

# UČINAK IONA METALA OTPUŠTENIH IZ ORTODONTSKIH LUKOVA NA METABOLIČKU AKTIVNOST KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

---

Šaravanja, Izabela

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:184:151860>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Izabela Šaravanja

UČINAK IONA METALA OTPUŠTENIH IZ ORTODONTSKIH LUKOVA NA  
METABOLIČKU AKTIVNOST KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Izabela Šaravanja

UČINAK IONA METALA OTPUŠTENIH IZ ORTODONTSKIH LUKOVA NA  
METABOLIČKU AKTIVNOST KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

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

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

1. izv.prof.dr.sc. Lara Batičić Pučar, dipl.san.ing
2. dr. sc. Božena Ćurko-Cofek, dr. med
3. izv.prof.dr.sc. Gordana Čanadi Jurešić, dipl. ing

Rad sadrži 70 stranica, 36 slika, 1 tablicu, 55 literaturnih navoda.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentorici izv.prof.dr.sc. Gordani Čanadi Jurešić, dipl. ing., ponajprije kao profesorici koja nam je strpljivo prenosila zahtjevno gradivo te na svom trudu i znanju (teorijskom i iskustvenom) koje mi je prenijela za vrijeme izrade završnog i diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se i profesorici dr. sc. Boženi Čurko-Cofek, dr. med., na pomoći u radu tijekom istraživanja i korisnim savjetima za daljnji rad.*

*Veliku zahvalu dugujem roditeljima, Marijani i Davoru, koji su uvijek bili uz mene i podržavali me kroz svaki korak u mom životu i obrazovanju te mi vjerno prenijeli vrijednosti života i odlike dostojnog čovjeka.*

*I na kraju želim se zahvaliti kolegama i prijateljima s kojima je svaka studentska muka lakše prošla.*

*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“*

## Sažetak

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* godinama se koristi kao modelni organizam u cijelom nizu istraživanja. Tako se koristi i za proučavanje molekularnih mehanizama oksidativnog stresa te za proučavanje učinaka metalnih iona na metaboličku aktivnost stanica. Danas postoje raznolike tehnologije i materijali koji se koriste u dentalnoj medicini. Glavne karakteristike „dobrih“ dentalnih materijala su biokompatibilnost i fizikalne kvalitete (mehanička i termička otpornost). Dentalne legure u sebi najčešće sadrže nikal, titanij, krom, molibden, kobalt i sl. Poznato je da je nikal najalergeniji metal, da je krom često povezan s oksidativnim stresom, no i ostali metali koji se nalaze u dentalnim legurama mogu biti potencijalno toksični. Legure "rematitan" i "remanium" često se koriste u izradi dentalnih lukova zbog svoje superelastičnosti, biokompatibilnosti i lakog rukovanja prilikom postavljanja ortodontskog aparata. U ovom istraživanju proučavano je kako će stanice kvasca reagirati na ione metala koji se otpuštaju iz dentalnih lukova „rematitan“ i „remanium“ te kakva će biti njihova metabolička aktivnost ako su izloženi ovim ionima. Za određivanje metaboličke aktivnosti korišteni su: test stanične proliferacije (XTT test), „Live/Dead Yeast Viability kit“ te AO/PI boja koja se koristi za brojanje stanica na LUNA-FL™ uređaju. Krivulja rasta stanica kvasca, tretiranih i netretiranih, većeg je porasta i pravilnijeg oblika kod stanica uzgajanih na YPD hranjivoj podlozi nego kod stanica uzgajanih u umjetnoj slini. U tom slučaju stanice su imale minimalan, čak i zanemariv porast. Kod stanične proliferacije primijećeno je da promjena medija ima utjecaj na odgovor stanica obaju sojeva kvasca. Divlji soj kvasca razvije određenu toleranciju i povećava se broj stanica bez obzira što u umjetnoj slini nema hranjivih tvari poput šećera. Metabolički aktivnih stanica, određenih FUN-1 bojom, podjednako je kod oba tretmana („rematitan“ i „remanium“), dok je nešto manji udio metabolički poremećenih stanica kod tretmana „rematitan“-om. Stanice tretirane metalnim ionima mijenjaju oblik i veličinu te rastu u nakupinama („klasteri“). Metalni ioni koji su se otpuštali iz ortodontskih lukova 7 dana pokazali su najveću toksičnost.

**Ključne riječi:** ortodontski lukovi, ioni metala, *Saccharomyces cerevisiae*, metabolička aktivnost, oksidativni stres.

## Summary

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been used for years as a model organism in a number of studies. Thus, it is also used to study the molecular mechanisms of oxidative stress and to study the effects of metal ions on the metabolic activity of cells. Today, there are a variety of technologies and materials used in dentistry. The main characteristics to be considered in material selection are biocompatibility and quality. Dental alloys usually contain nickel, titanium, chromium, molybdenum, cobalt, etc. It is already known that nickel is the most allergenic metal, chromium is often associated with oxidative stress, but other metals found in dental alloys can as well be potentially toxic. Alloys "rematitan" and "remanium" are often used in the manufacture of dental arches due to their super-elasticity, biocompatibility and easy handling when installing an orthodontic appliance. In this study, it was studied how yeast cells will react to metal ions released from the dental arches "rematitan" and "remanium" and what will be their metabolic activity if they are exposed to these ions. To determine metabolic activity, the following were used: cell proliferation test (XTT test), „Live/Dead Yeast Viability kit“ and AOPI dye used to count cells on the LUNA-FL™ device. The growth curve of yeast cells, treated and untreated, is larger and more regular in cells grown on YPD nutrient medium than in cells grown in artificial saliva. In this case, the cells had a minimal, even negligible increase. In cell proliferation, a change in medium has been observed to affect the cell response of both strains of yeast. The wild strain of yeast develops a certain tolerance and increases the number of cells despite the fact that there are no nutrients such as sugar in artificial saliva. Metabolically active cells, determined by FUN-1 color, are the same in both treatments ("rematitan" and "remanium"), while a slightly lower proportion of metabolically disturbed cells in the treatment with "rematitan". Cells treated with metal ions change shape and size and grow in clusters ("clusters"). Metal ions released from orthodontic arches for 7 days showed the greatest toxicity.

**Key words:** orthodontic arches, metal ions, *Saccharomyces cerevisiae*, metabolic activity, oxidative stress.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Ortodontcija .....	1
1.1.1. Ortodontske naprave .....	3
1.1.2. Ortodontski lukovi „rematitan“ i „remanium“ .....	3
1.2. Nikal .....	5
1.2.1. Legure nikla.....	6
1.2.2. Metabolizam nikla u organizmu.....	8
1.2.3. Učinak nikla u organizmu .....	9
1.3. Titanij.....	12
1.3.1. Legure titanija .....	13
1.3.2. Metabolizam titanija u organizmu.....	16
1.3.3. Učinak titanija u organizmu .....	17
1.4. Krom.....	19
1.4.1. Izvori kroma u okolišu .....	20
1.4.2. Metabolizam kroma u organizmu.....	21
1.4.3. Učinak kroma u organizmu .....	22
1.5. Kvasac i primjena kvasca u eksperimentalnim istraživanjima .....	26
1.5.1. Saccharomyces cerevisiae .....	27
1.5.2. Oksidativni stres .....	28
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	30
3. MATERIJALI I METODE .....	31
3.1. Materijali .....	31
3.1.1. Radni mikroorganizam .....	31
3.1.2. Uređaji, laboratorijski pribor, kemikalije.....	31
3.2. Metode .....	32



3.2.1.	Priprema hranjive podloge .....	32
3.2.2.	Priprema umjetne sline .....	32
3.2.3.	Uzgoj kvasaca .....	33
3.2.4.	Određivanje broja stanica kvasca.....	33
3.2.4.1.	Određivanje optičke gustoće stanica kvasca .....	33
3.2.4.2.	Brojanje stanica na LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter.....	33
3.2.4.3.	Brojanje stanica na svjetlosnom mikroskopu .....	34
3.2.5.	Određivanje krivulje rasta.....	35
3.2.6.	Određivanje metaboličke aktivnosti kvasca.....	35
3.2.6.1.	Određivanje stanične proliferacije (XTT test).....	35
3.2.6.2.	Određivanje vitalnosti stanica kvasca.....	37
3.2.6.3.	Određivanje vijabilnosti kvasaca.....	38
3.2.7.	Određivanje unutarstanične oksidacije .....	39
4.	REZULTATI.....	40
4.1.	Krivulje rasta stanica .....	40
4.2.	Određivanje metaboličke aktivnosti stanica .....	42
4.2.1.	Određivanje stanične proliferacije.....	42
4.2.2.	Određivanje vitalnosti kvasca .....	45
4.2.3.	Određivanje vijabilnosti kvasca .....	48
4.3.	Određivanje unutarstanične oksidacije .....	53
5.	RASPRAVA.....	54
5.1.	Krivulja rasta .....	54
5.2.	Određivanje metaboličke aktivnosti .....	55
5.2.1.	Stanična proliferacija.....	55
5.2.2.	Vitalnost kvasca .....	56
5.2.3.	Vijabilnost kvasca .....	57
5.3.	Određivanje unutarstanične oksidacije .....	59

6.	ZAKLJUČAK .....	60
7.	LITERATURA.....	61
8.	POPIS SLIKA .....	67
9.	ŽIVOTOPIS .....	70

## 1. UVOD

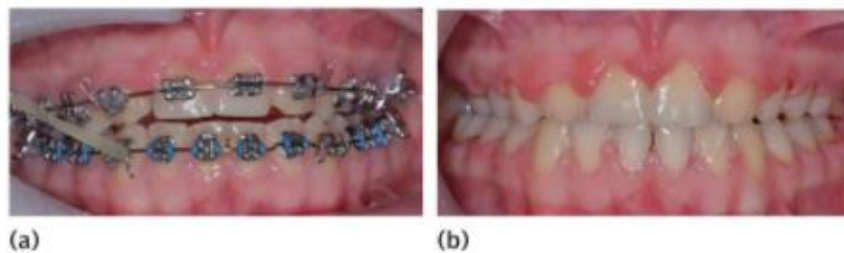
### 1.1. Ortodoncija

Ortodoncija (grč. *orthos* – pravilan, *odus* - zub) je specijalistička disciplina dentalne medicine i bavi se proučavanjem i praćenjem rasta i razvoja dentofacijalnih struktura i čimbenika koji utječu na njihov rast, razvoj i položaj na čeljusti. Glavni joj je cilj ortodontskom terapijom ispraviti položaj zubi. Ortodoncija se još naziva i dentofacijalna ortopedija pošto ortodont terapijom koju određuje utječe na položaj i odnos kostiju donje trećine lica. Ortodoncija se bavi dijagnostikom mogućih deformacija kao što su malokluzije, procjenom terapije i prioriteta te mogućim sprječavanjem nastanka ili zaustavljanjem progresije malokluzije. Također se unutar ortodoncije dizajniraju naprave za korekciju te se proučava njihov biološki i biomehanički učinak. Ovakvom je terapijom moguće postići individualni optimalni sklad orofacijalne funkcije, okluzije, estetike osmjeha i lica te psihosocijalne kvalitete života. Malokluzija ne znači bolest, već nastaje zbog niza prirodnih dentofacijalnih varijacija koje mogu utjecati na oralno zdravlje pacijenta i njihovu kvalitetu života. Svaka malokluzija ne zahtjeva ortodontsku terapiju nego ortodont procjenjuje stupanj malokluzije, narušenje funkcije i estetike te prema tome izrađuje individualni plan terapije kako bi se postigao optimalan položaj zubi. Normalno stanje okluzije i odnos čeljusti naziva se normokluzija ili eugnatija, a odstupanje od normalnog malokluzija ili disgnatija. Nepravilnosti okluzija oduvijek postoje, no očigledno je da su u porastu zbog promjene načina prehrane te dolazi do smanjenja čeljusti i broja zubi u čovjeka. Zub je razvijeno tkivo i teže se mijenja od čeljusti te se samim time sporije smanjuje broj zubi nego veličina čeljusti pa to dovodi do dentoalveolarnog nesrazmjera i zbijenosti zubi. Malokluzije je potrebno ispravljati zbog narušenih funkcija poput mastikacije, gutanja, govora, disanja, prevencije karijesa, trauma, parodontnih bolesti te temporomandibularnih poremećaja. (1)

Kako bi se utvrdilo hoće li ortodontska terapija imati korist za zdravlje zubi, prvo se treba procijeniti hoće li malokluzija uzrokovati probleme u zdravlju zubi, a zatim, hoće li ta terapija uopće riješiti problem malokluzije. Postoje specifične okluzijske anomalije kod kojih je dokazano da ovakva terapija ima učinak i rješava problem, dok kod drugih dentalnih stanja, poput karijesa ili parodontalnih bolesti, nema dovoljno dokaza o učinkovitosti terapije. Ovakva stanja su multifaktorijalnog podrijetla i teško je zabilježiti uzročno – posljedičnu vezu s malokluzijama.

Kao i svako drugo liječenje u medicini i stomatologiji, ortodontska terapija ima svoje potencijalne rizike koje je potrebno objasniti pacijentima prije početka terapije. Kod pomicanja

zubi neizbježna je resorpcija korijena. U prosijeku, kod dvogodišnje terapije fiksnom primjenom izgubi se oko 1 mm korijena što nije klinički značajno. Problem je što je širok raspon kod pacijenata kolika će biti resorpcija korijena i neki su pacijenti osjetljiviji i podvrgnuti su izrazitoj resorpciji korijena. Povećanje upale gingive vidljivo je nakon postavljanja fiksnih aparata zbog smanjenog pristupa čišćenju. Ako je oralna higijena kontinuirano loša, može se razviti hiperplazija gingive. Uobičajeno se ovakvi problemi smanjuju ili rješavaju nakon uklanjanja aparata, ali je moguća apikalna migracija parodontalne vezanosti i alveolarne koštane potpore. (2)



**Slika 1.** Hiperplazija gingive u gornjem labijalnom segmentu tijekom tretmana fiksnim aparatom. a) u vrijeme uklanjanja aparata; b) nakon uklanjanja aparata (očekuje se potpuno rješavanje hiperplazije gingive nakon što je aparat uklonjen). (2)

Demineralizirane bijele lezije rani su stupanj razvoja karijesa koji se javlja nakon nakupljanja kariogenog plaka u kombinaciji s prehranom s visokim udjelom šećera. Prisutnost fiksnih aparata predispozicija je za nakupljanje plaka pošto je čišćenje zuba oko dijelova aparata otežano. Trauma ili istrošeni ortodontski aparati mogu uzrokovati i oštećenje cakline zuba. Zubna caklina može se oštetiti za vrijeme postavljanja ili uklanjanja fiksnih aparata ili za vrijeme terapije (određeni dijelovi aparata mogu uzrokovati trošenje zubne cakline). Intraoralno oštećenje mekog tkiva moguće je kao posljedica izravne traume ili kod fiksnih i mobilnih aparata. Moguće su i alergijske reakcije na komponente sadržane u aparatu poput nikla, lateksa ili akrilata. Kontaktni dermatitis prijavljen je kod 1% pacijenata i alergijske se reakcije mogu vidjeti na koži lica. Glavni uzročnik alergijskog dermatitisa koji se javlja kod pacijenata podvrgnutih ortodontskoj terapiji je nikal. Ovakva reakcija mogla bi se spriječiti prekrivanjem metalnih dijelova fiksnog aparata trakom kako ne bi došlo do kontakta nikla i tkiva ili traženjem alternativne metode liječenja. (2)

Postoji opravdana zabrinutost kod upotrebe lukova koji sadrže nikal u sebi zbog toga što je nikal najalergeniji metal. Osim nikla, često u lukovima budu sadržani i drugi potencijalno otrovni metali poput kroma ili kobalta. Provedena su istraživanja senzibilizacije kod pacijenata s ovakvim lukovima, ali nisu primijećene alergijske reakcije.

Do otpuštanja metala iz lukova uglavnom dolazi zbog galvanske razlike između slinice i metala, te se potakne elektrokemijska reakcija i moguća korozija metala. Kako bi se ovakva pojava spriječila ili smanjila, na tržištu su i lukovi premazani titanom i epoksidima. Na taj način dodatno je smanjena pojava korozije metala, ali u istraživanjima nije bilo uključeno što se događa kod gubitka premaza, odnosno postoji li toksičan učinak na stanice. (3)

#### 1.1.1. Ortodontske naprave

Prema dizajnu, ortodontske naprave mogu se dijeliti na: mobilne i fiksne, pasivne i aktivne, intraoralne i ekstraoralne, mono i bimaksilarne te na zubno, koštano i tkivno nošene. Edgewise naprava sastoji se od bravica i prstenova koji su fiksirani na zube te povezani sa žičanim lukom. Ovo je fiksna monomaksilarna aktivna intraoralna naprava. Suprotno od edgewise naprave, Herbstov šarnir je fiksna, pasivna, bimaksilarna intraoralna naprava. Mobilne naprave izrađene su od akrilatnog tijela u koje se ugrađuje retencijski element kao što su žičane kvačice i labijalni luk, te imaju aktivni element u obliku žičanih opruga i vijaka. Fiksni aparati većinski su izrađeni od metala, ali mogu sadržavati i akrilatne, gumene ili silikonske elemente. (1)

Mobilne i fiksne naprave dizajnirale su se i upotrebljavale istovremeno. Mobilni aparati pretežito su se koristili u Europi, dok su u Americi ortodonti upotrebljavali fiksne aparate. Europski ortodonti dizajnirali su mobilne naprave, proširivali im primjenu i modificirali, no danas se najčešće koriste Schwarzove ploče, reducirani aktivatori po Metzelderu i Grudeu, obrazni luk, obrazna maska, bionator po Baltersu, twin block po Clarku, regulator funkcije po Fränkelu, lip bumper, špatula i vestibularna ploča. Začetnik fiksnih ortodontskih naprava je Edward Angle koji je konstruirao edgewise napravu te ju je razvijao gotovo četrdeset godina.

Ortodontske naprave rabe se shodno indikacijama i poznavajući terapijske mogućnosti i ograničenja naprava. Tijekom terapije često je i korištenje više različitih naprava različitog dizajna. (2)

#### 1.1.2. Ortodontski lukovi „rematitan“ i „remanium“

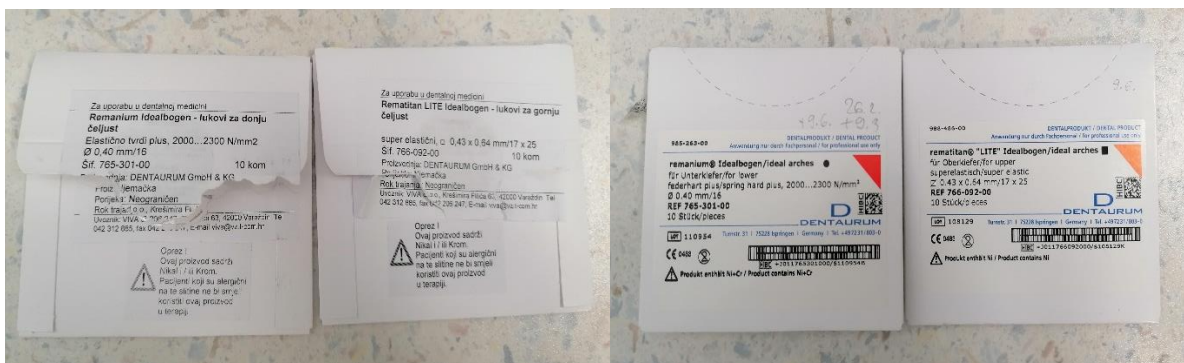
Danas postoje raznolike tehnologije i materijali koji se koriste u dentalnoj medicini te se nameće njihov objektivni odabir ovisno o individualnosti kliničkog slučaja, posebnosti situacije te estetskih zahtjeva. Zbog mnoštva materijala koji postoje na tržištu, glavne karakteristike koje se gledaju su biokompatibilnost i kvaliteta svakog od tih materijala. Potrebno je ispravno ispuniti svaki od koraka tehnološkog algoritma kako bi se dobila precizna protetska naprava. Kod oralne rehabilitacije koriste se dvije klase materijala: metalni i

nemetalni materijali. Legure korištene u fiksnim protetskim napravama posljednjih su godina raznolike, no dominantne su komponente: zlato, paladij, srebro, nikal, titanij i kobalt. Dugotrajnost fiksne naprave ovisi o razumnom odabiru materijala koji svojim svojstvima ne bi trebao stvarati dodatne komplikacije u usnoj šupljini. Četiri glavna fizička svojstva dentalne legure su interval taljenja, gustoća, mehanička otpornost i čvrstoća. (4)

„Remanium“ i „rematitan“ žičani su lukovi koji se često koriste u fiksnim edgewise ortodontskim napravama. „Remanium“ lukovi izrađeni su od čelika koji sadrži 18 – 20% kroma i 8 – 10,5% nikla, dok je „rematitan“ legura nikla i titanija (deklarirano 50 – 60% nikal).

„Rematitan“ je legura titana koja se uz odgovarajuće odobrenje može koristiti u izradi krunica i mostova, lukova za ortodontske aparate, suprakonstrukcija implantata, itd. Komponente koje su izrađene od ovakve legure titana postupkom metalnog laserskog topljenja pokazuju homogenu strukturu bez pora. „Rematitan“ lukovi izrađeni su od superelastične legure koja omogućuje ravnomjeran i nježan prijenos sile te su idealni u fazi izravnavanja zubi zbog elastičnog oporavka. Ovakvi lukovi mogu biti i laserski zavareni.

„Remanium“ legure koriste se već desetljećima u protetičkim aparatima. Ovakvim lukovima vrlo je lako za raditi, posebno kod poliranja i zavarivanja zbog reducirane tvrdoće. Lukovi se odlično ponašaju prilikom topljenja, imaju značajnu jačinu te gustoću.



Slika 2. Ortodontski lukovi "remanium" i "rematitan" korišteni u ovom radu.

