stupac naziv i kemijsku formulu, a treći stupac njihovo metaboličko podrijetlo.....	14
<b>Tablica 2.</b> Prikaz sastojaka i njihovih količina potrebnih za pripremu 1 L YPD hranjive podloge .....	35
<b>Tablica 3.</b> Prikaz sastojaka i njihovih količina potrebnih za pripremu 1 L umjetne sline .....	37
<b>Tablica 4.</b> Prikaz sastojaka i njihovih količina potrebnih za pripremu 1 mL GH pufera.....	43
<b>Tablica 5.</b> Usporedba formiranja nakupina stanica kvasaca divljeg soja i soja W303 nakon tretmana ionima ortodontskih bravica na YPD podlozi .....	51
<b>Tablica 6.</b> Usporedba formiranja broja stanica kvasaca divljeg soja i soja W303 nakon tretmana ionima ortodontskih prstenova na YPD podlozi .....	51



<b>Tablica 7.</b> Usporedba formiranja broja stanica kvasaca divljeg soja i soja W303 nakon tretmana ionima ortodontskih bravica u umjetnoj slini.....	55
<b>Tablica 8.</b> Usporedba formiranja broja stanica kvasaca divljeg soja i soja W303 nakon tretmana ionima ortodontskih prstenova u umjetnoj slini .....	55
<b>Tablica 9.</b> Broj različitih stanica kvasaca obaju sojeva kvasaca nakon tretmana ionima ortodontskih bravica .....	57
<b>Tablica 10.</b> Broj različitih stanica kvasaca obaju sojeva kvasaca nakon tretmana ionima ortodontskih prstenova .....	58

## 9. Životopis

### OSOBNNE INFORMACIJE:

- **Ime i prezime:** Domagoj Sabadi
- **Spol:** M
- **Datum rođenja:** 05.05.1997. (Osijek)
- **Adresa:** Ulica grada Vukovara 101, 31431 Čepin
- **Državljanstvo:** Hrvat
- **E-mail:** domagoj.sabadi3@gmail.com

### OBRAZOVANJE:

- **2004. – 2012.** Osnovna škola Miroslava Krleže, Ulica kralja Zvonimira 100, 31431 Čepin
- **2012. - 2016.** I. Gimnazija Osijek, Županijska 4, 31000 Osijek
- **2016. - 2019.** Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva, Ul. Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka
- **2019. - 2021.** Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva, Ul. Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka

### RADNO ISKUSTVO:

- **srpanj 2017. - rujan 2017.** Uzorkovanje i analiza pšenice, Tvornica ulja Čepin d.d., Ulica grada Vukovara 18, 31431 Čepin
- **srpanj 2018. - rujan 2018.** Rad u suvenirnici, Arheološki muzej, Trg svetog Trojstva 2, 31000 Osijek
- **ožujak 2021. - srpanj 2021.** Arhivar, KBC-Osijek, Ulica Josipa Huttlera 4, 31000 Osijek

### VJEŠTINE:

- **Materinski jezik:** hrvatski
- **Strani jezici:** engleski, njemački
- **Ostalo:** Rad u programu MS Office