## 1.2. Nikal

Nikal (Ni) je feromagnetski metal, srebrnkasto – bijele boje i tvrđi od željeza, a široko je poznat po korištenju u kovanju novca. (5) Nikal je sveprisutni metal koji se može pronaći u vodi tlu, zraku i biosferi. (6) Za mnoge životinjske i biljne vrste nikal je esencijalni element u tragovima. Njegov deficit može dovesti do ometanja metabolizma glukoze te smanjiti toleranciju na glukozu. (7) Uz poremećaje vezane za glukozu, opisano je kako je nikal neophodan za katalitičke aktivnosti određenih biljnih ili bakterijskih enzima. Deficit nikla u prehrani kod životinja dovodi do povećanja tjelesne težine, anemije i smanjene održivosti. (6) U prirodi postoji kao prirodni zemljani element u sulfidnim i oksidnim rudama koje se mogu kopati pod zemljom ili u jamama. 24. je najrasprostranjeniji element s najvećim nalazištima ruda u Kanadi, Sibiru i Novoj Kaledoniji (francuski teritorij u Južnom Pacifiku). Nikal se ekstrahira iz sulfidnih ruda filtriranjem, magnetskim odvajanjem, prženjem i topljenjem. (8) Sulfidne rude nikla i bakra vrlo su slične sastavom te je i postupak dobivanja čistog bakra ili nikla sličan. (9) Sirovi niklov kamen sadrži otprilike 15% niklovih i bakrovih sulfida, metalnog nikla i bakra. Željezo (50%) i sumpor (25%) uklanjaju se oksidacijom željezovog sulfida, pri čemu zaostaje 50% nikla u niklovom kamenu. Nadalje, vrši se oksidacija pri visokim temperaturama (780 °C) i tretman s vrućom 12%-tnom sumpornom kiselinom. Dobiva se materijal koji će se reducirati s plinovitim vodikom i kao takav reagira s ugljikovim monoksidom te se naposljetku dobije niklov karbonil. Konačno, čisti nikal dobije se zagrijavanjem niklovog karbonila sve dok se ne razgradi do čistog nikla i ugljikovog monoksida. Ovakav postupak dobivanja čistog nikla iz niklovog kamena može se ponoviti i do sedam puta kako bi se izdvojile maksimalne količine korisnih metala. (8) Danas se koristi u puno različitih oblika, a najčešće u legurama. (5) Osim u legurama, spojevi nikla od interesa, odnosno najčešće spominjani su niklov (II) oksid, niklov hidroksid, niklov sulfid, niklov sulfat, niklov klorid i niklov karbonil. Nikal je otporan na oksidaciju te na koroziju uzrokovanu zrakom, vodom i lužinama. Soli nikla s jakim kiselinama i organskim kiselinama su topive u vodu, dok soli sa slabim anorganskim kiselinama nisu topive u vodi. (8) Također, nikal ima visoku električnu i toplinsku vodljivost. (5) Ovakva poželjna svojstva nikla utjecala su na njegovu sve veću primjenu u izradi nakita. Dodatnim istraživanjima došlo se do zaključka kako nikal i nije toliko siguran za široku primjenu i u svim oblicima. Prema epidemiološkim i eksperimentalnim istraživanjima dokazano je da je nikal kancerogen, mutagen i genotoksičan. (8)

Prema snazi i žilavosti, nikal nalikuje željezu (Fe), dok prema otpornosti na oksidaciju i koroziju sliči bakru (Cu). Zahvaljujući ovoj kombinaciji svojstava kombinira se u različitim legurama. Više od polovice nikla koristi se u legurama sa željezom, posebice kod izrade nehrđajućeg čelika, a ostatak se većinski koristi u izradi legura otpornih na koroziju u kombinaciji s bakrom te legurama otpornim na toplinu s kromom. Moguće su i kombinacije za izradu elektrootpornih, magnetskih i mnogih drugih legura. Nikal kao zaseban metal, bez da je uklopljen u leguru, koristi se za stvaranje zaštitnih slojeva ili prevlaka na drugim metalima uglavnom galvanizacijom. Također se može koristiti i kao katalizator u postupku hidrogeniranja nezasićenih organskih spojeva. (5) Nikal se može upotrebljavati u proizvodnji goriva, izmjenjivača topline, ventila, nakita, kuhinjskog pribora, a soli nikla mogu se koristiti i u proizvodnji boja, keramike, baterija, itd. (6)

Nikal može ući u organizam ingestijom (pri čemu izaziva mučninu, povraćanje, proljev i glavobolju), inhalacijom ili kontaktom preko kože. Nikal je najalergeniji među metalima, te je jedan od najčešćih uzročnika kontaktnog alergijskog dermatitisa. Zbog implantata i proteza koje su sačinjene od legura nikla, dolazi do jatrogene izloženosti. Profesionalne izloženosti, odnosno oboljenja, najčešći su tip izloženosti niklu. Profesionalna oboljenja zabilježena su kod radnika koji rade na zavarivanju, oblaganju, rafiniranju nikla, brušenju te u čeličanama. Glavni put apsorpcije kod ovakvih oboljenja je najčešće inhalacijom, odnosno respiratorna apsorpcija, praha ili dima koji sadrži nikal te se nikal u tijelu transportira krvlju vezan za albumin. (6)

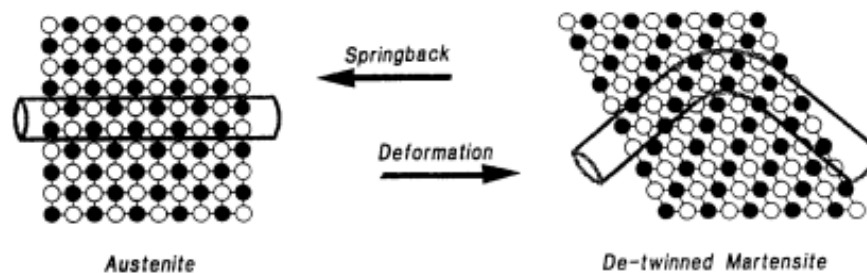
### 1.2.1. Legure nikla

Već je ranije spomenuto da se nikal ponajviše koristi kao legirajući metal za dobivanje legura koje će se odlikovati antikorozivnim, električnim, termoelektričnim, vatrootpornim magnetskim svojstvima. Feronikal je legura željeza i nikla (24 – 48%) koja se koristi za proizvodnju nehrđajućeg čelika. Za proizvodnju nehrđajućih ili drugih čelika koristi se polovica svjetske proizvodnje nikla. Tu se nikal dodaje upravo u obliku feronikla te je onda sadržaj nikla 3,5 – 22%. Nikal doprinosi stabilizaciji austenitne strukture, poboljšava kovnost samog čelika i pruža otpornost na koroziju. U nehrđajući čelik često se dodaje i krom, ali postoji i sama legura nikla i kroma koja se naziva Nikrom legura i sadrži 80% nikla i 20% kroma. Ovakve legure s malim dodacima silicija često se koriste u izradi raznih otpornih žica i pribora za domaćinstvo te se naziva bijelim metalom. Neke od najvažnijih legura nikla u kojima je on dominantno sadržan ili u visokim udjelima su: Duranikal (legura nikla i aluminijska), Monel legure (nikal, bakar i željezo), magnetske legure (Permalloy, Hipernik, Perminvar, te najpoznatije Al-Ni-Co legure). Metalno – keramički kompoziti (MCC) koji sadrže 30 – 70% nikla s karbidima titanija,

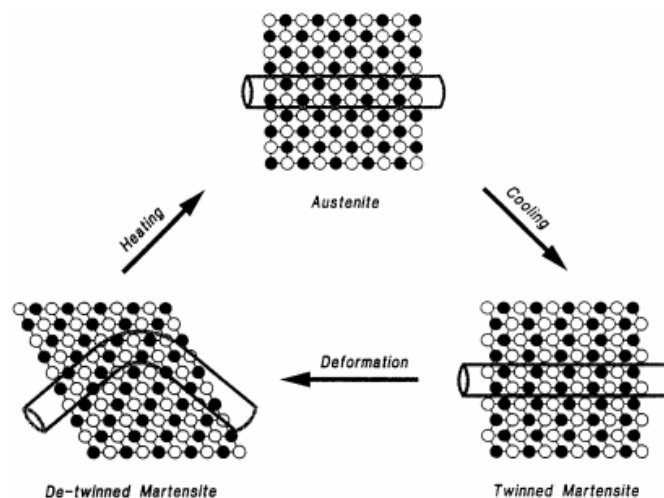


volframa i kroma povećavaju žilavost, čvrstoću i vatrostalnost nikla te se upotrebljavaju za izradu dijelova plinskih turbina i reaktora koji će biti izloženi velikim dinamičkim naprezanjima uz visoku temperaturu.(9)

Nikal – titan legura ili poznatija pod nazivom Nitinol razvijena je još početkom 1960.-ih. To je ekvatomaska legura koja sadrži 56% nikla i 44% titana te posjeduje specifična mehanička i mikrostrukturan svojstva, tj. ima efekt memorije oblika (Slika 4.) i svojstvo superelastičnosti (Slika 3.). Ovakva legura ima dobru biokompaktibilnost, otporna je na koroziju i ima visoku čvrstoću te se stoga može koristiti u izradi krvožilnih i plućnih usadaka, ortodontskih implantata ili osteosintetskih spajalica. Nakon što je Nitinol legura pokazala svoja dobra svojstva, a posebno dobru biokompaktibilnost, sve više se počinje koristiti u izradi lukova u ortodonciji, a upotreba nehrđajućeg čelika znatno se smanjila. Usprkos zadovoljavajućoj upotrebi Nitinola u medicini, biokompaktibilnost ove legure i dalje se dovodi u pitanje zbog povećanog udjela nikla. (10,11)



**Slika 3.** Dijagramski prikaz efekta superelastičnosti nikal - titanij legura.(11)



**Slika 4.** Dijagramski prikaz efekta memorije oblika. (11)

### 1.2.2. Metabolizam nikla u organizmu

Smatra se kako je nikal vrlo bitan za normalan rast i razvoj kod životinja. Niske razine nikla smanjuju rast, posebice kod intrauterinog razvoja, te ometaju metabolizam lipida kod štakora. (8) No, suprotno tome, važnost nikla nije dokazana za ljudsko tijelo, ali se prema prehranbenoj terminologiji za nikal može reći kako je prikladan element s blagotvornim učinkom kao dodatak prehrani. Nikal može biti kofaktor ili strukturna komponenta specifičnih metaloenzima različitih funkcija, uključujući hidrolizu i redoks reakcije i ekspresiju gena. (12) Poznato je da je nikal sadržan u najmanje devet enzima te da deficit nikla može dovesti do histoloških i biokemijskih promjena u stanicama, kao što je npr. smanjena resorpcija željeza koja može dovesti do razvoja anemije. Esencijalnost nikla veže se i uz njegovu sposobnost da aktivira hem oksigenazu i sudjeluje u regulaciji apsorpcije željeza u crijevima. Smanjenjem koncentracije nikla u organizmu smanjuje se i aktivnost dehidrogenaza i transaminaza, što uključuje i  $\alpha$  – amilazu te tako utječe na metabolizam ugljikohidrata. (8) Kod sinteze metionina iz homocisteina, nikal može stupiti u interakciju s vitaminom B12 i folnom kiselinom. (12)

Na apsorpciju nikla može utjecati prisutnost određene hrane i tvari kao što su kava, mlijeko, čaj, sok od naranče ili askorbinska kiselina. Ne postoji dokaz da se apsorbirani nikal izlučuju putem crijeva. (12) Sunderman i sur. (1989) u svom su istraživanju zaključili kako se nikal iz vode 40 puta više apsorbira nego nikal iz hrane. Neki sastojci hrane poput vlakana, fosfata i filata, koji vežu metalne ione, mogu vezati i nikal i time ga učiniti manje dostupnim za apsorpciju u određenim tkivima. (8) U ljudskom organizmu najveće koncentracije nikla akumuliraju se u štitnjači i nadbubrežnoj žlijezdi, dok se za ostala tkiva i organe smatra kako se nikal značajno ne akumulira. Prema istraživanju, većina organa sadrži manje od 50  $\mu\text{g}$  nikla/kg suhe mase. (12)

Nikal se vezan za albumin transportira krvlju po organizmu. (12) Transport nikla u i unutar stanica povezan je uz transportere željeza poput transferina koji osim željeza može vezati nikal, vanadij i druge metale. Divalentni transportni protein željeza može prenositi nikal, mangal, kobalt, cink i bakar. Stoga je poznato kako se nikal može natjecati sa željezom za ulazak u stanice. Dovoljan unos željeza u stanice može ograničiti apsorpciju nikla. Osim kompeticije sa željezom za ulazak u stanicu, nikal može poremetiti i homeostazu željeza snižavajući razinu staničnog željeza povećavanjem vezanja IRP1 (iron regulatory protein-1) što će povećati translaciju mRNA receptora transferina, ali blokirati translaciju mRNA feritina. (8)

Apsorbirani nikal prvenstveno se izlučuje urinom, a zatim znojenjem i putem žuči. (12) Neapsorbirani nikal izlučuje se izmetom, kao i pročišćeni žučni i trahejski nikal. Metalotioneini

(MT, *engl.* metallothioneins) su proteini male molekulske mase, bogati cisteinom s brojnim tiolnim mjestima za vezanje metala te su bitni u procesima detoksikacije metala. Istraživanjem se pokazalo da prekomjerna ekspresija MT-ova kod miševa nije spriječila nastanak niklom izazvanih tumora. (8)

### 1.2.3. Učinak nikla u organizmu

Akutno trovanje niklom najčešće se dogodi zbog inhalacije ili ingestije nikal – karbonila ili topivih spojeva nikla te se javljaju mučnina, povraćanje, glavobolja i vrtoglavice, nefrotoksičan učinak te u konačnici plućna fibroza. Kronični učinci nikla zabilježeni su uglavnom kod profesionalnih oboljenja. Simptomi su s većim posljedicama te uključuju rinitis sinusitis, perforacije nosnog septuma te kroničnu astmu. Nikal, osim navedenog, djeluje i hepatotoksično, može izazvati peroksidaciju lipida i potrošiti rezerve glutaciona najvjerojatnije mehanizmom oksidacijskog stresa.

Hlapljivi nikal tetrakarbonil vrlo je toksičan, brzo se razgrađuje na nikal i ugljikov monoksid čime dolazi do sistemskog trovanja i smrti. U samom početku respiratornog trovanja s nikal karbonilom simptomi su blagi i prolazni no nakon 2 – 3 dana izlaganja javljaju se progresivni simptomi poput kašlja, dispneje, upale pluća i akutnog respiratornog distresa, delirija i konvulzije.

Nikal se svrstava u jedno od najčešćih uzročnika kontaktne alergijske reakcije. Ovakve alergije vrlo su učestale te se javljaju kod 30% populacije. Najčešći dermalni kontakt je preko nakita te se mogu javiti urtikrije, ekcemi, eritemi i pruritus. Razvoj alergijske reakcije na nikal povezuje se sa CD8 + T stanicama koje će uzrokovati apoptozu keratinocita u sprezi sa CD4 + T stanicama. CD4 stanice doprinose upalnoj reakciji, oslobađa se IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i IL-17. Na taj se način regulira imunološki odgovor na nikal koji je neovisan o citokinima, a ovisan o kontaktu sa stanicama. Mnoga istraživanja pokazuju kako je nikal proupalan što zapravo potvrđuje činjenicu da je jedan od vodećih uzročnika dermalne alergijske reakcije. Upotreba ulja čajevca, za kojeg je poznato da ima svojstva antibakterijskog i protuupalnog sredstva, sprječava preosjetljivost na nikal. Što se pak tiče oralne senzibilizacije, istraživanjem je utvrđeno kako je nakon tri mjeseca korištenja ortodontskih aparata 20% žena i 10% muškaraca razvilo alergijski gingivitis. Gingivitis se povuče u roku mjesec dana nakon što se ukloni aparat te korištenjem paste za zube i vode za ispiranje usta bez fluorida.

Mnoga ranije ispitivanja kancerogenosti nikla na životinjama uključivala su netopive spojeve nikla koje su unosili injekcijama intramuskularno. Utvrđeno je kako dolazi do razvoja

tumora na mjestu injekcije. Preslikavanjem takve izloženosti na ljude, posebno na korištenje zamjenskih zglobova ili kardiovaskularnih stentova izrađenih od niklovih legura, ovakve vrste izlaganja niklu mogle bi imati sličan značaj kao unos nikla intramuskularno. Ioni nikla i kobalta oslobađaju se iz metalnih legura koje se koriste za izradu kardiovaskularnih stentova što može dovesti do određenih posljedica.

Teratogenost nikla ispitivana je i dokazana samo kod životinja. Dokazano je kako nikal unesen prehranom kod štakora i miševa može oštetiti spermiju tako što se smanji pokretljivost i njena fiziološka funkcija. Nikal može prijeći posteljicu i kod životinja i kod ljudi, a njegova koncentracija u fetusu slična je kao kod odrasle osobe. Također su pronađeni dokazi o niklovoj teratogenosti kod ljudi u slučaju ruskih radnika u ilegalnoj industriji gdje je spontani pobačaj povećan na 16%, a strukturne malformacije živorođene djece povećane na 17%.

Spojevi nikla poput nikal sulfida, kristalnog monosulfid nikla te zelenog i crnog nikal oksida imaju mogućnost fagocitiranja u stanice u kojima će osloboditi ione nikla te izazvati citotoksičnost ili čak apoptozu stanice. Mogući ishod su i kromosomske aberacije ili morfološke transformacije u SHE stanicama. Utvrđeno je da, kada dođe do izloženosti raznim spojevima nikla, poremećaji heterokromatina specifični za X kromosome i delecije dovodi do utišavanja gena starenja. Također je utvrđeno kako nikal može inducirati genomsku nestabilnost u ljudskim stanicama raka pluća.

Genotoksičnost nikla može se povezati s njegovom sposobnošću stvaranja redoks aktivnih radikala i reaktivnih molekula poput vodikova peroksida ili ostalih vrsta reaktivnog kisika (ROS). Niklom inducirani ROS oštećuje oksidativne baze. Comet testom, u kojem su korištene ljudske stanice debelog crijeva, utvrđeno je kako niklov klorid uzrokuje oštećenje DNA te da se to oštećenje može ublažiti dodatkom kvercitina koji je antioksidans. Ako se Ni (II) veže na proteine kromatina u somatskim stanicama i spermatozoidima, dolazi do oksidativnog i strukturnog oštećenja DNA i proteina.

Nikal je u mnogim pogledima vrlo štetan, no kada se radi o mutagenosti možemo zaključiti kako je on u najboljem slučaju samo slabi mutagen. Bakterijskim testovima mutagenosti pokazalo se kako su spojevi nikla neaktivni. U eukariotskim testovima nikal se pokazao kao slabi mutagen čak i kad su korištene otrovne doze nikla, izuzev testa u gpt transgenim stanicama kineskog hrčka G12 gdje je dokazano utišavanje gena za metilaciju DNA.

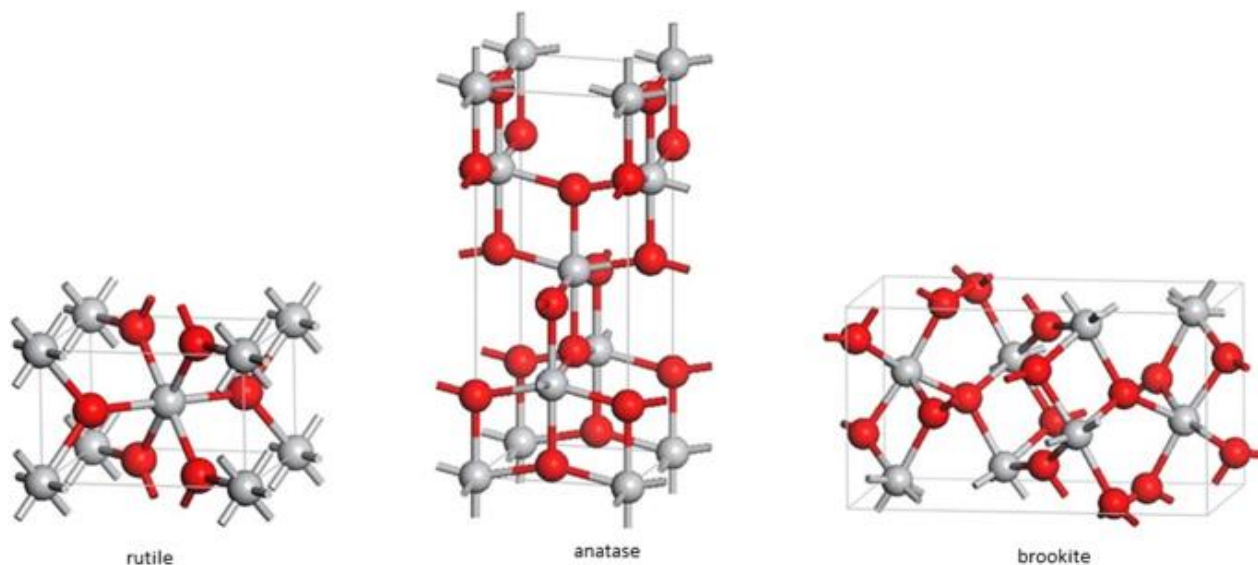
U novijim istraživanjima pokušavaju se oponašati stvarne situacije, odnosno u istraživanjima se koriste niske doze nikla, ali u kroničnoj izloženosti upravo onako kako bi bilo

kod profesionalne izloženosti niklu ili kod dugotrajnog nošenja nakita koji je izrađen od legura nikla. Za razliku od dugotrajnih istraživanja, kratkotrajna mogu pokazati povremenu izloženost niklu putem posuđa, novčića ili sličnih predmeta opće uporabe koji sadrže nikal.

Prijašnja razmišljanja i istraživanja uzimala su u obzir samo netopive niklove spojeve kao toksične, no danas je poznato kako su toksični i određeni spojevi nikla topivi u vodi. Topivi  $\text{NiCl}_2$  je zapravo genotoksičan, slično netopivim oblicima nikla, te ima sposobnost utišati gpt transgen u G12 stanicama kad su mu one izložene dulje od 3 tjedna. U slučaju izlaganja plućnih stanica topivom niklu, dolazi do modifikacije histona u skladu s prigušivanjem gena. Inhibicija procesa popravljjanja DNA ima mehanističku ulogu u genotoksičnosti metalnih spojeva poput nikla. Utvrđeno je kako nikal u netoksičnim koncentracijama ometa prepoznavanje koraka rezanja i polimerizacije popravka ekscizije baze. Tako npr.  $\text{NiCl}_2$  inhibira popravak oštećenja DNA koje je uzrokovano UV-om ili MNNG-om. Kao što je već spomenuto, razni spojevi nikla su aktivni induktori ROS-ova te je time uključenost ROS-ova implicirana u inhibiciji popravljjanja DNA niklom. (8)

### 1.3. Titanij

Titanij je u elementarnom stanju crni ili sivi metalni prah ili masivan metal sličan čeliku te je široko rasprostranjen u svijetu. Iako je deveti najzastupljeniji metal u Zemljinoj kori, pojavljuje se u malim količinama na Zemlji uglavnom u obliku netopivih minerala. (13) Topivi titanij moguće je pronaći u površinskim vodama oceana i u vrućim izvorskim vodama. (14) Zbog relativne gustoće od 4,49 spada u lake metale, no ipak je tvrd poput čelika, postojan na zraku i u morskoj vodi, topljiv u vrućoj kloridnoj i fluoridnoj kiselini iako je inače otporan na kemikalije. Titanij je otporan na koroziju zbog sloja oksida koji se stvaraju na površini. (15) Čisti titanij je izrazito elastoplastičan, odnosno žilav metal, koji se može polirati do visokog sjaja. Ima nisku električnu i toplinsku vodljivost te je paramagnetičan. Postoje dvije kristalne strukture titanija: alfa, koji se šesterokutno zatvoren, te beta, koji je kubik usmjeren na tijelo. Prirodni titanij može se sastojati od pet vrlo stabilnih izotopa: titan-46, titan-47, titan-48, titan-49 i titan-50. (16) Najvažniji spoj titanija, a ujedno i najkorišteniji je titan dioksid ( $\text{TiO}_2$ ) koji je u čistom stanju bijeli prah, netopljiv u vodi, kiselinama i lužinama. (15) Titan dioksida u okolini najviše ima u obliku rutila (kristalni oblik  $\text{TiO}_2$ ) ili u obliku ilmenita ( $\text{FeTiO}_3$ ). (13)  $\text{TiO}_2$  upotrebljava se kao bijeli pigment u bojama te se naziva titanijsko bjelilo. Još se koristi u lakovima, emajlima, keramici, kozmetici te kao dodatak plastičnoj masi. (15)



**Slika 5.** Tetragonalne strukture kristalnih oblika ruda titanija (crveno - kisik ( $\text{O}_2$ ), sivo – titanij). (17)

Titanij je prvi puta zamijećen 1791. godine u Cornwallu kada je William Gregor proučavao crni pijesak zvan menahanit. Njemački znanstvenik Martin Heinrich Klaproth istraživao je crvenu rudu Schörl iz Mađarske i zaključio kako se radi od oksidu prethodno nepoznatog metala. Kada je usporedio rutil iz Mađarske i menahanit iz Cornwalla shvatio je da

se radi o istom metalu i nazvao ga titanij. Tek je 1910. godine napravljen čisti metal titanija tako što su zagrijavali titanijev tetraklorid i metal natrija. (18)

Vrlo je teško dobiti elementarni titanij jer pri visokim temperaturama postaje izuzetno reaktivan i lako reagira s kisikom, ugljikom i dušikom. Najčešća metoda dobivanja titanija je Kroll-ovim procesom gdje se iz rutila ili ilmenita zagrijavanjem s ugljikom pri temperaturi od 900 °C u struji klora dobije titanijev (IV) klorid.  $TiCl_4$  odvaja se od smjese ugljikovog monoksida i dioksida hlađenjem i ukapljivanjem. Nakon toga se pri 800 °C i u struji argona reducira rastaljenim magnezijem u elementarni magnezij. Magnezij i magnezijev (II) klorid odvajaju se od titanija pomoću razrijeđene kiseline ili destilacijom pod vakuumom. Također se redukcija  $TiCl_4$  može izvršiti i rastaljenim natrijem. Ovakav postupak dobivanja titanija bio je vrlo važan kada je titanij dobio ulogu i u komercijalnoj proizvodnji kao strukturalni metal. (16) Male količine vrlo čistog titanija, uglavnom za laboratorijske svrhe, mogu se dobiti i termičkim raspadom para titanijeva (IV) jodida na volframovoj žici.

Vrlo je važan kao legirajući agens za većinu metala i nekih nemetala. Legure koje sadrže titanij mnogo su veće vlačne čvrstoće od samog titanija. Zbog kombinacije svojstava poput otpornosti na koroziju, velike čvrstoće, niske gustoće, duktilnosti vrlo je koristan u aeronautičkoj industriji, kao na primjer za izradu dijelova zrakoplova, svemirskih letjelica, projektila te raznih brodova. U medicini se često koristi za izradu protetskih pomagala jer ne reagira s mesnim tkivom i kostima. Također se koristi i u stomatologiji u izradi zubnih implantata ili aparatića za izravnavanje zubi. Nekada se koristio i kao deoksidator u čeliku te kao dodatak čeliku u svrhu smanjenja veličine zrna, u nehrđajućem čeliku zbog smanjenja sadržaja ugljika, u aluminiju za poboljšanje veličine zrna, a kod bakra zbog stvrdnjivanja. U novije vrijeme, nanočestice titanijevog (IV) oksida koriste se u sastavu krema za sunčanje jer sprječavaju da UV zrake dopru do kože. (16,18) Od svog otkrića, titanij se upotrebljava za razne svrhe, a njegova svojstva i legure dodatno se istražuju i poboljšavaju. Tako se u današnje vrijeme u legure titanija vrlo često dodaje vanadij kako bi poboljšao čvrstoću i termalnu stabilnost legure. Ovakve legure često se koriste za izradu podvozja, krila i motora mlaznih zrakoplova. (19)

### 1.3.1. Legure titanija

Najčešće se titanij u legurama koristi za proizvodnju titanijevih čelika koji su izuzetno otporni prema udarcima i dijele se u tri grupe: alfa legure, alfa-beta legure te beta legure, ovisno o kojoj kristalnoj strukturi titanija se radi. Fazna transformacija titanija odvija se pri 880 °C te to temperaturno područje nije pogodno za primjenu titanija. Ovisno o vrsti legure postoje

stabilizatori koji se koriste. Tako se za alfa – fazu titanija kao stabilizatori koriste primjese kisika, dušika i ugljika, a beta i alfa-beta legure sadrže primjese vanadija, molibdena, željeza, kroma i mangana kao stabilizatore. Ovakve legure titanija imaju povoljna mehanička svojstva poput tvrdoće, mogućnosti zavarivanja i obrađivanja, no nije termički stabilna. Najviše se koriste legure s alfa-beta fazom koje se dobiju procesom umjetnog termičkog starenja legura s alfa fazom pošto se ovim procesom znatno poboljšava stabilnost ovakvih legura.

Glavne prednosti legura titanija vrlo su slične samom titaniju. Otpornost na koroziju, čvrstoća, mala gustoća te kompatibilnost s novim kompozitnim materijalima su svojstva ovih legura zbog čega se one sve više primjenjuju u različitim industrijama. No, ovakve legure nisu u potpunosti savršene. Veliki nedostatak je visoka cijena titanija koja je 10 – 20 puta veća u odnosu na aluminij te već spomenuto da nije termički stabilan pri određenim temperaturama, odnosno ne može se koristiti kod visokotemperaturnih procesa. Legure titanija superiornije su od nekih novih kompozitnih materijala jer je naprezanje ravnomjerno i izotropno raspodijeljeno. Osim u aeronautici, sve više se primjenjuju u brodogradnji, posebice za vojne brodove i podmornice pošto je titanij otporan na djelovanje morske vode. Za titanijeve legure specifično je da se koristi zaštitna prevlaka od titanijevog diborida ( $TiB_2$ ). Titanijev diborid je tvrd metalno – keramički kompozit. (15)

#### *1.3.1.1. Primjena titanija i njegovih legura u biomedicini*

Upotreba titanija u biomedicini je već vrlo dobro uspostavljena pošto titanij svojim svojstvima ispunjava zahtjeve za izradu svih protetskih pomagala puno bolje nego ostali, poput nehrđajućeg čelika, legure CoCr, CP (komercijalno čistog *engl.* commercially pure) niobija ili CP tantala. Ta svojstva su već poznata otpornost na koroziju, no ono što je vrlo zanimljivo kod biomedicinske primjene je biokompatibilnost i bioadhezija, nadalje elastoplastičnost, čvrstoća i laka obrada (spajanje i lijevanje). Elastičnost materijala koji se koristi u ovakvim pomagalima vrlo je bitno svojstvo te bi trebalo biti da je modul elastičnosti materijala što sličniji modulu elastičnosti kostiju (10 – 30 GPa). Titanij se inače smatra skupljim materijalom, no u biomedicinskoj primjeni ona je tek neznatno viša od CoCr legure ili nekih vrsta nehrđajućeg čelika, a jeftiniji je od CP niobija i CP tantala. Titanij i njegove legure koriste se npr. kod koštanih pločica, vijaka, implantata zglobova kuka, stentova, srčanih zalistaka te raznih drugih učvršćenja osobito u zubnom području. (20)

Riječ „biokompatibilnost“ često se koristi kod biomaterijala, ali se proširila i na opću populaciju. Za titanij je moguće često čuti kako je on biokompatibilan metal. Biokompatibilnost je sposobnost materijala da izazove odgovarajući biološki odgovor u tijelu u skladu s



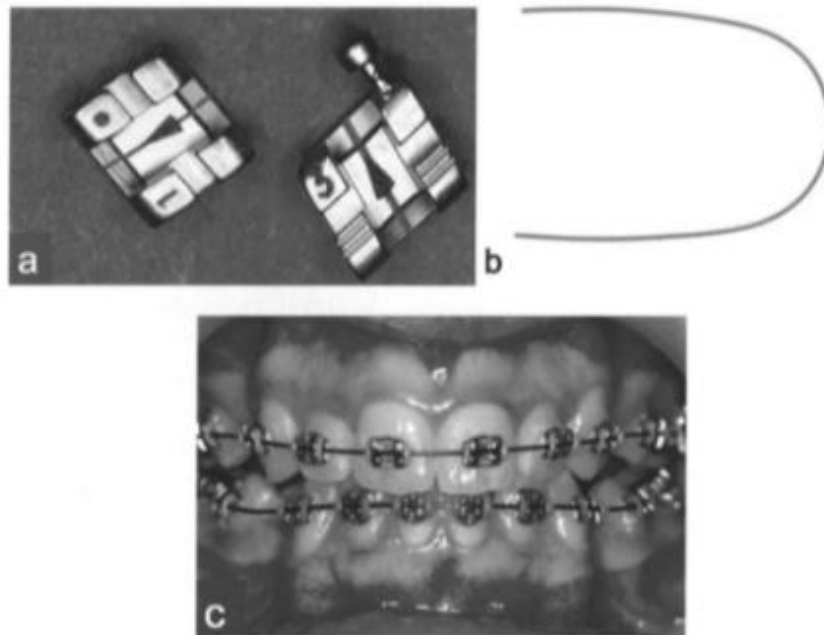
primjenom za koju je predviđen. Ova definicija biokompatibilnosti je točna, no ne daje uvid u to što bi određeni materijal trebao ispunjavati da bi bio biokompatibilan ili kako poboljšati to svojstvo. Prema zahtjevima ISO standarda potrebno je provesti niz testova kako bi se određeni materijal mogao prozvati biokompatibilnim. Ovi testovi nude pregled genotoksičnosti, karcinogenosti, reproduktivne toksičnosti, citotoksičnosti, iritacije i osjetljivosti. Također, koriste se i testovi za lokalne učinke nakon implantacije. Ako je implantat, nakon približno mjesec dana od zahvata, „zazidan“ u čvrstu, tanku avaskularnu kapsulu, a mjesto reakcije relativno inaktivno ili mirno, implantat se može proglasiti biokompatibilnim. (3)

Titanij je relativno inertan metal otporan na koroziju zbog tankog površinskog oksidnog sloja. Otpornost na koroziju slična mu je i kao kod nehrđajućih čelika, ali nehrđajući čelik ima veću reaktivnost u staničnoj kulturi i kod implantacije u životinjama. Razlika je u tome što proteinske otopine ubrzavaju koroziju nehrđajućeg čelika u usporedbi s ekvivalentnim slanim otopinama. Titanij je otporniji na pojavu korozije u ovakvim medijima, no s druge strane naprezanjem i trošenjem ubrzava se pojava korozije. Postoji mogućnost stvaranja Ti – organskih kompleksa gdje je koncentracija Ti-iona vrlo niska, a mogući razlog je što dolazi do kompleksacije, čime se uklanjaju, odnosno vezuju slobodni Ti-ioni i samim time u području oko implantata „dopuštaju“ dodatno otpuštanje metala u međuprostor. Ti – kompleksi koji se stvaraju nisu još okarakterizirani i vrlo je važno za daljnju upotrebu ovakvih legura prikazati imaju li takvi kompleksi potencirajući učinak na stanice i tkiva. Danas je titanij uspješno korišten kao biomaterijal i rutinski ga se koristi u kliničkoj primjeni. Istraživači smatraju kako će iduća evolucija pomagala i uređaja baziranih na titaniju biti na osnovu biološki specifične površinske modifikacije. Vrlo je važno proučiti i dokazati kakav učinak i međudjelovanje ima s proteinima. Tako je već u tijeku istraživanje vezano uz osteopontin, koji ima bitan učinak na zacjeljivanje kostiju i upale, te uz koštane morfogene proteine. Ono što je sada poznato je da dolazi do adsorpcije proteina na implantate te je cilj bioinženjeringa kontrolirati makrofage na implantatu i omogućiti kontrolu proizvodnje proteina od interesa koji mogu pripomoći na mjestu zacjeljivanja. (3)

#### *1.3.1.2. Titanij u ortodontiji*

Najčešće i široko rasprostranjeno korištena legura titanija u ortodontiji je legura nikla i titanija. Koriste se za pomicanje i ispravljanje nepravilno pozicioniranih zuba. Žice, odnosno lukovi izrađeni od ovakvih legura su superelastični te za razliku od konvencionalnih lukova od nehrđajućeg čelika mogu izdržati vrlo velike otklone i vratiti se u svoj izvorni oblik. Osim toga, titanij je mekši i manje gladak od čelika, pa je pretpostavka da je brže izravnavanje zubi kod

korištenja ovakvih lukova zbog veće otpornosti prema trenju kod početnog poravnavanja. U kliničkoj praksi također je zamijećeno kako žice od nikal – titanij legure dulji vremenski period mogu biti bez podešavanja nego čelične žice te se samim time produljuje period između pregleda i duže vrijeme traje aktivno poravnavanje zubi. (3)



**Slika 6.** Primjeri korištenja titanija u ortodontici. a) titanijski nosači, b) luk od legure titanij – molibden, c) prikaz pacijenta s titanijskim nosačima i lukovima. (3)

### 1.3.2. Metabolizam titanija u organizmu

Prema brojnim istraživanjima dokazano je da se titanij većinski unosi i apsorbira u organizmu ingestijom. Uočen je nizak stupanj apsorpcije titanija u gastrointestinalnom traktu i iz njega dalje. Mogući razlog tomu je transferin, koji može djelovati kao specifični prijenosnik iona titanija i može imati glavnu ulogu u transportu i biorazdiobi topivog titanija u cijelom organizmu. (8) Najstabilnije oksidacijsko stanje titanija je Ti (IV) te je vrlo sličan aluminiju (Al (III)) i željezu (Fe (III)). Prema tome, titanij se može vezati s određenim proteinima kao i željezo, a vezanjem s manjim ili većim biomolekulama povećava mu se i topljivost. (13) Istraživanjem na štakorima utvrđeno je kako je moguće taloženje prašine titanijeva dioksida u plućima . Taloži se uglavnom u limfocitima i regionalnim čvorovima u plućima, a to ukazuje na sporo uklanjanje. Pri velikoj izloženosti klirens se smanjuje ili čak prestaje zbog preopterećenja. Iz pluća, male količine titanija mogu prijeći u opću cirkulaciju. (8) Najkorišteniji titanijev spoj, titanijev oksid ( $TiO_2$ ), apsorbira se oralno, dermalno ili inhalacijom. (21)

Distribucija titanija u organizmu moguća je na nekoliko načina: sustavna distribucija putem krvožilnog sustava, limfom ili kao fagocitirane čestice unutar makrofaga. Prema ispitivanjima u općoj populaciji, titanij je pronađen u svim parenhimatoznim organima, ponajviše u plućima (posljedica udisanja čestica prašine koja sadrži titanij).

Trenutno ne postoji dovoljno podataka kako bi se moglo procijeniti „biološko poluvrijeme života“ titanija u organizmu čovjeka ili životinja. Prema ICRP-u (International Commission on Radiological Protection) ono iznosi 320 dana, dok je prema nekim istraživanjima na miševima zabilježeno 640 dana te znanstvenici pretpostavljaju da je kod ljudi duplo duže.

Titanij koji je unesen u organizam oralno, uglavnom se eliminira iz organizma izmetom i urinom. Za urin je poznato da je brzina izlučivanja titanija 10 µg/L, dok mehanizam izlučivanja i moguća količina putem crijeva nije poznata. (8)

### 1.3.3. Učinak titanija u organizmu

Iako mnogo podataka ukazuje na biološku važnost titanija, do sada nije utvrđena niti jedna poveznica s bilo kojim organizmom. (13) Ljudsko tijelo sadrži u prosijeku 10 – 20 mg titanija te je on uglavnom smješten u plućima, bubrezima i jetri. Jedan od glavnih izvora u organizmu su implantati koji sadrže leguru titanija. Zbog galvanske korozije dolazi do otpuštanja iona metala iz implantata, a koja koncentracija iona će se otpustiti ovisi o raznim čimbenicima kao što su pH, prisustvo mikroorganizama i koncentraciju soli. In vivo i in vitro istraživanjima dokazano je otpuštanje titanijevih iona iz implantata i njegova akumulacija u ponekim tkivima i organima, ali toksičnost nije utvrđena. (14)

Štetni učinci titanija (teratogenost, mutagenost, karcinogenost) već se duži niz godina ispituju. Prema nekim istraživanjima spojevi titanija poput titanijeva triklorida, tetraklorida, borida, karbida i dioksida nisu pokazali teratogenost, mutagenost niti karcinogenost. Međutim, prema nekim drugim istraživanjima na štakorima pokazala se mutagenost titanijeva dioksida, ali se pretpostavlja da je su mutacije hrpt – gena uzrokovani slobodnim radikalima kisika koji nastaju u prisustvu titanija. Ovakve se indikacije mogu spriječiti dodatkom katalaze što potvrđuje da su slobodni radikali kisika induktori mutacija. Iz eksperimentalnih studija na životinjama dobiveno je dovoljno dokaza o kancerogenosti titanijeva dioksida, prema tome je IARC (*eng.* International Agency for Research on Cancer) 2006. godine uvrstio TiO<sub>2</sub> u grupu 2B kancerogenih spojeva. Uobičajeno se smatra kako titanij spada u skupinu metala s niskom kancerogenosti. (8) Furst i sur. (1969.) dokazali su da organski spojevi titanija suspendirani u

trioktanoinu, ako se daju jednom mjesečno štakorima i miševima intramuskularno, uzrokuju na mjestima uboda fibrosarkome, dok su se kod životinja razvili hepatomi i maligni limfomi slezene. (22)

Na reprodukcijski sustav štakora nepovoljno utječu topljivi spojevi titanija. Prema istraživanju u kojem su štakorima davali topljivi titanij u vodi za piće (5 mg/L) došlo je do značajnog smanjenja preživjelih životinja do treće generacije, a omjer mužjaka i ženki postupno se smanjivao.

Prema IARC-u ne postoji dovoljno dokaza da  $\text{TiO}_2$  ima kancerogeni učinak kod ljudi. Epidemiološke studije koje su provedene početkom 21. st. sugeriraju da prašina koja sadrži  $\text{TiO}_2$  nema kancerogeni učinak na ljudska pluća. No, sve ove studije su uzimale u obzir smrtnost od rada, ali nijedna nije otkrila povećanje smrtnosti od raka pluća povezanog s  $\text{TiO}_2$ . (8)

#### 1.4.Krom

Krom zbog svoje mase i atomskog broja spada u VI-B skupinu prijelaznih elemenata. Srebrnkaste je boje, sjajan i savitljiv metal koji se lako polira. Otapa se u neoksidirajućim mineralnih kiselinama, ali ne u vodi ili  $RNO_3$ . Prema tome, otporan je na „napad“ oksidirajućim kiselinama i raznim drugim kemikalijama te se zbog tog svojstva može koristiti u legurama koje su otporne na koroziju. (23) Vrlo je kemijski inertan. Na vlažnom zraku ne oksidira, a s kisikom izgara tek pri visokim temperaturama. Kao i s kisikom, tek se pri visokim temperaturama spaja s klorom, fluorom, bromom, sumporom i sl. (24) Krom se može pojavljivati u oksidacijskim stanjima od -II do +VI, ali uobičajeno je u stanjima 0, II, III i VI. Već dugi niz godina smatra se kako je šesterovalentni krom otrovan (vrlo vjerojatno zbog otrovnih učinaka povezanih s dugotrajnom izloženošću industrijskim bikromatima), dok se za trovalentni krom smatra da nije otrovan. (25) Trovalentni oblik kroma ima tendenciju koordinacije s ligandima koji sadrže dušik i kisik. Krom je prisutan u raznim medijima u okolišu, bilo u trovalentnom ili šesterovalentnom obliku. Stoga se u biologiji i u aspektu zdravlja okoliša puno pažnje pridaje upravo kromu s oksidacijskim stanjem III i VI. (23)

Krom je vrlo važan metal koji se koristi u više različitih industrija, stoga je i njegova godišnja proizvodnja vrlo velika. Zemlje koje su superiorne u proizvodnji kroma su: Južna Afrika, zemlje bivšeg Sovjetskog Saveza, Albanija, Filipini, Zimbabve i Turska. SAD više ne proizvodi krom jer im nije ekonomski isplativo, ali su s druge strane jedni od glavnih potrošača kroma s otprilike 12% svjetske proizvodnje. Najvažnija ruda kroma je kromit ( $FeOCr_2O_3$ ) i sadrži 68% kromovog oksida ( $Cr_2O_3$ ) te 32% željezovog oksida ( $FeO$ ). (23) Ferokrom je zapravo legura kroma i željeza koja se upotrebljava u proizvodnji legura sa željezom ili niklom i željezom. (24) Najveći potrošači kroma su metalurška (ferolegure i obojene legure), vatrostalna i kemijska industrija. Najvažnija upotreba kroma je dakako za izradu nehrđajućeg čelika u kojem se koristi otprilike 75% svih ferokroma od godišnje proizvodnje. Nadalje, čest je u izradi opeka i žbuke zbog njegove visoke točke taljenja i kemijske inercije. U kemijskoj industriji koristi se za pripremu natrijeva kromata i dikromata iz kojih se proizvodi većina drugih kemikalija kroma. Još se može koristiti kao katalizator, u pigmentima, proizvodnji tekstila, u sredstvima za zaštitu drva, proizvodnja tonera, itd. Krom se uglavnom koristi u obliku ferokroma ili legiran sa željezom, niklom ili kobaltom. Pri dodavanju kroma u čelik ili kovano željezo, poboljšavaju im se određena svojstva poput otpornosti na koroziju ili mehanička svojstva kao što su tvrdoća, čvrstoća te otpornost na kaljenje. (23) Čisti krom dobiva se iz oksida kroma aluminotermijski ili elektrolizom vodenih otopina soli kroma, a koristi se za galvansko

kromiranje željeza kako bi se željezo zaštitilo od korozije ili se može koristiti za dobivanje tvrde i mehanički otporne površine različitih materijala. (24) Krom se također koristi u medicini i zubnim implantatima te ostalim uređajima i alatima u kojima dovoljan sadržaj kroma može osigurati zaštitni oksidni sloj na površini legure i spriječiti koroziju. U niskim koncentracijama uključen je i u metabolizam lipida i bjelančevina u organizmu. (26)

Krom je ubikvitarni element u svemiru, šesti je po zastupljenosti u Zemljinoj kori, petnaesti u morskoj vodi te također petnaesti po zastupljenosti u ljudskom tijelu. Usprkos visokoj koncentraciji kroma u tlu, biljke imaju sposobnost oduprijeti se prekomjernom nakupljanju ovog metala u sebi. Hrana bogata kromom je smeđi šećer, životinjske masti i maslac. U prirodnim vodama zabilježena je koncentracija manja od 10 ppb. Prosječni dnevni unos kroma kod čovjeka je 60  $\mu\text{g}$  (30 – 100  $\mu\text{g}$ ), od čega je 10  $\mu\text{g}$  iz vode. (25)

#### 1.4.1. Izvori kroma u okolišu

Krom u okolišu može potjecati od raznih velikih industrija i njihovih proizvoda poput proizvoda od papira, organskih, petrokemijskih i anorganskih kemikalija, gnojiva, tekstilnih proizvoda, elektrana, itd.

Emisija kroma u atmosferu ponajviše je uzrokovana vatrostalnom i metalurškom industrijom. Emisije su najčešće u obliku čestica te su danas postrojenja opremljena uređajima za kontrolu emisije kao što su elektrofilteri kako bi se ograničilo ispuštanje.

Moguće je i zagađenje vode kromom iz otpadnih voda, kromatima i drugim topivim solima kod taljenja kroma, ispiranjem iz jama za odlaganje i sl. Danas su dostupne metode smanjivanja razine kroma u otpadnim vodama. Tako se na primjer kod galvanizacije koristi Cr (III) koji nije otrovan, za razliku od Cr (VI).

Uobičajena gnojiva sadrže krom u tragovima, a ponekad i do nekoliko tisuća ppm-a. No, prema istraživanjima, krom koji dolazi u tlo putem gnojiva nije zabrinjavajuća stavka. Veći problem je novi trend korištenja kanalizacije na obradivim površinama kao fertilizator. Na taj način prenose se i teški metali i unose u prehrambeni lanac. Iz ovakvog izvora, krom je relativno neraspoloživ biljkama. (23)

Antropogeno otpuštanje kroma u okoliš dovelo je populaciju u opasnost od izloženosti kromom udisanjem zagađenog zraka ili pijenjem zagađene vode. Najčešće se u tlu nalazi trovalentni krom, ali problem je ako u tlu postoji visoka razina mangana ili ako je tlo alkalno, onda može doći do oksidacije kroma Cr (III) do Cr (VI). Budući da je krom toksičan i

kancerogen, u određenim državama donesena je odredba da je gornja granica izloženosti kromu u pitkoj vodi 100  $\mu\text{g/L}$  te 5  $\mu\text{g/m}^3$  tijekom radnog dana. (27)

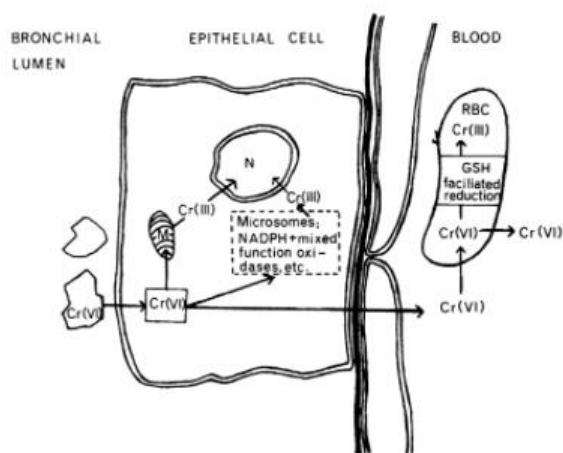
#### 1.4.2. Metabolizam kroma u organizmu

Poznavanje brzine i mehanizma apsorpcije, transporta, organske distribucije i eliminacije iz organizma kroma i njegovih spojeva vrlo je važno kako bi se mogli razumjeti mehanizmi toksičnosti i kancerogenosti, ali i razumijevanje normalnog unosa esencijalnih spojeva kroma. (28)

Ljudi i životinje vrlo slabo apsorbiraju anorganske trovalentne soli kroma. Kromati se općenito bolje apsorbiraju, no preferirano stanje valencije kroma je +3. Vrlo vjerojatno se svi apsorbirani kromati u gastrointestinalnom sustavu prevode sa +6 do +3. Kod dijabetičara kromati se apsorbiraju dva do četiri puta više nego kod zdravih pojedinaca. (25)

Schwartz i Mertz još su 1959. utvrdili kako su neki spojevi koji sadrže krom važni za čovjeka te je Mertz 1979. predložio da bi minimalni dnevni unos kroma trebao biti oko 5  $\mu\text{g}$ . Prijedlog je temeljio na činjenici da probavni sustav apsorpira 15% kroma iz prehrane, a da je dnevni gubitak kroma 0,5 – 1  $\mu\text{g}$ . Prema tome, prehranom bismo svakodnevno trebali unositi 50 – 200  $\mu\text{g}$  kroma. (28)

Ne postoji puno izvješća da se krom unosi u organizam inhalacijom. Inhalacija kroma zabilježena je uglavnom kod profesionalnih oboljenja te je primijećena akumulacija kroma u plućnom tkivu. Pretpostavlja se da se pretežito nakuplja „loš“ krom (Cr (VI)) pošto je topljiviji od Cr (III). (8)



**Slika 7.** Predloženi model apsorpcije Cr (VI) u plućima i gastrointestinalnom traktu. M – mitohondrij; N – jezgra; RBC – crvene krvne stanice. (28)

Distribucija u organizmu ovisi o spoju kroma i o valenciji. Biološke membrane relativno su nepropusne za Cr (III) za razliku od Cr (VI) i uz brzu redukciju Cr (VI) te vezanje Cr (III) u makromolekule učinili su da je teško razumjeti unos i distribuciju kroma u organizmu. Kromov(III) acetat ili citrat brzo se izlučuju iz organizma, dok se u istom vremenskom intervalu kromov (III) klorid ili kromati brže apsorbiraju u tkivu. Organi u kojima se najviše taloži krom su jetra, slezena, koštana srž i retikuloendotelni sustav. Također, mogući je i transplacetarni prijenos kroma s majke na fetus.

Kod eliminacije kroma iz organizma, svaki je mehanizam zapravo povezan, odnosno ovisi o valentnom stanju kroma. Nakon što se akumuliraju i vežu u tkivo, kromovi oblici su uglavnom trovalentni. Ako dođe do smanjenog kapaciteta stanica jetre, krom u obliku Cr (VI) može se izlučiti i putem žuči. Nakon parenteralne primjene, krom se pretežito eliminira putem urina. Kod izlučivanja kroma putem bubrega, dokazano je da dolazi do glomerularne filtracije praćena tubularnom resorpcijom čak do 60%. (8) Vrlo važna stavka kod kroma je što se Cr (III) izlučuje urinom, dok se većina Cr (VI) zadržava u organizmu što nije povoljno za organizam. (27)

#### 1.4.3. Učinak kroma u organizmu

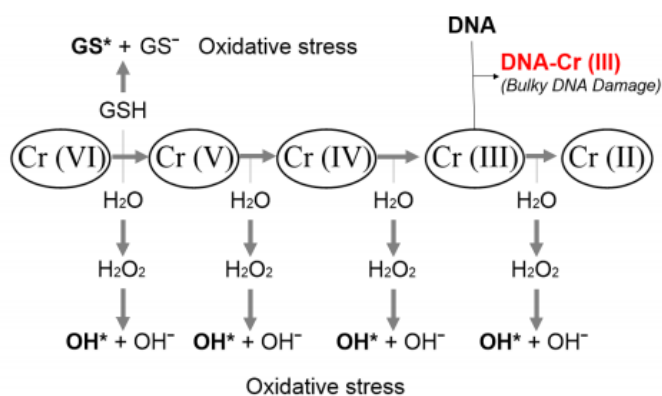
Smatra se da je krom esencijalni nutrijent, ali ujedno i opasan za zdravlje ljudi. Kako je to moguće? Upravo zbog oksidacijskih stanja u kojima se krom nalazi. Kako je i ranije navedeno, Cr (VI) je opasan za zdravlje, odnosno toksičan već pri malim dozama, dok je Cr (III) povoljan nutrijent u umjerenim količinama. Zdravstveni učinci i nutritivne pogodnosti kroma u ostalim mogućim oksidacijskim stanjima nisu poznati iako postoje regulatorna ograničenja za Cr (VI) i Cr (III). (29) Prilikom izloženosti kromu, mnogi čimbenici utječu na to hoće li biti posljedica po zdravlje ili ne. Čimbenici su: doza (koliko je kroma uneseno u tijelo), trajanje (kratkotrajna ili dugotrajna izloženost), oksidacijski oblik kroma te način na koji se dolazi u kontakt s kromom (inhalacija, ingestija, dermalno). Također je potrebno u obzir uzeti i ostale moguće štetne tvari koje se unose u organizam, dob, spol, način života i zdravstveno stanje. (30) Zdravstveni rizici kroma mogu se očekivati neovisno o tome potječe li on iz vanjskih izvora, poput onečišćene vode za piće, ili iz unutarnjih izvora, poput korodirajućih zubnih aparata. Kod aplikacija u stomatologiji ne očekuje se akutno trovanje kromom jer su koncentracije metala koji se otpušta niske do umjerene. (26)

U niskim koncentracijama krom sudjeluje u prirodnom procesu metabolizma lipida i bjelančevina. Vrlo male količine kroma potrebne su za normalne funkcije i te se količine zadovoljavaju prehranom. Dnevno se unosi oko 100 µg kroma iz hrane poput žitarica, voća,



povrća, plodova mora, gljiva, jaja i sl. Ostatak kroma koji se može naći u organizmu dolazi iz vanjskih onečišćenja zbog industrijskih procesa koji zagađuju zrak i pitku vodu. (26)

Izlaganje dovoljno visokim koncentracijama kroma može dovesti do njegova toksičnog, genotoksičnog i kancerogenom učinka. Cr(VI)-ioni izuzetno su oksidirajući, a ujedno su i najtoksičniji te s najvećim rizikom da izazovu karcinom. Isto tako, pod prikladnim uvjetima, Cr(III) može oksidirati u Cr(VI) prema reakciji  $2\text{Cr}_2\text{O}_3 + 3\text{O}_2 \rightarrow 4\text{CrO}_3$  i time povećati toksičan učinak kroma. Cr(VI) se lakše apsorbira u organizmu jer njegov aktivni oblik strukturno nalikuje sulfatu i lako prolazi kroz stanične membrane transporterima sulfata. Nakon apsorpcije može se ponovo reducirati do Cr(III), ali ta se redukcija odvija nakon što je već nanoseno stanično oštećenje. Krom može uzrokovati oksidacijski stres tako što s radikalom glutationom ( $\text{GS}^*$ ) oksidira čitavu okolinu, „napada“ adenin i gvanin u DNA i proizvodi DNA adukte. Ovakvo oštećenje može dovesti do karcinogeneze jer je DNA oštećena ili nepotpuno popravljena.



**Slika 8.** Reakcije redukcije i oksidacije iona kroma. (27)

Ioni kroma mogu reagirati s reducensima i oksidansima te proizvoditi slobodne radikale. Cr(III) može oksidirati s tekućinama za ispiranje usta, pastom za zube te profilaktičkim gelovima koji sadrže fluoride, povidon jod i endodontonske kemikalije. Oksidacijom Cr(III) prisutan u ovim sredstvima, u oralnoj sredini postaje otrovniji Cr(VI) te može potencijalno uzrokovati oštećenja.

Cr(III) iz antidijabetičkih lijekova može se oksidirati u gastrointestinalnom mediju, krvnoj plazmi i drugim izvanstaničnim tekućinama i stvarati proteinske komplekse, ionizirati s DNA te na taj način također stvoriti DNA adukte. Lijekovi za dijabetes koji sadrže krom mogu potencijalno imati genotoksičan i kancerogen učinak.

Šesterovalentni krom je klasificiran kao kancerogen skupine 1 sa složenim mehanizmima kancerogenosti. Jedni od glavnih mehanizama su povećanje oksidativnog stresa, prekidi kromosoma te stvaranje adukata DNA. (27) Prema epidemiološkoj studiji koji su proveli Gross i Kölsch, kod profesionalnih oboljenja, odnosno raka pluća, najčešći uzročnik je cinkov kromat što ukazuje na to da je cinkov kromat potentniji humani kancerogen nego ostali spojevi kroma. (8)

Karcinom uzrokovan kromom najčešće se manifestira na plućima, nosu i sinusima. Cr (VI) u reakciji s askorbatom i vodikovim peroksidom rezultira nakupljanjem hidroksilnih radikala koji oštećuju DNA (DNA prekidi, Cr-DNA adukti, DNA – DNA i DNA – protein umrežavanje, oksidativna oštećenja DNA). Zabilježeno je i da Cr (VI) inhibira metilacijom gen supresor p16.

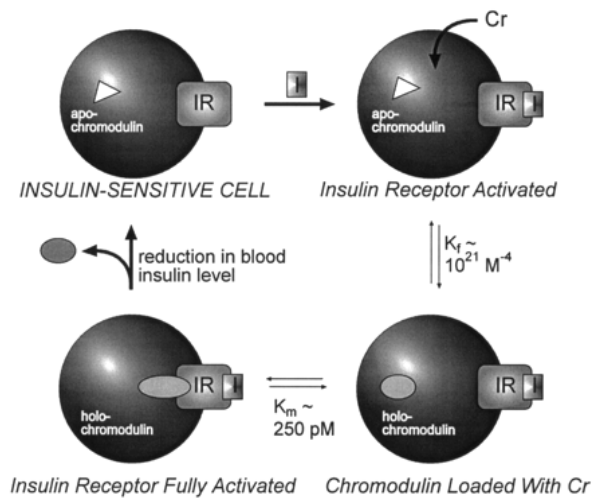
Ovisno o dozi, kod akutnih učinaka kroma javlja se iritacija respiratornog sustava i začepljenje dišnih putova. Kod kronične izloženosti javlja se kronični bronhitis, astma, faringitis, rinitis, polipi u gornjim dišnim putevima, ulceracije nosne sluznice i sl.

Izloženost kontaktom uzrokuje pojavu alergijskih reakcija, iritacije ili dermatitis. Krom može utjecati i na bubrege, jetru, reproduksijski sustav, može uzrokovati poremećaj u rastu, promjene boje zuba i eroziju, itd. (27)

#### *1.4.3.1. Uloga kroma kod dijabetesa*

Unatoč raširenoj uporabi kroma kod dijabetičara, njegov utjecaj na zdravlje i metabolizam ugljikohidrata nije sasvim poznat te su oskudni podaci o ovoj temi. Zanimanje za kromom započinje 1950.-ih kada se shvatilo da kod pivskog kvasca postoji faktor tolerancije glukoze (GTF) koji je prevenirao razvoj dijabetesa kod pokusnih životinja. Velik broj literatura ukazuje na to da je krom, Cr (III), bitan za ljudsko zdravlje jer je uključen u djelovanje inzulina. Nedostatak kroma kod dijabetičara i kontrolnih skupina u epidemiološkim studijama nije u potpunosti definiran te je potrebno provesti daljnja istraživanja. Postavlja se pitanje treba li preporučati krom kao dodatak prehrani. Sve više istraživanja pokazuju da se dodatkom kroma poboljšava osjetljivost na inzulin i poboljšava se metabolizam glukoze kod pacijenata s dijabetesom tipa I i II te kod nekih pacijenata bez dijabetesa. Većina kliničkih ispitivanja ima ograničenja poput malog broja ispitanika, kratkoročne nerandomizirane dizajne i različite doze dodatka kroma što objašnjava velike varijabilnosti rezultata istraživanja. Ovakva ispitivanja bi trebala procijeniti učinke liječenja i metaboličke parametre što bi bilo vrlo skupo i dugotrajno

jer bi uključivalo velik broj ispitanika i više godina praćenja. Takvi rezultati trebali bi procijeniti sigurnost dugotrajne nadoknade kroma u organizmu. (31)



**Slika 9.** Predloženi mehanizam djelovanja kroma i LMWCr-a na pojačanje djelovanja inzulina. (31)

### 1.5. Kvasac i primjena kvasca u eksperimentalnim istraživanjima

Kvasci su eukariotski jednostanični organizmi te pripadaju carstvu gljiva (*Fungi*) poput plijesni i mesnatih gljiva. Gljive su općenito eukarioti koji mogu biti jednostanični ili višestanični. Ne posjeduju klorofil pa stoga nemaju ni sposobnost fotosinteze i hranu su primorani apsorbirati iz okoline.

Kvašćeve stanice nazivaju se još i blastokonidije (grč. *blastos* – klica, *conia* - prašina). Promjera su 2 do 15  $\mu\text{m}$ , a mogu biti okruglog, izduženog ili ovalnog oblika. Blastokonidije su obavijene višeslojnom staničnom stijenkom unutar koje je citoplazma s organelima. Stanična stijenka pruža čvrstoću i zaštitu stanici od raznih mehaničkih oštećenja i osmolize stanica. (32) Krute je strukture te čini 25% ukupne suhe mase stanice kvasca, a sastoji se od makromolekula: visoko glikoziliranih glikoproteina ("manoproteina"),  $\beta$ -(1,6)-glukana,  $\beta$ -(1,3)-glukana i hitina. Litički enzimi mogu u potpunosti ukloniti staničnu stijenku bez da oštete vitalnost ili druge stanične funkcije kvasca. Stanična stijenka može se regenerirati što je korisno kod proučavanja biosinteze stanične stijenke. (33) Stanice koje nemaju staničnu stijenku nazivaju se sferoplasti i podložne su intergenskim i intragenskim spajanjem stanica kojim nastaju hibridi visokog biološkog potencijala. Kod blastokonidije, stanična stijenka ima bitnu ulogu kod pretvorbe u filamentozni oblik. Također je jedan od čimbenika patogenosti kvasaca zbog mogućnosti adherencije na biološke i umjetne supstrate. Na površini nekih kvasaca mogu se pronaći fimbrije koje omogućuju adherenciju na humane epitelne stanice i površine protetičkih materijala. Neke patogene vrste kvasaca mogu imati i polisaharidnu kapsulu kao čimbenik virulencije.

Kvasci imaju i citoplazmatsku (staničnu) membranu građenu od dva sloja fosfolipida (fosfatidilkolin i fosfatidiletanolamin) s uvrnućima. (32) U lipidnom dvosloju nalaze se proteini koji su fiksatori citoskeleta. (33) Ona je zadužena za propusnost tvari u stanicu te za sintezu molekula stanične stijenke. Tako je na primjer ciljano mjesto djelovanja određenih antifungalnih lijekova ergosterol (najvažniji sterol) u citoplazmatskoj membrani kvasaca. (32)

U periplazmatskom prostoru (prostor između stanične stijenke i membrane) nalaze se proteini koji izlaze kroz staničnu stijenku. Fosfataze i invertaze izlaze i kataboliziraju supstrate koji ne mogu proći kroz membranu.

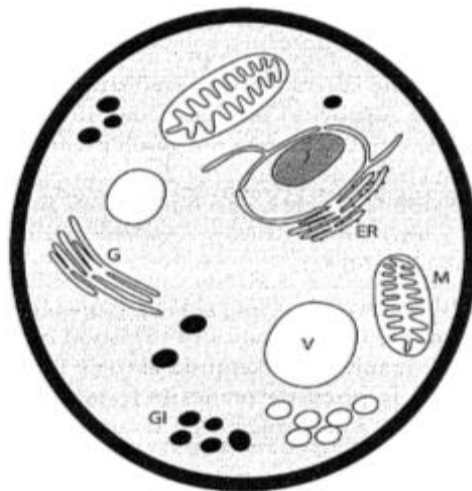
Citoplazma je vodena, koloidna otopina u kojoj se odvija većina unutarstaničnih aktivnosti. Topive makromolekule poput glikogena i proteina nalaze se u citoplazmi, a veće makromolekule poput ribosoma, proteasoma ili lipida suspendirani su u citoplazmi (33)

Jezgra je obavijena dvostrukom jezgrinom membranom na kojoj se nalaze pore. Osim jezgre, u citoplazmi su vidljivi i mitohondriji, mikrotubuli, Golgijev aparat, endoplazmatski retikulum, vakuole i pričuvna zrnca. (32)

Kvasci na hranjivoj podlozi tvore mekane, neprozirne, bež kolonije veličine 1 – 3 mm. Uspješno rastu u prisustvu jednostavnih izvora dušika i ugljikohidrata. (34) Na kukuruznom agaru moguće je pronaći, osim blastokonidija, prave hife i pseudohife. Pseudohife će nastati ako se stanice kvasca izdužuju i slažu jedna do druge u kraće ili duže lance. Hife nastaju germinacijom iz blastokonidija i izduživanjem vršnih stanica te stvaranjem poprečnih pregrada. (32)

Uobičajeno razmnožavanje kvasaca je pupanjem, odnosno nesporogeno. Postoje i kvasci koji se razmnožavaju sporogeno te se nazivaju askuse.

Niži eukarioti, poput kvasaca, pogodni su za proučavanje i objašnjavanje osnovnih procesa koji se događaju u eukariotskim stanicama. Prednost im je jednostavan uzgoj i kratko vrijeme generacije. Pogodni su za istraživanja u molekularnoj i klasičnoj genetici. (33)



**Slika 10.** Građa blastokonidije; J - jezgra, M - mitohondrij, V - vakuola, ER - endoplazmatska mrežica, G - Golgijev aparat, GI - glikogenska zrnca. (32)

#### 1.5.1. *Saccharomyces cerevisiae*

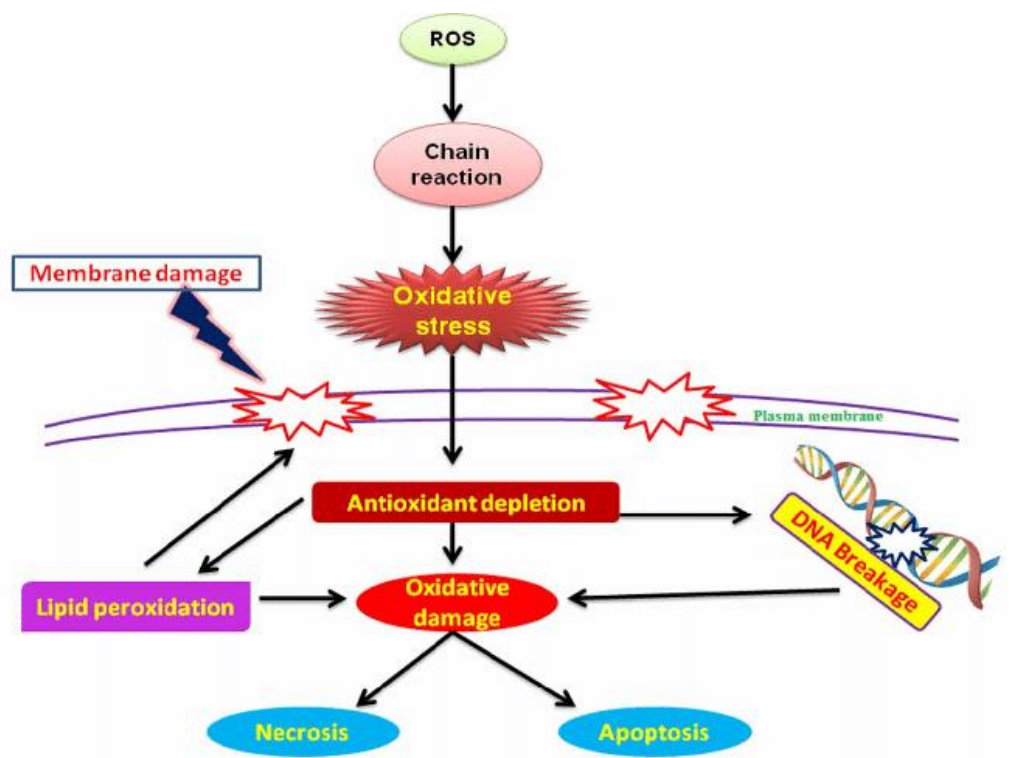
*Saccharomyces cerevisiae* ili pivski kvasac predstavnik je kvasaca koji se koristi širom svijeta u prehrambenoj industriji (vrenje, destilacija alkohola, proizvodnja vina, pekarstvo) te je jedan od glavnih modela stanica u raznim znanstvenim istraživanjima zbog njegove specifične fiziološke građe i metaboličke aktivnosti. Već se desetljećima koristi kao prototipska eukariotska stanica idealna za otkrivanje mnogih osnovnih pojava eukariotskog života zbog

svojih povoljnih svojstava kao što su: jednostavnost i brzina analize kvasca, mala veličina njegova genoma (12 Mbp), kratko vrijeme udvostručavanja (80 min na složenim medijima) te potpuno razvijen sustav spolnog razmnožavanja sa stabilnim haploidnim i diploidnim fazama koje omogućuju komplementaciju i rekombinacijsku analizu. (35) Ponajbolje je proučena i shvaćena vrsta kvasca. Predstavnik je askosporogenih kvasaca. Vegetativno se reproducira multilateralim pupanjem te spolno pomoću askospora. Stanice su jajolike, ovalne ili cilindrične, svijetlo kremaste boje, glatke i ravne površine. (36) Kvasci *Saccharomyces spp.* imaju sposobnost anaerobne ili semianaerobne fermentacije šećera pri kojoj se proizvodi etanol i ugljikov dioksid. Uzgajaju se u hranjivim podlogama s velikim količinama šećera (D – glukoza, D – fruktoza, D – manoz, D - maltoza), kvašćevog ekstrakta i peptona pri optimalnoj temperaturi od 37 °C. (37)

### 1.5.2. Oksidativni stres

Kvasci, kao što je *Saccharomyces cerevisiae*, već dugo vremena služe kao korisni model za proučavanje oksidacijskog stresa koji je povezan sa staničnom smrću i teškim patološkim stanjima koja se javljaju kod ljudi. Kod njih postoje određene prednosti u odnosu na druge modele, poput kratkog životnog ciklusa te što se lako mogu genski manipulirati, a da pri tome zadržavaju jezgrine stanične procese koji su karakteristični za eukariote. Kvasac može dati značajan doprinos u razumijevanju oksidativnog stresa i njegovih posljedica kao što su programirana stanična smrt ili pogrešna regulacija stanične smrti u kontekstu razvitka karcinoma, neurodegenerativnih bolesti ili starenja.

Većina živih organizama ovisi o kisiku, no međutim organizmi su morali razviti i mehanizme antioksidativne obrane kako bi se zaštitile od mogućih toksičnih učinaka kisika. Toksičnost kisika proizlazi iz njegove sposobnosti da stvara reaktivne spojeve (ROS) kao što su radikal superoksida ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilni radikal ( $OH^\cdot$ ). Ovakvi radikali nastaju uglavnom zbog „istjecanja“ elektrona iz transportnog lanca tijekom aerobnog disanja. Značajno stvaranje ROS-eva može potaknuti izloženost teškim metalima, UV zračenju, pesticidima, zagađivačima zraka, ksenobioticima te drugim egzogenim čimbenicima. Ako se stanica antioksidativnim mehanizmima ne uspije obraniti, nakupljanje slobodnih radikala kisika neizbježno će uzrokovati oksidativni stres stanice. Oksidativni stres stanice definiran je kao stanje neravnoteže između prooksidanasa i antioksidanasa što dovodi do oksidativnog oštećenja stanice čime je ugrožena njena održivost.



**Slika 11.** Shematski prikaz staničnog oštećenja oksidativnim stresom. (38)

Dokazano je da akumulirani radikali kisika oštećuju važne biomolekule poput nukleinskih kiselina, proteina i lipida. Ovi radikali imaju važnu ulogu u posredovanju programirane stanične smrti (apoptoza) ili čak pri vrlo visokim dozama mogu uzrokovati nekrozu u različitim staničnim tipovima. Oksidativna oštećenja uzrokovana slobodnim radikalima kisika povezana su s nastankom dijabetesa i neurodegenerativnih bolesti (Parkinson, Alzheimer, amiotrofična lateralna skleroza). Uključeni su u proces starenja te imaju ključnu ulogu u razvoju karcinoma. (39)

Youseff i sur. proučavali su kako superoksid dismutaza utječe na slobodne radikale kisika koji se nađu u prisutnosti kvasca. Fagociti pri obrani organizma od patogena proizvode slobodne radikale kisika. Ti bi radikali trebali, u ovom slučaju, oštetiti kvasac, no zbog superoksid dismutaze (SOD3) koja će detoksicirati reaktivni kisik, kvasac zadržava svoju patogenost i preživljava u domaćinu. Kvasci proizvode SOD3 i usmjeravaju je u izvanstanično okruženje putem N – terminalnih i C – terminalnih signala koji potiču njeno lučenje i vezanje na površinu stanice. (40)

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj iona metala koji se otpuštaju iz dvije vrste ordonotskih lukova: „remanium” i „rematitan” na metaboličku aktivnost 2 vrste kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* W303 i divlji tip. Korišteni lukovi različitog su deklariranog sastava – u „remanium“ lukovima prevladavaju krom i nikal, dok u „rematitan“ lukovima prevladava nikal. Ioni otpušteni iz lukova mogu utjecati na staničnu proliferaciju, vitalnost i vijabilnost kvasca. Lukovi su bili uronjeni, bilo u umjetnu slinu ili u YPD-podlogu, na period od 3, 7 ili 14 dana te nakon toga korišteni u pokusu s kvascem. Metabolička aktivnost praćena je XTT testom, AO/PI fluorescentnom bojom i „Live/Dead Yeast Viability Kit”-om. U istraživanju je ispitana i unutarstanična oksidacija do koje može doći kada otpušteni ioni metala prodru u stanicu kvasca i potaknu stresni odgovor.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

U ovom istraživanju korištena su dva soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: W303 (auksotrofni mutant MATa {his3-11,15 leu2-3,112 ura3-1 trp1-1, ade2-1}) i divlji soj (prototrof). Radni kvasci uzgajani su po principu *Scale – up* na YPD hranjivoj podlozi i u umjetnoj slini.

##### 3.1.2. Uređaji, laboratorijski pribor, kemikalije

- Stakleno posuđe (tikvice od 250 mL, 500 mL, 1000 mL; čaše, epruvete)
- Automatske pipete različitih volumena, 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
- ELISA optički čitač mikrotitarskih pločica, Tecan EL 808, Austrija
- 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
- Kvašćev ekstrakt, Biolife, Italija
- LIVE/DEAD Yeast Viability Kit, Thermo-Scientific, SAD
- XTT test – XTT Cell Viability Kit, Cell Signaling Technology, SAD
- Autoklav za sterilizaciju, CertoClav, Austrija
- Vorteks, Technokartell TK3S, Australija

- LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter, Logos Biosystems, Južna Koreja
- AO/PI boja, Logos Biosystems, Južna Koreja

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Priprema hranjive podloge

YPD (yeast extract, peptone, dextrose) je hranjiva podloga koja se koristi kod uzgoja raznih sojeva kvasca. Vrlo je bogat medij te može biti pripremljena kao kruta ili tekuća podloga. Za pripremu podloge koristi se receptura: 20 g/L glukoze, 20 g/L peptona i 10 g/L kvašćevog ekstrakta. Izvaganim sastojcima potrebno je dodati određenu količinu destilirane vode, staviti na magnetsku miješalicu i miješati dok otopina ne postane bistra. Nakon što je otopina promiješana, potrebno je prilagoditi pH na 5,5 s koncentriranom klorovodičnom kiselinom što je optimalan pH za rast kvasaca. (41)

U ovom istraživanju YPD medij je korišten za pripremu podloga s iscrpinama metalnih iona prema principu da na svaki centimetar žičanog luka („rematitan“ i „remanium“) treba dodati 1 mL iscrpine. Pri postavljanju ortodontskog aparatića koristi se žičani luk od 14 cm, s tim da se koriste 2 luka po aparatiću. Prema tome potrebno je 28 mL iscrpine za pojedinu analizu. Tikvicu sa svim sastojcima je potrebno sterilizirati u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 minuta. Tako pripremljene podloge su se nakon toga kontinuirano miješale na 100 rpm, 37 °C, 3, 7 ili 14 dana, kako bi se dobile iscrpine metalnih iona.

#### 3.2.2. Priprema umjetne sline

Umjetna slina vrlo se često koristi u istraživanjima vezanim uz ortodonciju te su takve umjetne sline sastavom vrlo slične prirodnoj slini. Naravno, nikako nije moguće u potpunosti točno duplicirati svojstva ljudske sline jer je to tekućina koju izlučuju parotidne, submaksilarne i sublingvalne žlijezde te ovisi u kojem dobu dana se izlučuje, ali i o brojnim drugim čimbenicima. (42)

U istraživanju je korištena umjetna slina napravljena prema recepturi Toni Zucchi-a. Priprema se prema 1L te je potrebno dodati 1,5 g/L KCl, 1,5 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/L KSCN i 0,9 g/L mliječne kiseline i do 1 L nadopuniti destiliranom vodom, a nakon toga korigirati pH na 4,8. Ovakav pH je odabran jer odgovara jedan do dva dana starom dentalnom biofilmu te simulira slinu kod pacijenata sa slabom oralnom higijenom. Kao i kod postavljanja pokusa s YPD medijem, u tikvicu se dodaju dva žičana luka („remanium“ ili „rematitan“) i 40 mL otopine umjetne sline (20 mL po luku) te steriliziraju u autoklavu na 121°C u trajanju od

15 minuta. Tako pripremljene otopine su se nakon toga kontinuirano miješale na 100 rpm, 37 °C, 3, 7 ili 14 dana, kako bi se dobile iscrpine metalnih iona.

### 3.2.3. Uzgoj kvasaca

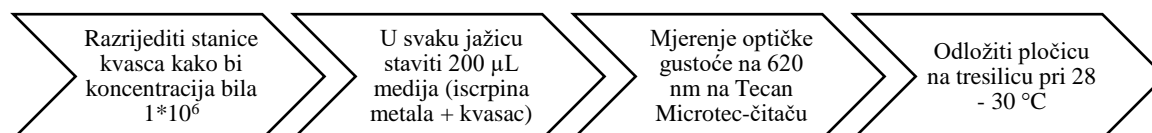
U epruvete se ulije 10 mL YPD hranjive podloge te se pomoću sterilne bakterijske ušice precijepe kvasci s krute podloge u epruvetu. Epruveta se lagano miješa kako bi se biomasa raspršila po hranjivom mediju. Na tresilici (Unimax 1000; 200 rpm) se kroz 24 h na temperaturi od 30 °C uzgajaju kvasci. Vidljivo je zamućenje podloge pošto su se kvasci umnožili.

### 3.2.4. Određivanje broja stanica kvasca

#### 3.2.4.1. Određivanje optičke gustoće stanica kvasca

Približan broj stanica u kulturi može se odrediti spektrofotometrijski mjerenjem optičke gustoće (OD) pri valnoj duljini od 620 nm. Kulture stanica potrebno je razrijediti kako bi očitavanje bilo  $<1,0$ . U istraživanju je korištena jednaka mikrotitarska pločica za mjerenje OD i XTT-a, te je prema tome protokol pripreme jednak, osim što je za mjerenje optičke gustoće zanemariv dodatak XTT reagensa.

Optička gustoća mjerena je na Tecan Microtec-čitaču. Između mjerenja, mikrotitarske pločice potrebno je držati na laganom trešenju uz temperaturu 28 – 30 °C, koja je optimalna za rast i razvoj kvasaca.

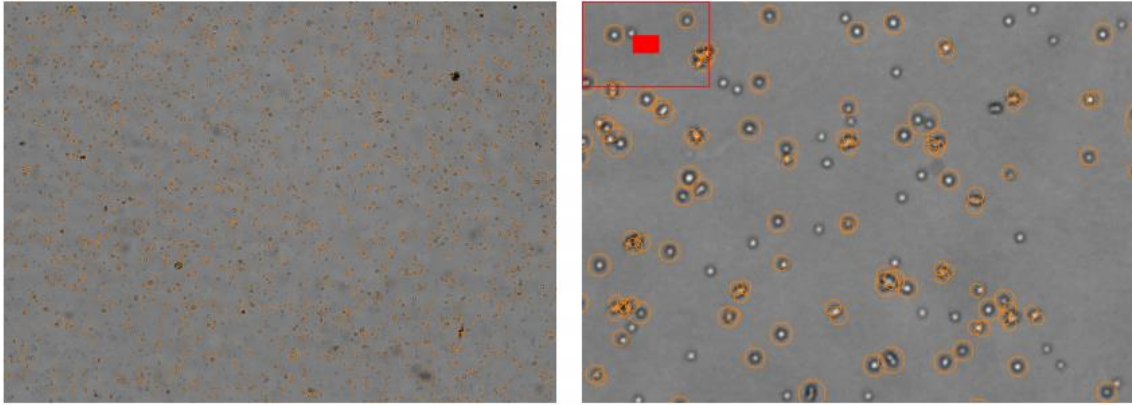


**Slika 12.** Shematski prikaz određivanja optičke gustoće kvasaca.

#### 3.2.4.2. Brojanje stanica na LUNA-FL<sup>TM</sup> Dual fluorescence cell counter

Uređaj LUNA-FL<sup>TM</sup> Dual fluorescence cell counter ima mogućnost četiri načina brojanja stanica. Opremljen je svjetlosnom (brightfield) i dvostrukom fluorescencijom što omogućuje otkrivanje različitih tipova stanica (isključujući bakterijske stanice).

Optimalno brojanje stanica za ovaj uređaj je kada je koncentracija stanica  $1*10^5$ . Iz hranjive podloge uzima se  $\sim 12$  µL kvasca te se prebroje na svjetlosnoj opciji. Ako je koncentracija stanice iznad  $1*10^5$ , uzorak se razrjeđuje s destiliranom vodom, te se razrijeđeni uzorak prebrojava na uređaju kako bi se dobio što točniji rezultat.



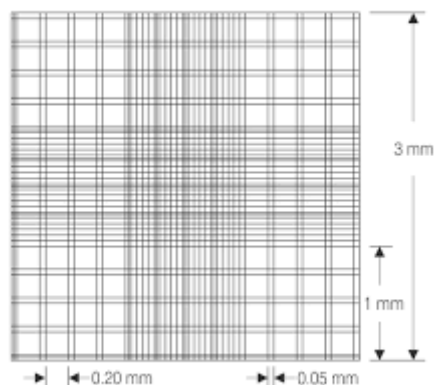
**Slika 13.** Prikaz prebrojanih stanica na LUNA-FLTM Dual fluorescence cell counter.

### 3.2.4.3. Brojanje stanica na svjetlosnom mikroskopu

Brojanje stanica kvasca na svjetlosnom mikroskopu izvodi se pomoću Bürker-Türk-ove komorice. Ona ima ugraviranu kvadratnu mrežu sa 16 velikih kvadrata, a svaki od velikih kvadrata ima 25 malih kvadrata. Brojanje stanica radi se na samom početku pokusa (dodatak kvasca iscrpini metala) te na kraju pokusa (nakon završetka inkubacije). 8  $\mu\text{L}$  uzorka stavi se na ploču komorice i poklopi pokrovnim stakalcem. Na svjetlosnom mikroskopu pod povećanjem 400x broje se minimalno 4 manja kvadrata, te se rezultat izrazi kao srednja vrijednost. Broj stanica u 1 mL hranjive podloge moguće je dobiti pomoću formule:

$$\frac{CFU}{mL} = 16 * \frac{nsr}{V} * rf$$

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

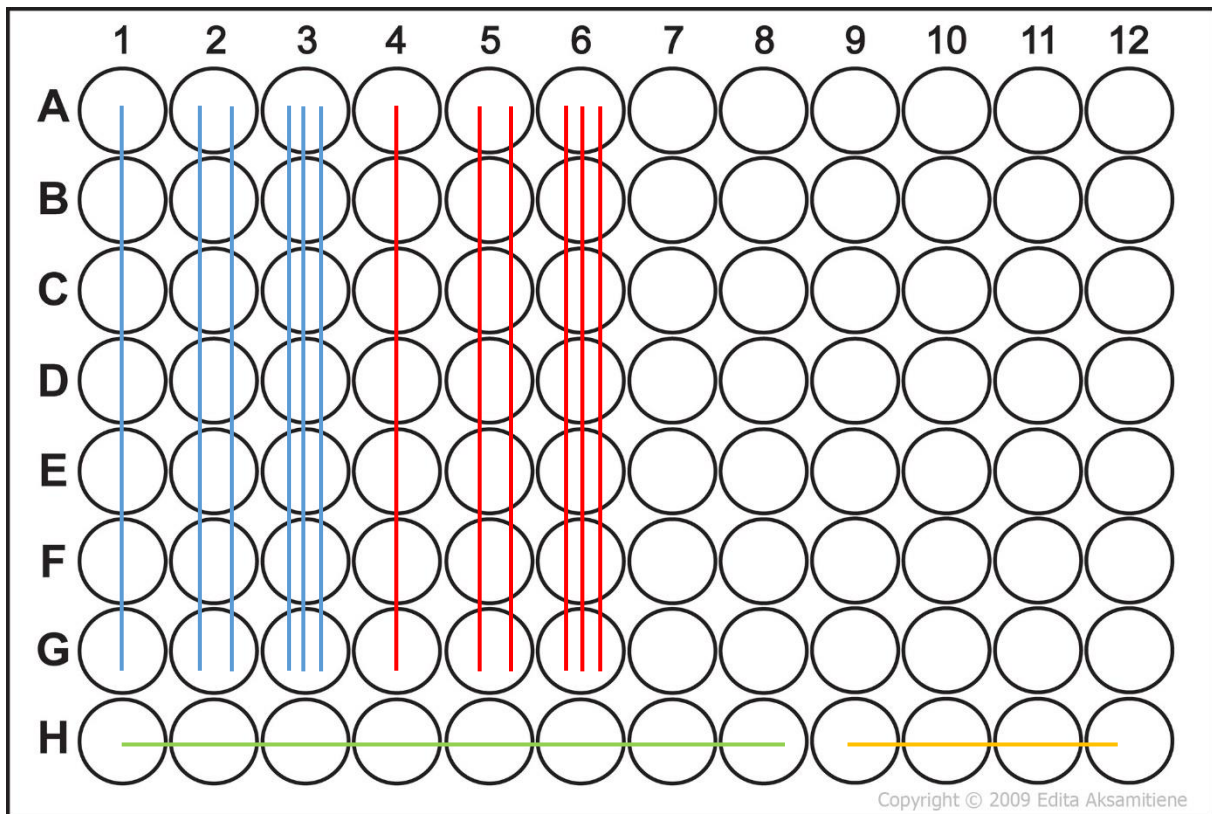


**Slika 14.** Bürker-Türk-ova komorica za brojanje stanica.

(<https://www.vitascientific.com/c-chip-disposable-hemocytometer-burker-turk-50-slides-100-samples>)

### 3.2.5. Određivanje krivulje rasta

Krivulja rasta određuje se podacima dobivenim na čitaču mikrotitarskih pločica. Potrebno je pripremiti mikrotitarsku pločicu u kojima će broj stanica u jažicama biti približno  $1 \cdot 10^5$ . za mikrotitarsku pločicu potrebno je napraviti protokol prema kojem će se, ovisno o tretmanu, popunjavati jažice. Kontrolu čine umjetna slina ili YPD hranjiva podloga s netretiranim stanicama kvasca, dok je slijepa proba samo umjetna slina ili YPD hranjiva podloga.



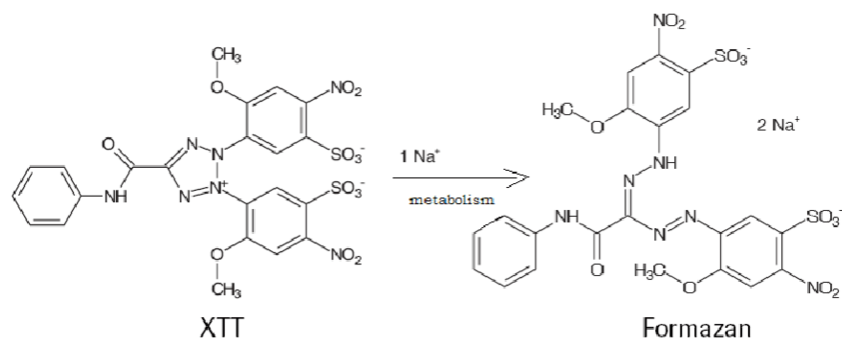
**Slika 15.** Shematski prikaz nasadijanja mikrotitarske pločice; plavo – stanice tretirane „rematitan“-om (1 – 3 dana, 2 – 7 dana, 3 – 14 dana), crveno – stanice tretirane „remanium“-om (4 – 3 dana, 5 – 7 dana, 6 – 14 dana), zeleno – kontrola, žuto – slijepa proba.

### 3.2.6. Određivanje metaboličke aktivnosti kvasca

#### 3.2.6.1. Određivanje stanične proliferacije (XTT test)

XTT test prvi je puta opisan i korišten 1988. godine te je opisan kao učinkovita metoda mjerenja rasta stanica i osjetljivosti na lijekove kod tumorskih stanica. Soli tetrazoliuma imaju široku i dugačku primjenu kao reagens za detekciju u histokemijskim istraživanjima i ispitivanjima biologije stanica. XTT je bezbojna ili pomalo žućkasta komponenta koja, kada se reducira, prelazi u izrazito narančasto obojenje. Ubraja se u drugu generaciju ovakvih boja te se može učinkovito koristiti u ispitivanjima stanične proliferacije, citotoksičnosti i ispitivanjima apoptoze. Smatra se kako XTT ne može ući u stanicu zbog negativnog naboja. Djelovanjem

mitohondrijskih enzima iz XTT-a nastaje formazan. Kako se mitohondrijski enzimi inaktiviraju vrlo brzo nakon smrti stanica, formazan nastaje isključivo u živim stanicama.



**Slika 16.** Prikaz redukcije XTT do formazana.

([https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-XTT-assay\\_fig1\\_279778205](https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-XTT-assay_fig1_279778205))

Za ovo ispitivanje korištene su mikrotitrarske pločice s 96 jažica (12x8) te su za postavljanje pokusa korišteni duplikati, triplikati ili tetraplikati iscrpine „rematitan“ i „remanium“ lukova na koje je nacijepljen kvasac (W303 i divlji tip), kontrolni uzorci (podloga i umjetna slina s nacijepljenim kvascima) i slijepa proba (bilo podloga ili umjetna slina). Prema protokolu proizvođača potrebno je napraviti razrjeđenje, tako da broj stanica bude  $1 \cdot 10^6$ . U svaku jažicu otpipetirano je 200  $\mu$ L podloge (sa ili bez iona metala + kvasac). Otopina aktiviranog XTT-a priprema se tako da se odmrzne alikvot XTT reagens i aktivacijskog reagensa na 37°C te se dodaje 0,1 mL aktivacijskog reagensa i 5,0 mL XTT reagensa što odgovara pokusu za 96 mikrotitrarskih jažica. U svaku jažicu potrebno je dodati 50  $\mu$ L otopine aktiviranog XTT-a. Nakon što je dodan reagens, prvo očitavanje je u nultom vremenu, što je realno izvedivo tek nakon 4 sata. Za mjerenje se koristi čitač mikrotitrarskih pločica Tecan na 450 nm.

Kod interpretacije rezultata slijedi se pravilo da ako su vrijednosti apsorbancije tretiranih stanica veće nego kod kontrole došlo je do porasta proliferacije stanica i vijabilnosti. Suprotno, ako su apsorbancije tretiranih stanica niže od apsorbancije kontrole, došlo je do smanjenja stanične proliferacije, a mogući uzrok je stanična nekroza ili apoptoza. Preporuka je da se stanice prouče i pod mikroskopom kako bi se potvrdili rezultati ispitivanja i uvidjelo ako je došlo do morfoloških promjena stanica.



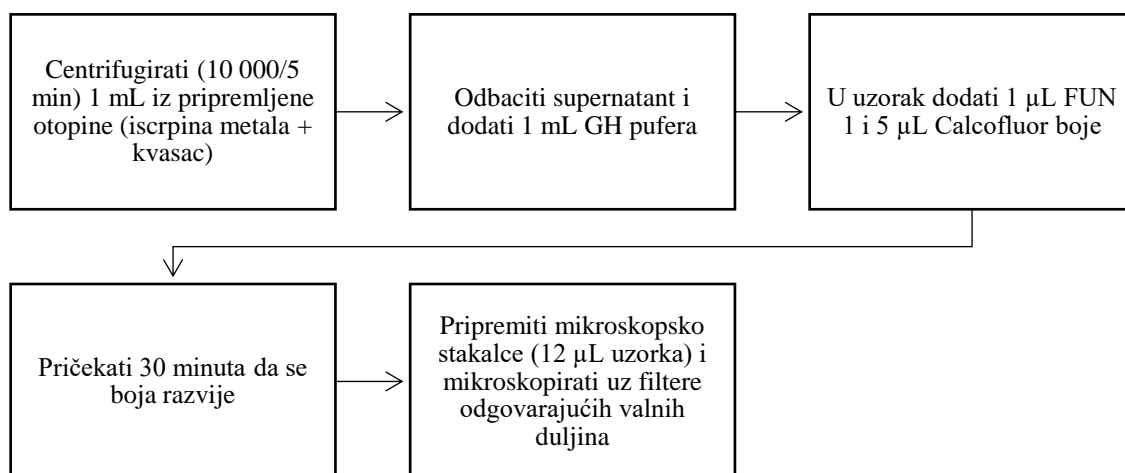
**Slika 17.** Prikaz mikrotitarske pločice pripremljene za pokus (strelicama označene jažice u koje je dodan XTT reagens).

### 3.2.6.2. Određivanje vitalnosti stanica kvasca

Vitalnost kvasaca određivana je pomoću Live/Dead Yeast Viability Kit-a prema uputama proizvođača. Korištene su dvije boje: FUN 1 i Calcofluor white. Calcofluor je zapravo fluorescentni reagens koji se može vezati na površinu stanica te boji hitin stanične stijenke plavom bojom. Zbog tog svojstva koristi se za obilježavanje stanične stijenke gljiva. FUN 1 boja može se koristiti zasebno ili u kombinaciji s Calcofluor-om kako bi se odredila metabolička aktivnost. Metabolički aktivne stanice pretvaraju FUN 1 boju iz difuzno raspoređene zelene mrlje u citoplazmi u crvenu cilindričnu intravakuolarnu strukturu (CIVS). Samo metabolički aktivne stanice tvore CIVS, dok mrtve stanice pod fluorescentnim mikroskopom pokazuju svijetlo zelenu fluorescenciju. Stanice s netaknutom membranom, ali sa smanjenom ili bez metaboličke aktivnosti prikazuju crvenu fluorescenciju različitu od zrnatih CIVS-a.

Brojane su stanice obojane: plavom bojom, plavom bojom s crvenim CIVS-om, zelenom i crvenom bojom. Prema prebrojanim stanicama dobiven je postotak mrtvih i živih stanica u

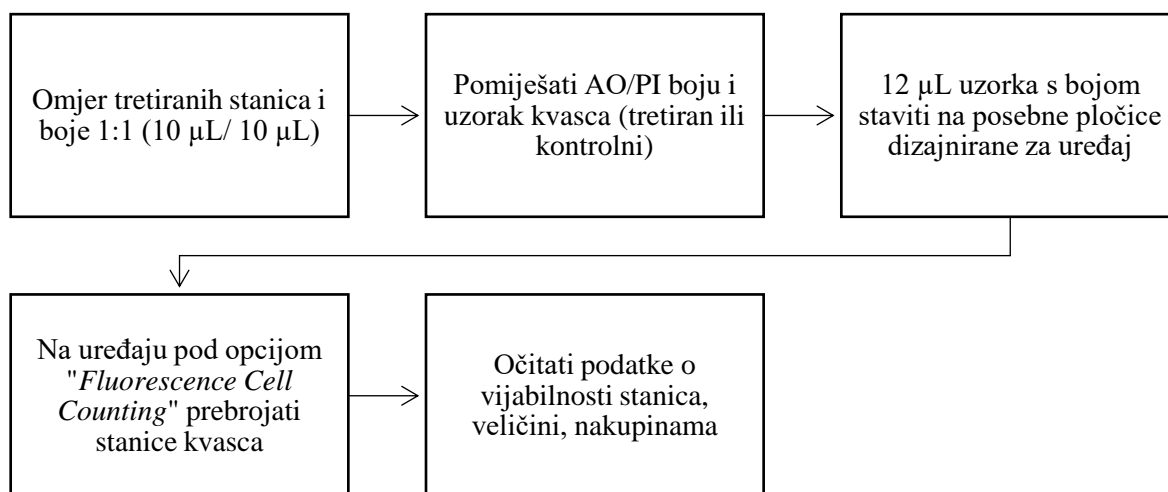
ukupnom broju stanica. Metoda koja koristi Live/Dead Yeast Viability Kit omogućava brzo, jednostavno i kvantitativno razlikovanje živih i mrtvih stanica.



**Slika 18.** Shematski prikaz mikroskopskog određivanja vitalnosti kvasca.

### 3.2.6.3. Određivanje vijabilnosti kvasaca

Vijabilnost kvasaca moguće je odrediti pomoću AO/PI fluorescentne boje (eng. *Acridine Orange/Propidium Iodide*). Ova boja koristi se za brojanje stanica na fluorescentnom polju na LUNA-FL™ uređaju. AO boja sve stanice zelenom fluorescencijom jer se veže za DNA i mrtvih i živih stanica. PI je isključivo propustan za mrtve stanice u kojima se također veže za DNA, ali apsorbira zelenu fluorescenciju te su mrtve stanice vidljive kao narančasto – crvene.

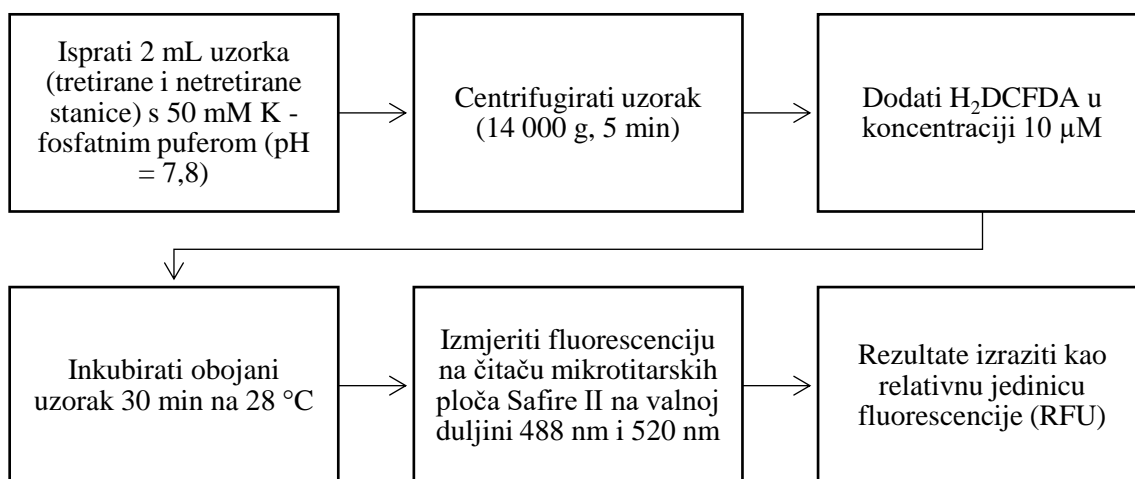


**Slika 19.** Shematski prikaz određivanja vijabilnosti kvasca na LUNA-FL™ uređaju.



### 3.2.7. Određivanje unutarstanične oksidacije

Unutarstanična oksidacija procijenjena je koristeći 2',7'-diklorofluorescein ( $H_2DCF$ ) prema postupku koji je razjašnjen kod Zakrajšek i sur. (43) Nefluorescentni  $H_2DCF$  u stanicu se unosi kao 2',7'-diklorofluorescein diacetat koji može lako prodrijeti u membranu plazme te se esterificira u stanici. U stanici se proizvede fluorescentni 2',7'-diklorofluorescein (DCF) kojeg je moguće odrediti fluorometrijski.

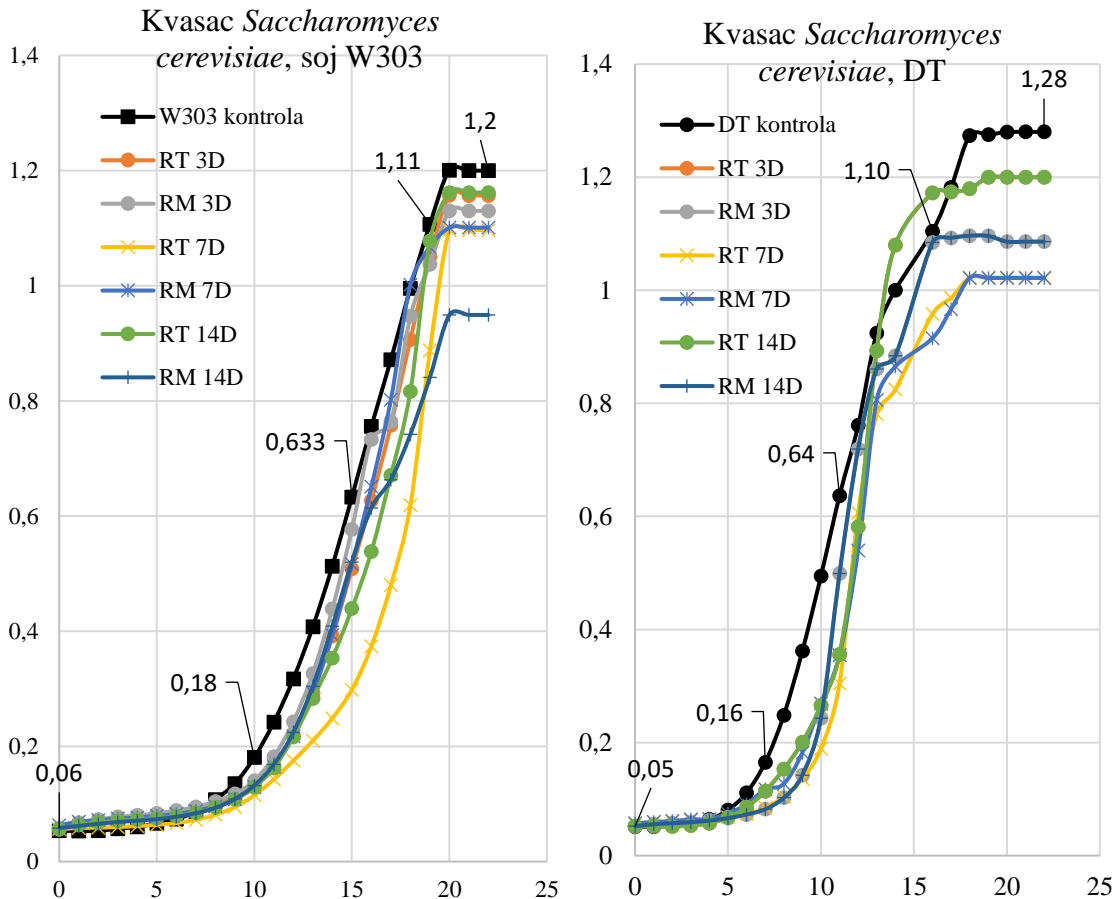


**Slika 20.** Shematski prikaz određivanja unutarstanične oksidacije.

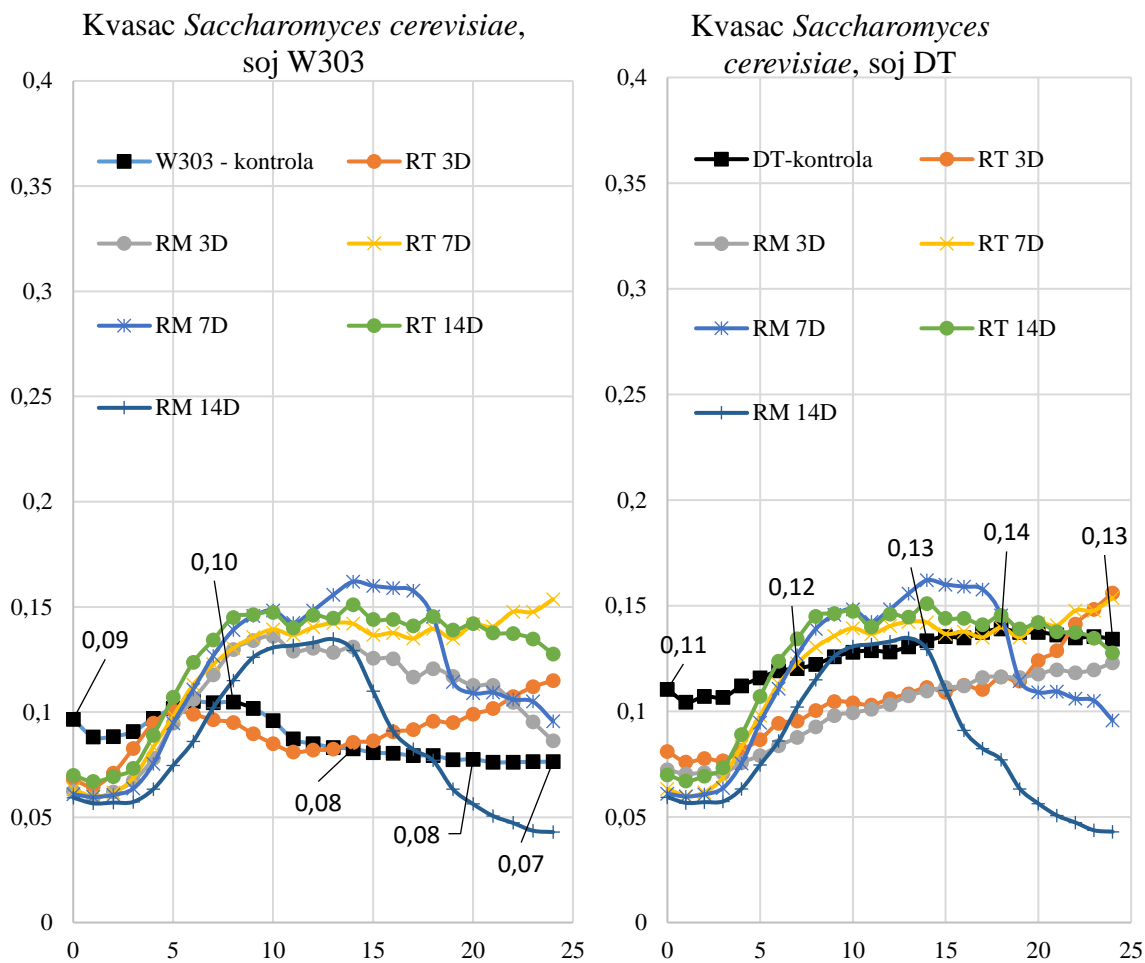
## 4. REZULTATI

### 4.1. Krivulje rasta stanica

Krivulje rasta određene su pomoću optičkog čitača mikrotitarskih pločica. Na slici 16. prikazan je rast tretiranih i netretiranih stanica na YPD hranjivoj podlozi, a na slici 17. Rast stanica u umjetnoj slini.



**Slika 21.** Krivulje rasta kvasca na YPD hranjivoj podlozi tretiranih s lukovima "rematitan"(RT) i "remanium"(RM) te kontrola (netretirane stanice). Tretmani dentalnim lukovima podijeljeni u skupine prema vremenskoj duljini izlaganja lukovima u mediju: 3 dana (3D), 7 dana (7D) i 14 dana (14D).

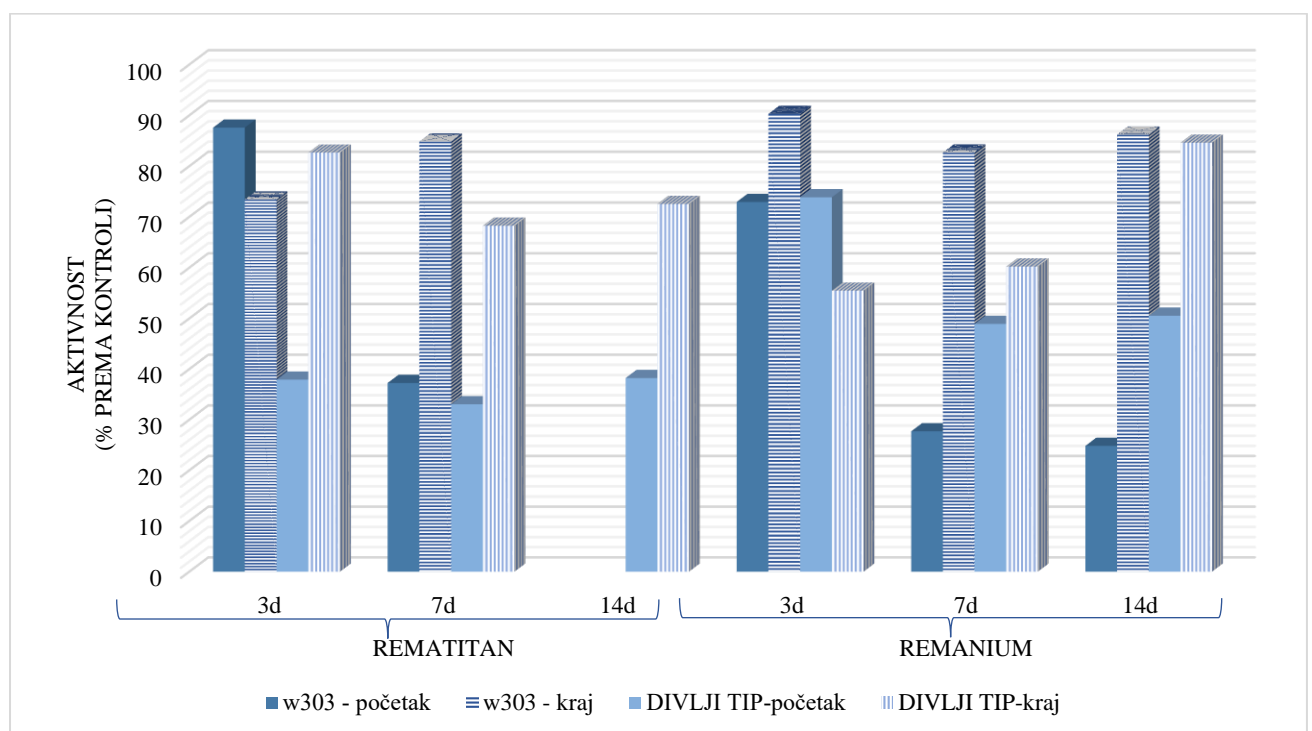


**Slika 22.** Krivulje rasta kvasca uzgajanih u umjetnoj slini i tretiranih s iscrpinama lukova "remitan" (RT) i "remanium" (RM) te kontrole (netretirane stanice obje vrste kvasaca). Tretmani dentalnim lukovima podijeljeni u skupine prema vremenskoj duljini izlaganja lukova u mediju: 3 dana (3D), 7 dana (7D) i 14 dana (14D).

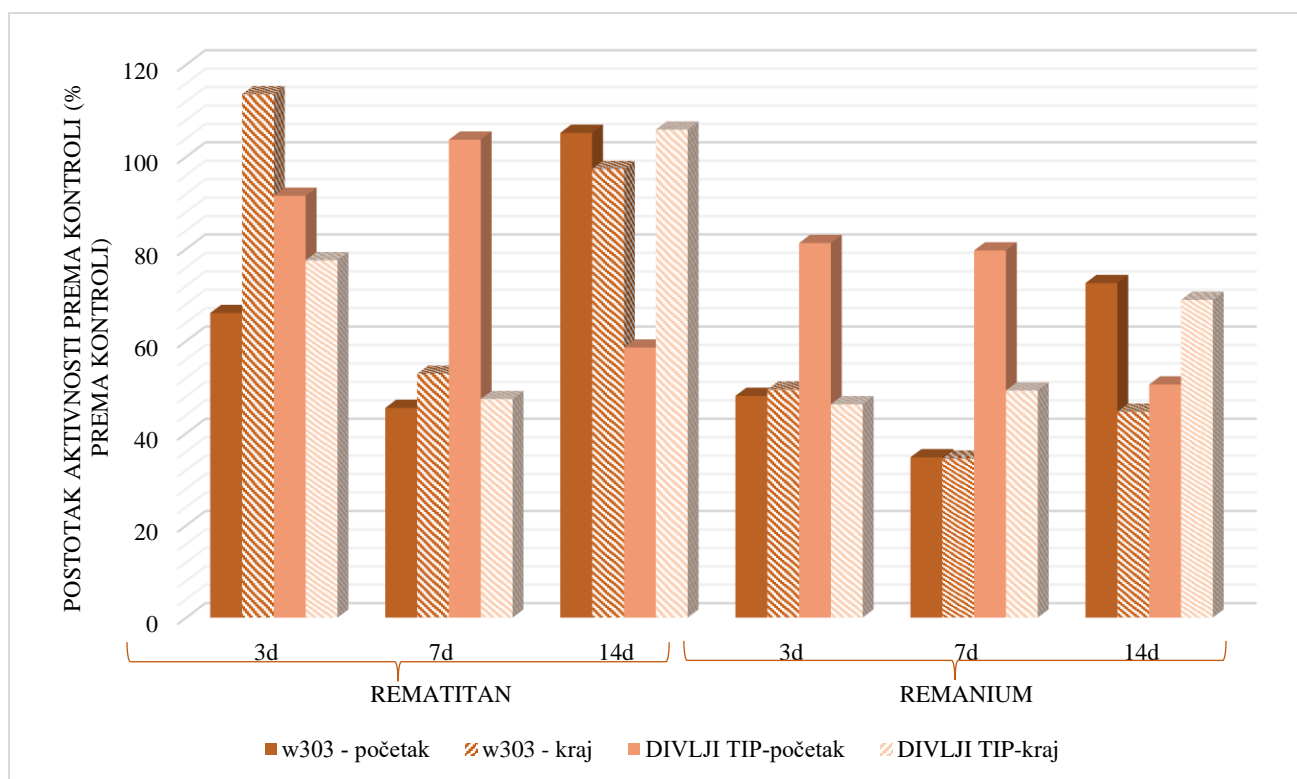
## 4.2. Određivanje metaboličke aktivnosti stanica

### 4.2.1. Određivanje stanične proliferacije

Stanična proliferacija određivana je XTT testom. XTT ulazi u stanicu uz pomoć PMS medijatora i reducira se do izrazito narančastog formazana te se apsorbancija razvijene boje mjeri ELISA optičkim čitačem. Kod izražavanja rezultata korištena je optička gustoća stanica te su rezultati izraženi prema kontroli (netretirane stanice). Na slikama 18. i 19. prikazani su rezultati XTT testa na samom početku reakcije i na kraju reakcije za *Saccharomyces cerevisiae* divljeg tipa i W303, izraženi postotkom prema kontroli. Stanična proliferacija određivana je u dva različita medija, stanice uzgajane na YPD hranjivoj podlozi i u umjetnoj slini.

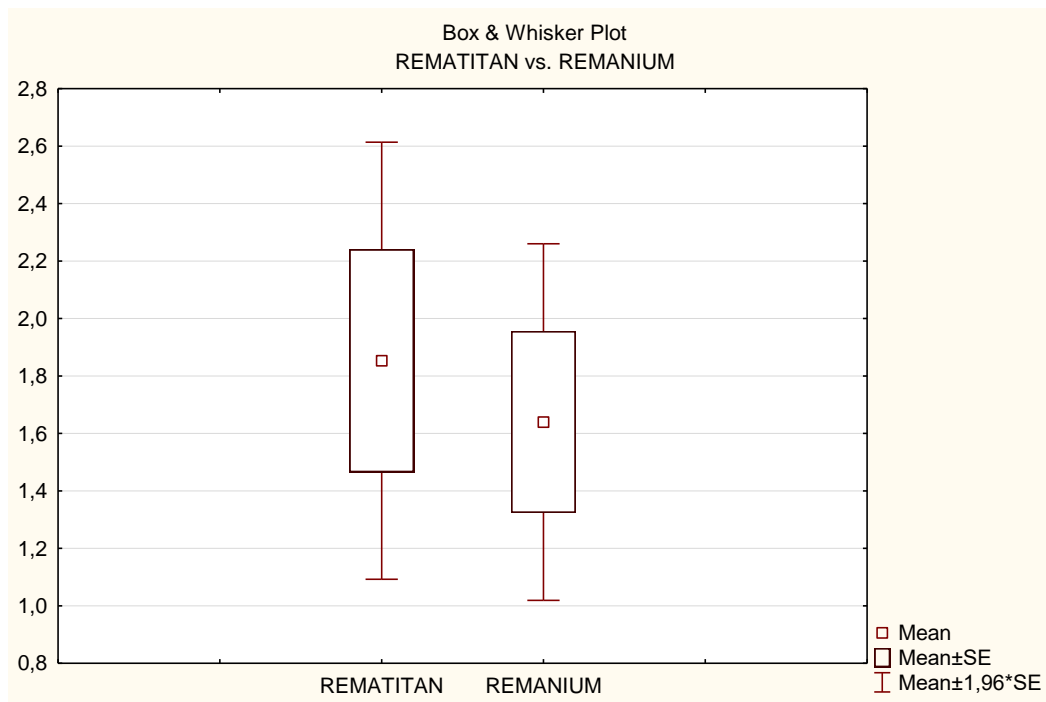


**Slika 23.** Grafički prikaz određivanja metaboličke aktivnosti pomoću XTT – testa na hranjivoj podlozi YPD za 2 vrste kvasca, na početku i na kraju rasta. Tretmani dentalnim lukovima podijeljeni u skupine prema vremenskoj duljini izlaganja lukova u mediju: 3 dana (3d), 7 dana (7d) i 14 dana (14d).



**Slika 24.** Grafički prikaz određivanja metaboličke aktivnosti pomoću XTT – testa u umjetnoj slini za 2 vrste kvasca, na početku i na kraju rasta. Tretmani dentalnim lukovima podijeljeni u skupine prema vremenskoj duljini izlaganja lukova u mediju: 3 dana (3d), 7 dana (7d) i 14 dana (14d).

Ispitano je i postoji li statistički značajna razlika između tretmana dvoma različitim dentalnim lukovima koji su otpuštali ione metala u medij 3 dana. Proveden je studentov t – test za nezavisne varijable te je utvrđeno da sveukupno ne postoji statistički značajna razlika učinka tretmana lukovima „remanium“ i „rematitan“ na metaboličku aktivnost kvasca.



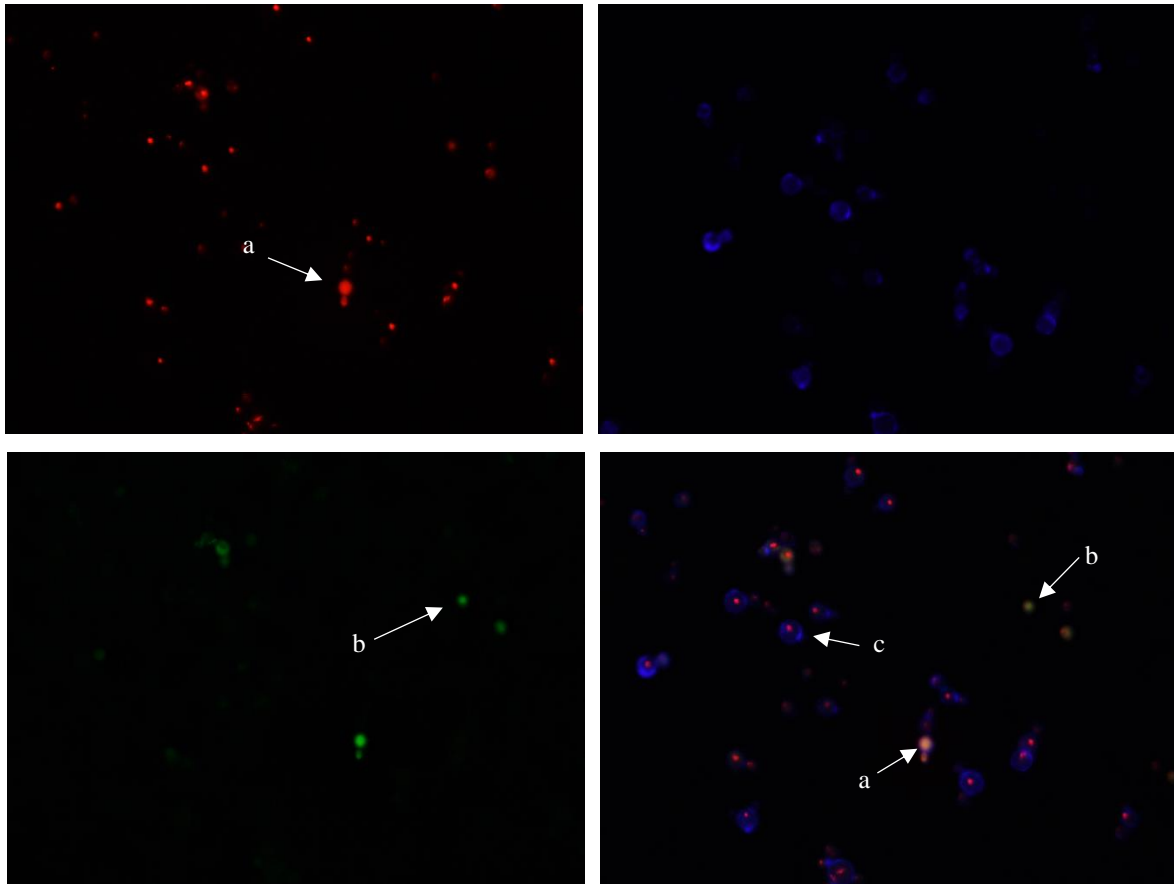
**Slika 25.** Grafički prikaz usporedbe tretmana lukovima "rematitan" i "remanium" na učinak metaboličke aktivnosti (kraj reakcije, 24 sata) kvasca *Saccharomyces cerevisiae* uzgajanog u YPD hranjivoj podlozi ( $p=0,67$ ).

#### 4.2.2. Određivanje vitalnosti kvasca

Vitalnost kvasaca određivana je mikroskopski uz pomoć „Live/Dead Yeast Viability kit“-a koji sadrži FUN-1 boju i Calcofluor white. Vrijednosti metaboličke aktivnosti prikazane su u Tablici 1., dok su stanice bojane FUN-1 i Calcofluor white bojom prikazane na slici 21.

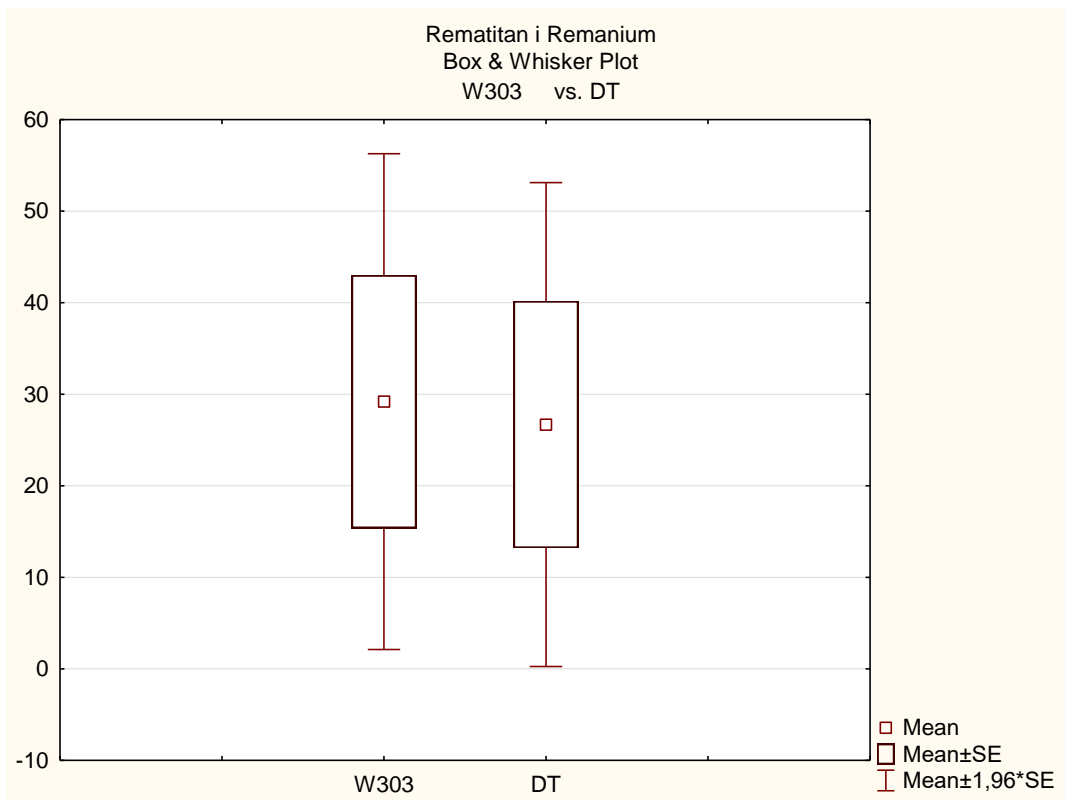
**Tablica 1.** Metabolička aktivnost stanica tretiranih s dentalnim lukovima “rematitan” i “remanium” mjerena fluorescentnim mikroskopom. Stanice su bojane dvjema bojama, FUN-1 i Calcofluor white. Stanice s poremećenom metaboličkom aktivnošću (stanice s neoštećenom membranom ali s malom ili čak nimalo metaboličke aktivnosti) daju intenzivnu crvenu fluorescenciju, a mrtve stanice daju zelenu fluorescenciju. Neoštećene, metabolički aktivne stanice su plavo obojane s crvenim tjelešcima (CIVS).

Tip žice	Vrsta stanica nakon bojanja FUN/Calcofluor white bojama	VRSTA KVASCA	
		W303	DIVLJI TIP
udjel stanica (%)			
REMATITAN	Metabolički aktivne stanice s CIVS (A)	71,87	62,03
	Metabolički poremećene stanice (B)	7,87	5,96
	Mrtve stanice (C)	5,96	5,46
REMANIUM	Metabolički aktivne stanice s CIVS (A)	73,78	75,88
	Metabolički poremećene stanice (B)	10,00	6,50
	Mrtve stanice (C)	5,67	4,34



**Slika 26.** Prikaz stanica pod fluorescentnim mikroskopom (P=400x) obojane FUN bojama nakon tretmana lukom „rematitan“; slovo **a** prikazuje žive stanice s poremećenom metaboličkom aktivnošću, **b** prikazuje mrtve stanice, **c** prikazuju žive stanice s crvenom cilindričnom intravakuolarnom strukturom (CIVS).

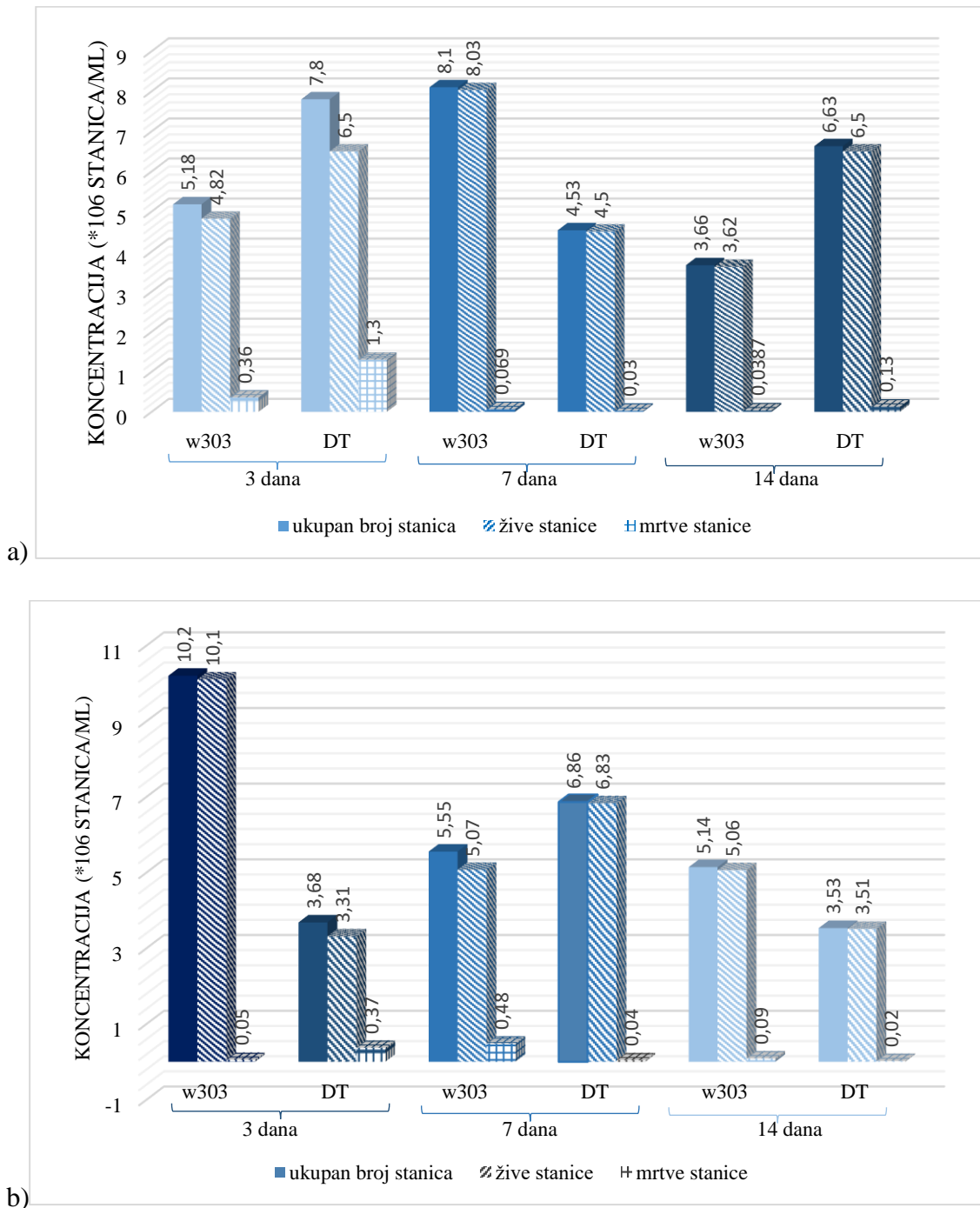




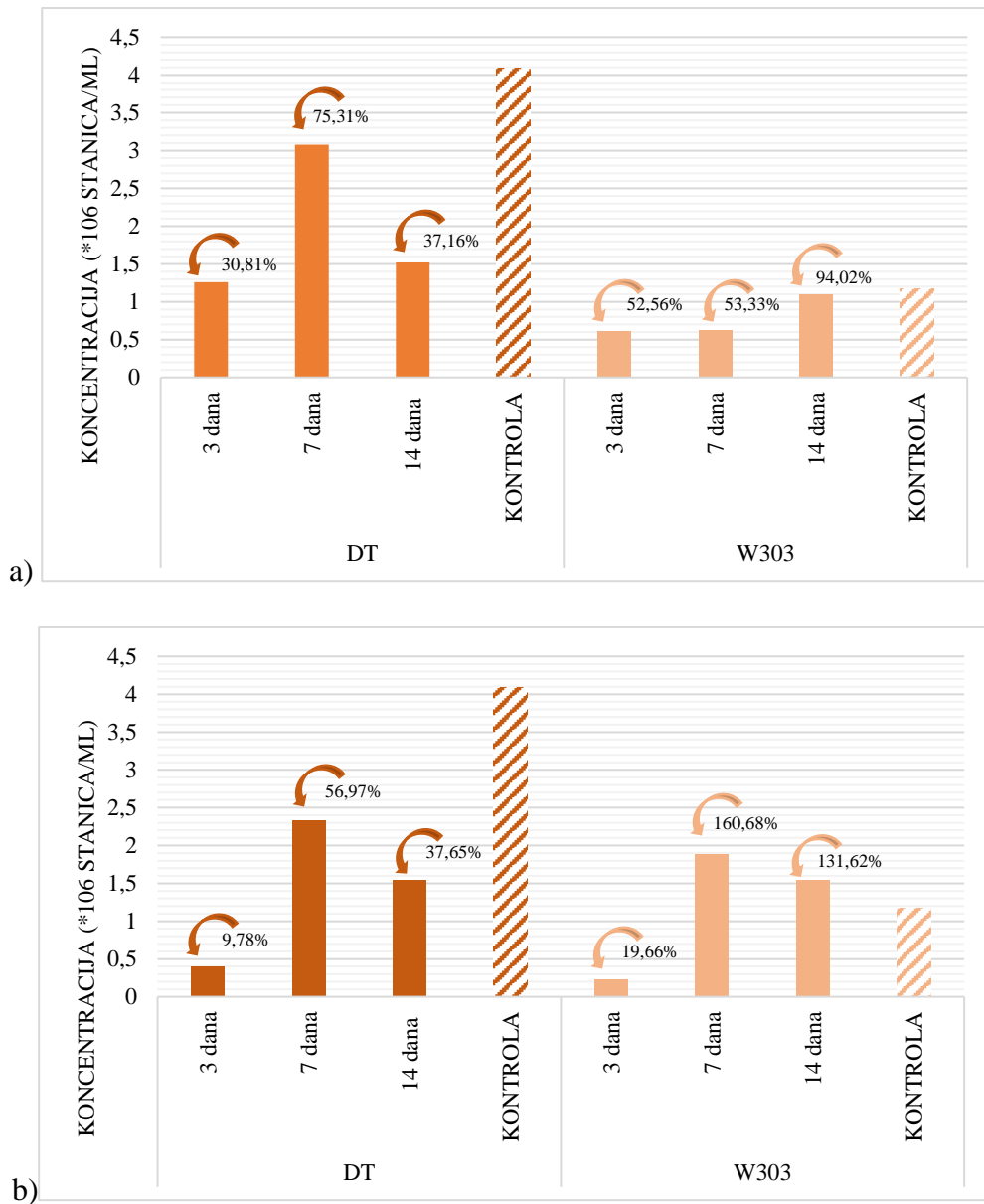
**Slika 27.** Grafički prikaz provjere statistički značajne razlike učinka dentalnih lukova "remanium" i "rematitan" ovisno o soju kvasca (W303 i Divlji soj - DT). Rezultati su obrađeni studentovim t - testom te je utvrđeno da nema statistički značajne razlike ( $p=0,89$ ).

#### 4.2.3. Određivanje vijabilnosti kvasca

Metabolička aktivnost kvasaca, odnosno njihova vijabilnost, praćena je pomoću AO/PI fluorescentne boje te su stanice brojane na LUNA-FL™ uređaju. Podacima koji se dobiju na uređaju moguće je izraziti razne zanimljive podatke kao što je broj ili koncentracija stanica, njihova prosječna veličina, formiranje stanica u samostalne, dvije, tri ili više njih spojenih u “klaster” ili nakupine.

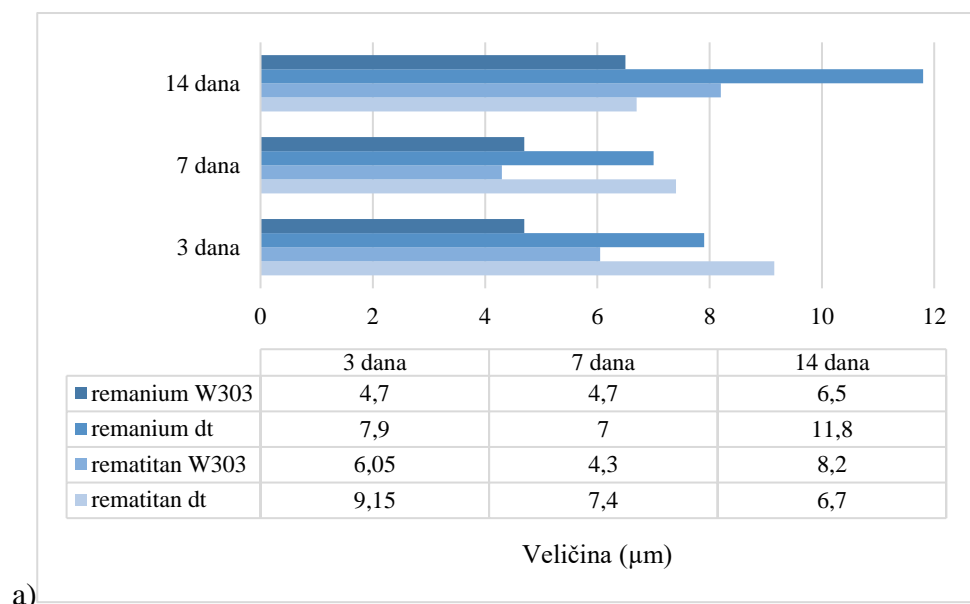


**Slika 28.** Grafički prikaz promjene koncentracije stanica (ukupan broj, žive i mrtve) uzgajane na YPD hranjivoj podlozi te tretirane: a) lukovima „rematitan“; b) lukovima „remanium“.

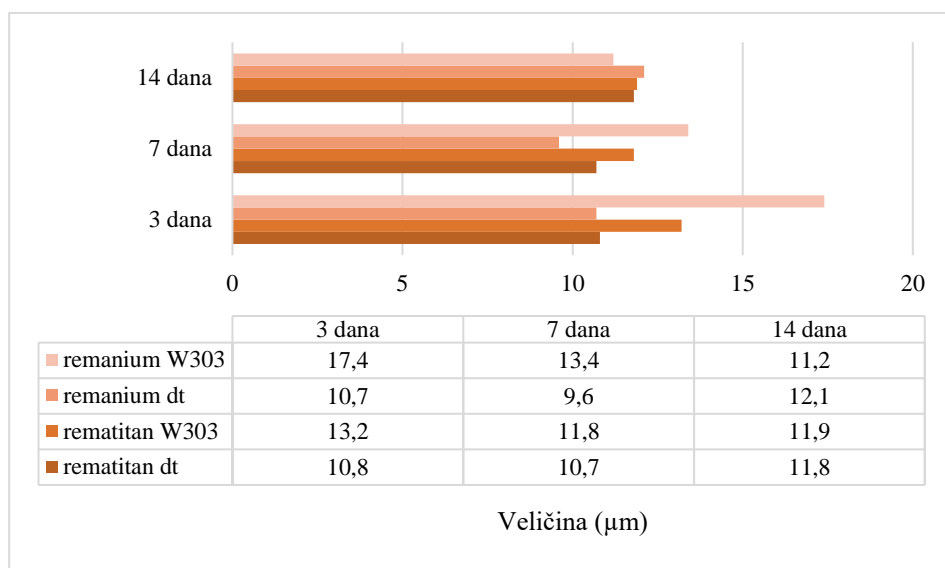


**Slika 29.** Grafički prikaz promjene ukupnog broja stanica uzgajanih u umjetnoj slini, izraženo postotkom prema kontroli.

a) stanice tretirane lukovima „rematitan“; b) stanice tretirane lukovima „remanium“.

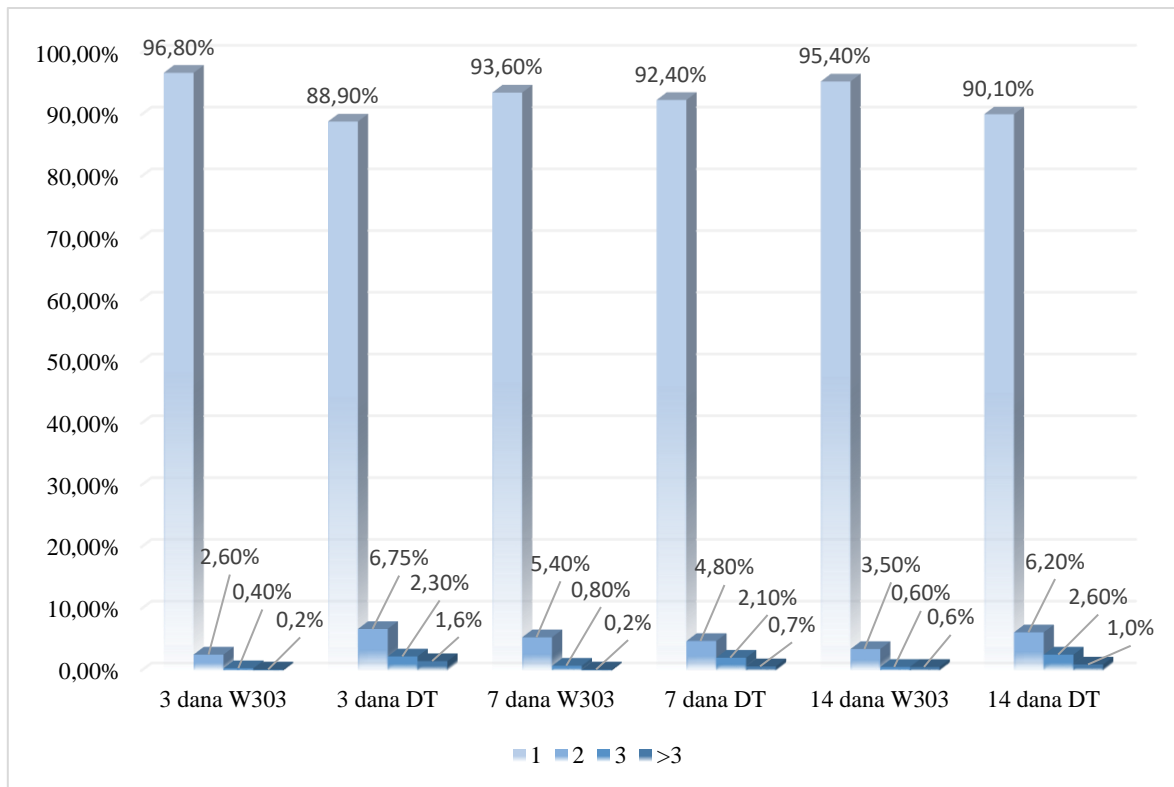


a)

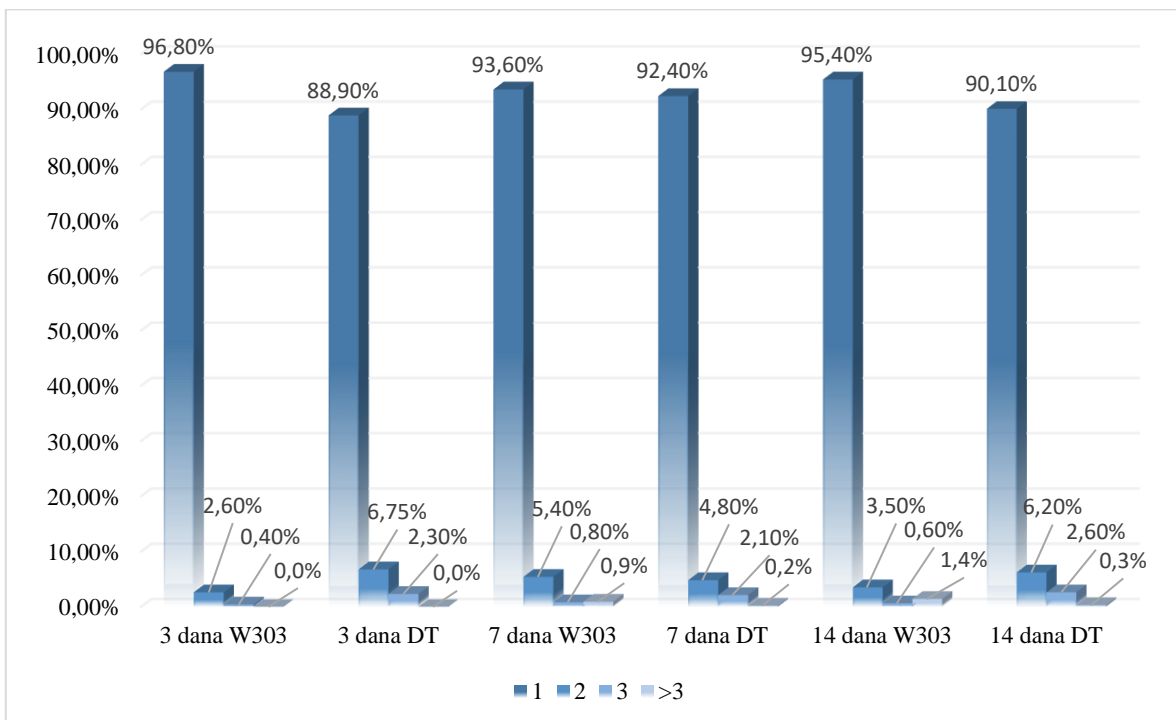


b)

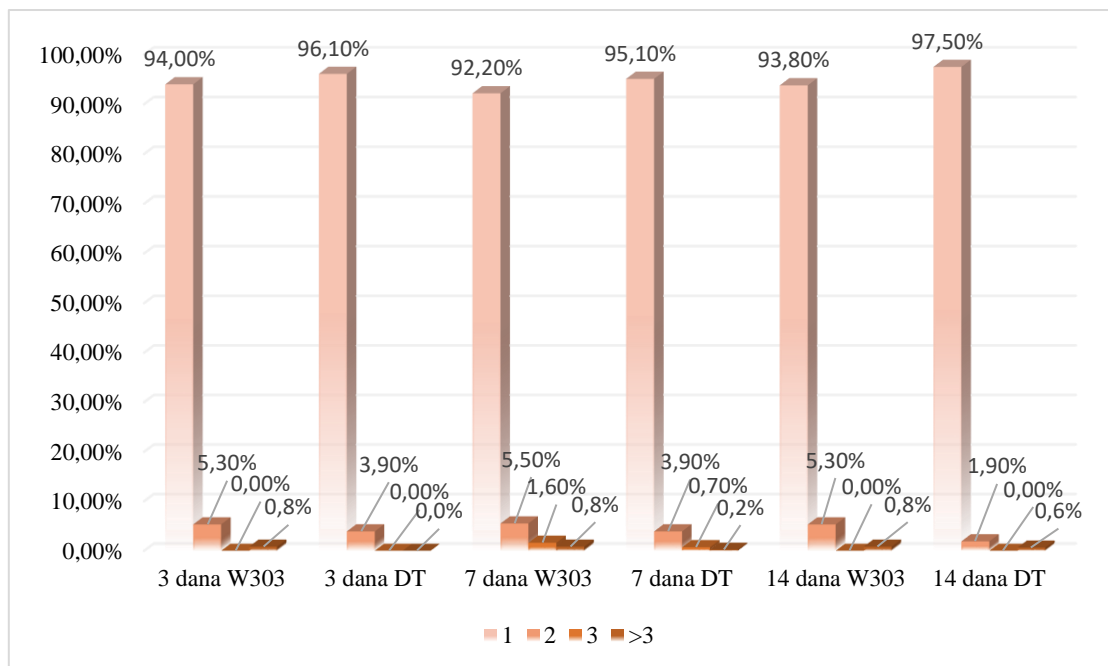
**Slika 30.** Prosječna veličina stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* divlji tip i W303 tretiranih iscrpinama lukova „remanium“ ili „rematitan“, uzgajanih na a) YPD hranjivoj podlozi, b) u umjetnoj slini.



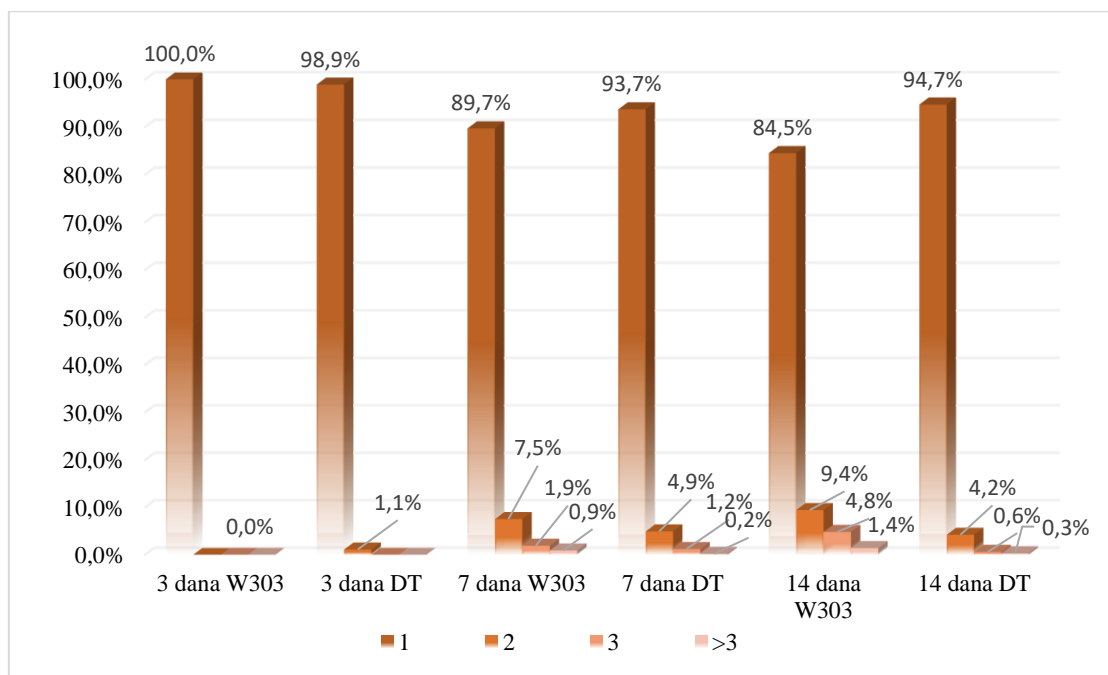
**Slika 31.** Grafički prikaz razlike formiranja stanica uzgajanih na YPD hranjivoj podlozi tijekom tretmana lukovima „rematitan“.



**Slika 32.** Grafički prikaz razlike formiranja stanica uzgajanih na YPD hranjivoj podlozi tijekom tretmana lukovima „remanium“.



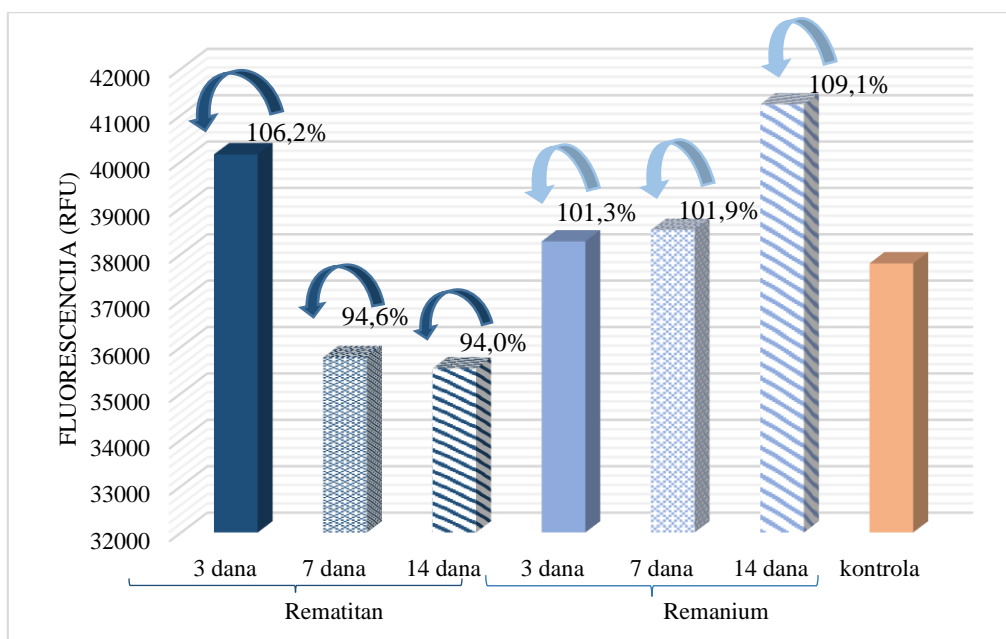
**Slika 33.** Grafički prikaz razlike formiranja stanica uzgajanih u umjetnoj slini tijekom tretmana lukovima „rematitan“.



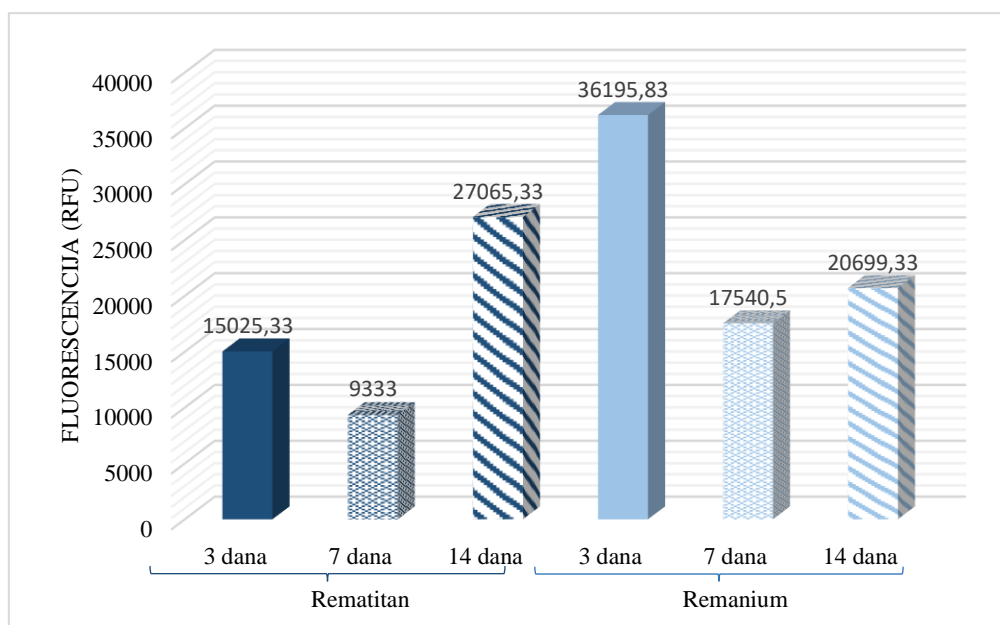
**Slika 34.** Grafički prikaz razlike formiranja stanica uzgajanih u umjetnoj slini tijekom tretmana lukovima „remanium“.

### 4.3. Određivanje unutarstanične oksidacije

Razine ROS-a dobivene mjerenjem fluorescencije prikazane su na slikama 24. i 25. Unutarstanična oksidacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 uspoređena je i s kontrolom (netretirane stanice) što je izraženo postotkom.



**Slika 35.** Prikaz unutarstanične oksidacije stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (W303) tretiranih lukovima „rematitan“ i „remanium“ uzgajanih na YPD-podlozi. Vrijednosti su izražene relativnom fluorescencijom (RFU). Prikazan je i postotak unutarstanične oksidacije obzirom na kontrolu (netretirane stanice).



**Slika 36.** Prikaz unutarstanične oksidacija stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (divlji tip) tretiranih lukovima „rematitan“ i „remanium“ uzgajanih na YPD-podlozi. Vrijednosti su izražene relativnom fluorescencijom (RFU).

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Krivulja rasta

Krivulja rasta mikroorganizama omogućuje nam uvid u broj stanica kroz određeni vremenski period. Sastoji se od 4 faze: log faza, eksponencijalna, stacionarna te faza smrti. Log faza ili faza odmaka početna je faza u kojoj su stanice mikroorganizama metabolički aktivne, ali se ne dijele za razliku od eksponencijalne faze u kojoj se eksponencijalno povećava broj stanica mikroorganizama. Stacionarna faza na krivulji rasta dobiva oblik platoa jer je broj živućih i umirućih stanica podjednak, odnosno ne mijenja im se broj jer se više intenzivno ne dijele. U određenom trenutku broj umirućih stanica prevlada broj živih stanice te dolazi do pada krivulje i nastupa posljednja faza, faza smrti. (32)

Već pri prvom pogledu na krivulje rasta stanica, uzgajanih na YPD podlozi i u umjetnoj slini, vidljiva je velika razlika (Slike 21 i 22). Stanice uzgajane u umjetnoj slini imaju znatno manji porast, zbog nedostatka glukoze ili bilo kojeg izvora energije koja im je prijeko potrebna za rast. Broach (2012.) navodi kako dostupnost hranjivih tvari kao što su šećer, aminokiseline i ostali dušikovi spojevi uvjetuju kako će kvasac rasti te kako će se razvijati. Hranjive tvari su poput goriva za proces rasta stanica, a taj proces prvenstveno ovisi o biosintetskom kapacitetu ribosoma. (44) Kod uzgajanja kvasca u medijima sa slabim izvorom ugljika bitno je miješanje pri 250 rpm (primijećen smanjen rast pri manjim okretajima u minuti zbog aerobnim uvjeta). (45) Još uvijek je nepoznato kako se *Saccharomyces cerevisiae* nosi s ionima metala na molekularnoj razini. Poznato je da određeni proteini štite stanicu od metalne toksičnosti, ali nije poznat točan mehanizam zaštite. Isto tako, nepoznato je mijenja li se „odgovor“ kvasaca ovisno o akutnoj ili kroničnoj izloženosti ionima metala. (46)

Krivulja rasta kvasca koji je uzgajan na YPD hranjivoj podlozi pravilnog je oblika te su vidljive prve tri faze (stanice nisu dospjele do faze smrti unutar 24 sata). Kod oba soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (W303 i divlji soj) kontrolne stanice (netretirane stanice) pokazuju veći porast u odnosu na stanice tretirane lukovima „remanium“ i „rematitan“ (Slika 21.). Vidljivo je da je, bez obzira što su se u podlogu otpustili ioni metala iz lukova koji mogu potencijalno biti štetni i utjecati na rast kvasaca, YPD hranjiva podloga pogodna za rast i razmnožavanje kvasaca. Drugačiji slučaj je kod kvasaca koji su uzgajani u umjetnoj slini (Slika 22.). U ovakvom mediju ne postoje hranjive tvari koje mikroorganizmi mogu koristiti u svojoj metaboličkoj aktivnosti te je stoga i krivulja rasta znatno različita u odnosu na prethodno objašnjenu. Krivulje rasta i za W303 i za divlji soj nisu karakterističnog oblika, faze rasta ne postoje. Porast broja stanica je toliko malen da je zanemariv. Vrsta podloge može utjecati na



porast kvasca, ali i na otpuštanje iona iz lukova. Umjetna slina ima nešto niži pH (4,8) od YPD podloge (5,5) što može potaknuti stvaranje korozije, a samim time i pojačati otpuštanje iona metala u podlogu. Barcelos i sur. utvrdili su kako pojavnost korozije na ortodontskim legurama ovisi o pH sline, vremenu izloženosti i koncentraciji F<sup>-</sup> iona. Kritična točka za nikal – titanij legure bio je pH = 3,0. (47) Uspoređujući krivulje rasta kontrolne skupine kvasaca oba soja na umjetnoj slini može se primijetiti razlika u obliku krivulja, te veća osjetljivost kvasca W303.

## 5.2. Određivanje metaboličke aktivnosti

### 5.2.1. Stanična proliferacija

Stanična proliferacija jest umnožavanje stanica, odnosno uzastopno stvaranje novih stanica. XTT testom mjeri se proliferacija stanica temeljena na njihovoj metaboličkoj aktivnosti. Praćenjem stanične proliferacije kod kvasca tretiranog dentalnim lukovima „rematitan“ i „remanium“ dobije se uvid djeluju li ioni otpušteni iz ovih lukova na ukupan broj metabolički aktivnih stanica.

Generalno, promjena medija (YPD-podloga vs. umjetna slina) ima utjecaja na odgovor stanica obaju kvasaca na tretman metalnim ionima jer stanice pokazuju različit odgovor, odnosno jako različite udjele stanica prema kontroli. Na YPD podlozi (Slika 23.), kod većine ispitivanih iscrpina stanice pokazuju veću metaboličku aktivnost na kraju reakcije, što je i očekivano. Naime, na početku reakcije, kad stanice preslaguju resurse i nastoje započeti s diobom, povećane količine iona u podlozi predstavljaju im dodatni metabolički problem, jer im se ne smije dozvoliti ulaz u stanice, odnosno, ako su metalni ioni već ušli u stanice, trebalo bi ih se iz stanica efikasno ukloniti.

Na kraju reakcije, ti su svi metabolički zahtjevni zadaci odrađeni, a izmjereni udjeli metabolički aktivnih stanica, pokazuju koliko su uspješne stanice bile.

Prema slici 23. vidljivo je kako je najveći broj stanica u oba tretmana kod kvasca koji je uzgajan u iscrpinama od 3 dana, izuzev divljeg soja tretiranog lukovima „remanium“ čiji broj stanica raste od 3 dana do 14 dana gdje je najveći. Divlji soj otporniji je na različite vanjske čimbenike, pa tako i ione metala, te je moguće da se te stanice prilagode na drugačiji medij i da kvasac počne koristiti ione u korist svog metabolizma. Soj W303 je kao histidinski auktrotrofni mutant osjetljiviji na prisutnost metalnih iona u podlozi (Pearce i Sherman, 1999.) (48), što je i vidljivo ako se kod tretmana lukovima „remanium“ usporede početne vrijednosti za W303 i divlji soj.

Tretiranje i uzgajanje kvasaca na umjetnoj slini pokazao je zanimljiv rezultat (Slika 24.). U početku reakcije kod iscrpina od 3 dana stanična proliferacija je niska i niža je nego na kraju pokusa što je i očekivano. No, kod tretiranja u iscrpinama od 14 dana, stanična proliferacija niža je na kraju reakcije nego na početku, što ukazuje da moguća veća koncentracija iona metala ipak utječe na umnožavanje stanica kvasca i to negativno. Izuzetak je ponovo divlji tip kod kojega stanična proliferacija raste s povećanjem dana izloženosti. Wysocki i sur. navode kako su toksični metali i metaloidi sveprisutni u prirodi i mogu se pojavljivati u visokim koncentracijama. Kako bi organizmi osigurali staničnu zaštitu i preživljavanje u određenim uvjetima, svi organizmi posjeduju mehanizme izbjegavanja toksičnosti i postizanja tolerancije. (46) Prema ovakvom razmišljanju, moguće je da divlji soj u ovom istraživanju razvije određenu vrstu tolerancije te time uspijeva povećavati svoju proliferaciju uz pojačavanje tretmana.

U oba slučaja, stanice uzgajane na YPD hranjivoj podlozi i u umjetnoj slini, tretman lukovima „remanium“ pokazao je veću inhibiciju rasta i razmnožavanja stanica nego tretman lukovima „rematitan“. Čini se kako postoji razlika između lukova, ali dodatnim statističkim testovima (t – test) utvrđeno je kako zapravo ne postoji statistički značajna razlika između tretmana lukovima „remanium“ i „rematitan“ na razini značajnosti 95% (Slika 25.) Špalj i sur. (2011.) svojim istraživanjem utvrdili su kako je najveća inhibicija kod nikal – titanij legura (u ovom slučaju „rematitan“), dok im je najniža inhibicija kod nehrđajućeg čelika i titanij – molibden legura. (49)

XTT test povezan je s mitohondrijskom aktivnošću, odnosno respiracijom budući da se reagens u mitohondrijima reducira u formazan. Stoga je moguće povezati smanjen porast u broju stanica nakon tretmana ionima metala s poremećenom mitohondrijskom respiracijom. Kako navode Ahmadzadeh i sur. (1996.), mitohondrijska je respiracija regulirana količinom glukoze u podlozi. Glukoza inhibira respiraciju tako što potiskuje određene enzime u respiratornom lancu. Za neke je metale, kao što je aluminij (u formi aluminijeva hidroksida) utvrđeno da su u mogućnosti inhibirati zatvaranje VDCA (*eng.* voltage-dependent anion channel), što je primarni put ulaska i izlaska metabolita kroz membranu. (50) Može se naslutiti da bi još neki metalni ioni mogli imati jednako djelovanje, poput ioni metala otpuštenih u tretmanima, koji ako stvore metalne okside, mogli bi isto tako ugroziti mitohondrijsku respiraciju i inhibirati zatvaranje VDCA.

### 5.2.2. Vitalnost kvasca

Vitalnost stanica određivana je fluorescentnim mikroskopom, stanice su bojane bojama iz „Live/Dead Yeast Viability kit“-a (FUN – 1 i Calcofluor white) te su brojane stanice koje su

zelene i crvene fluorescencije i pod plavim svjetlom vidljive, plave stanice. Plavo se boje sve stanice i žive i mrtve te je taj izbrojani broj ukupan broj stanica. Žive stanice s normalnom metaboličkom aktivnošću na preklopljenoj slici vidljive su kao plave stanice s crvenom intravakuolarnom strukturom (CIVS), stanice s poremećenom metaboličkom aktivnošću kao narančasto – crvene stanice te mrtve stanice kao zelene (Slika 26). Da bi se FUN-1 uklonio iz citosola kvasca, potrebne su određene biokemijske modifikacije boje. Tijekom modifikacija sa reduciranim glutationom nastaju glutation – konjugati. CIVS stanice mogu nastati i u nedostatku enzima. Prema tome, inhibicija stvaranja CIVS stanica uzrokovana nedostatkom ATP-a ne mora se isključivo pripisati inhibiciji stvaranja konjugata, već je moguće da stanica nije u mogućnosti transportirati konjugate boje FUN-1 u vakuole. (51)

U Tablici 1 prikazani su postoci svih stanica po kategorijama za oba soja kvasca. Kod tretmana dentalnim lukom „rematitan“ zabilježen je manji postotak metabolički poremećenih stanica kod divljeg soja (5,96%) nego kod W303 (7,87%), dok je broj mrtvih stanica podjednak (divlji soj – 5,46%; W303 – 5,96%). Metabolički aktivne stanice sa stvorenom CIVS strukturom u visokom su postotku kod oba soja, ali i kod obje vrste tretmana. Tretman lukom „remanium“ pokazao je sličan učinak kao i „rematitan“. Premda se za divlji soj pretpostavlja da je otporniji na vanjske čimbenike od W303, učinak tretmana lukovima ispitan ovim testom nije pokazao statistički značajnu razliku u učinku na sojeve ( $p=0,89$ ) što je i prikazano na Slici 27. U nešto detaljnijem istraživanju koje su proveli Kovač i sur. (2020.) s više različitih tipova otopina/smjesa metalnih iona po sastavu sličnih dentalnim legurama, utvrdili su da je legura titanij – molibden imala utjecaj na metaboličku aktivnost kvasca tako što je ona smanjena, a smanjivanje metaboličke aktivnosti bilo je proporcionalno povećanju koncentracije iona titanija i molibdena u otopini. (52)

### 5.2.3. Vijabilnost kvasca

Vijabilnost je jedan od oblika praćenja metaboličke aktivnosti stanica. Određivanjem vijabilnosti dobije se informacija o udjelu živih i mrtvih stanica. Međutim, toksični učinci kemijskih ili fizikalnih faktora ne moraju nužno rezultirati smrću stanice. Njihova toksičnost može rezultirati različitim morfološkim, unutarstaničnim ili metaboličkim promjenama što može uzrokovati npr. nemogućnost diobe stanice dok će stanica i dalje biti živa. (53) U ovom istraživanju praćena je tako što su stanice bojane AO/PI bojom. Razliku između mrtvih i živih stanica čini propidium jodid koji je propustan samo za mrtve stanice kvasca te u njima apsorbira zelenu fluorescenciju i one su vidljive kao crvene stanice. Pomoću LUNA-FL<sup>TM</sup> uređaja prebrojane su stanice i izraženi su rezultati. Tretmani lukovima „remanium“ i „rematitan“ na

kvascima koji su uzgajani na YPD hranjivoj podlozi nisu pokazali štetan učinak na kvasce (Slika 28.). Vrlo su niske koncentracije mrtvih stanice u oba slučaja, što bi značilo da ioni metala koji se otpuštaju iz dentalnih lukova ne djeluju toksično na stanice kvasca. Divlji soj kvasca uzgajan u umjetnoj slini i tretiran lukovima manje je porastao naspram kontrole, za razliku od soja W303 koji je kod tretmana sedam dana „remanium“ – om porastao ~160% uspoređujući s kontrolom (Slika 29.). Također, moguće je primijetiti kako je koncentracija stanica oba soja te kod oba tretmana najmanja kod iscrpina u kojima su lukovi otpuštali ione 3 dana.

Skoro svi fiksni ortodontski aparati načinjeni su od metalnih legura, među kojima su najčešće nehrđajući čelik, nikal – titanij,  $\beta$  – titanij i kobalt – krom legure. Ortodontski aparati napravljeni od prethodno navedenih legura otpuštaju ione metala kroz vrijeme. Koncentracija otpuštenih iona ovisi o vrsti legure, okruženju i vremenu izloženosti. Iako ioni metala nisu biorazgradivi, oni se mogu akumulirati u tkivu i potencijalno imati citotoksičan učinak. U istraživanjima koja koriste kvasce kao modelni organizam pokazano je da ioni metala otpušteni iz dentalnih legura mogu imati utjecaj na metaboličku aktivnost kvasca i na njihov rast i razmnožavanje. (52)

Stanice kvasca divljeg soja kod netretiranih kvasaca veće su nego kod soja W303. Primijećeno je da tretmanom lukovima dolazi do mijenjanja prosječne veličine stanice te ponekad i oblika stanice (Slika 30). Stanice uzgajane na hranjivoj podlozi najveće su kod tretmana gdje su lukovi otpuštali ione u medij 14 dana (npr. divlji soj kvasca tretiran „remanium“ – om prosječno je promjera 11,8  $\mu\text{m}$ ). Suprotna situacija je kod stanica uzgajanih u umjetnoj slini. Najveće prosječne veličine stanica dobivene su za soj W303 koji je tretiran „remanium“ – om (3 dana izlučivanja iona).

Stanice kvasca često rastu u nakupinama (dvije ili više stanica). Uređajem LUNA-FL™ moguće je odrediti i koliko se kojim tretmanom povećava ili smanjuje rast u nakupinama. Očekivano prevladava pojedinačni rast, npr. kod tretmana iscrpinama lukova „remanium“ u umjetnoj slini 100% je pojedinačnih stanica (Slika 34.). Izuzetak su stanice uzgajane u umjetnoj slini gdje su se iz lukova „remanium“ ioni otpuštali 14 dana te je postotak pojedinačnih stanica samo 84,50%, a dvije spojene stanice čak 9,40% (Slika 34.). Stanice uzgajane na hranjivoj podlozi više stvaraju nakupine u rastu nego stanice uzgajane u umjetnoj slini (Slike 31-34.). Ovakav je rezultat očekivan – u umjetnoj slini, kao mediju bez izvora ugljika, dušika, mineralnih tvari..., stanica kvasca samo preživljava i gotovo da se ne dijeli; prevladavaju samostalne stanice. U mediju koji sadrži sve potrebno za rast, stanice će se nakon početnog

„restrukturiranja“ nastojati dijeliti. Alugoju i sur. (2021.) tvrde da se stanice koje formiraju nakupine (dviije ili više stanica) lakše izbore s oksidativnim stresom, odnosno manje podliježu oštećenjima uzrokovanim oksidativnim stresom za razliku od stanica koje rastu pojedinačno. Međutim, stanice koje su u nakupinama i izbjegnu oštećenja od oksidativnog stresa imaju manji porast broja. (54)

### 5.3. Određivanje unutarstanične oksidacije

Metabolička aktivnost kvasca usko je povezana sa stvaranjem reaktivnih spojeva kisika te je unutarstanična oksidacija dobar pokazatelj utječu li ioni metala iz dentalnih lukova na metaboličku aktivnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. (55) Unutarstanična oksidacija mjerena je stanicama kvasca koji su rasli na podlozi s iscrpinama do rane stacionarne faze (oko 20 h). Najviša stanična oksidacija za soj W303 izmjerena je kod tretmana lukovima „remanium“ kod iscrpina od 14 dana (109,1% uspoređujući s kontrolom). Tretman lukovima „remanium“ za 7 i 14 dana pokazao je manju unutarstaničnu oksidaciju nego kod kontrole (Slika 35.). Divlji soj kvasca imao je najveću unutarstaničnu oksidaciju kod tretmana lukovima „remanium“ od 3 dana (Slika 36.). Uspoređujući oba soja kvasca, možemo zaključiti kako je tretman „remanium“ – om izazvao veću proizvodnju slobodnih radikala kisika nego tretman „remanium“ – om, za razliku od Špalja i sur. koji su utvrdili kako je najveća unutarstanična oksidacija kod nikal – titanij legura. (49) Divlji soj u ovom istraživanju ima manju unutarstaničnu oksidaciju nego W303, što se slaže s rezultatima metaboličke aktivnosti određene XTT – testom i mjerene na fluorescentnom mikroskopu. Kako navode Youseff i sur. divlji soj kvasca posjeduje superoksid dizmutazu (SOD3) koja ima mogućnost detoksicirati reaktivni kisik te time kvasac zadrži sva svoja svojstva i preživljava. (40) Kovač i sur. (2020.) u svom istraživanju, gdje su simulirali nikal – titanij i  $\beta$  – titanij legure, utvrdili su kako ove legure ne dovode do oksidativnog stresa u ispitivanim sojevima kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, dok nehrđajući čelik uzrokuje oksidativni stres kod kvasca. (52) U ovom istraživanju, gdje su korišteni ortodontski lukovi bez simulacije, utvrđeno je da nikal – titanij legure ipak uzrokuju oksidativni stres kod kvasca.

## 6. ZAKLJUČAK

Na kraju rada može se zaključiti:

- Tretman lukovima „rematitan“ i „remanium“ utječu na metaboličku aktivnost stanica kvasca, uzrokuju oksidativni stres, remete mitohondrijsku respiraciju te svim tim učincima smanjuju rast stanica te njihovu diobu.
- Rast stanica i njihovo razmnožavanje ne ovisi samo o vrsti tretmana već i o podlozi u kojoj se oni uzgajaju. YPD hranjiva podloga ima prihvatljiviji pH te više hranjivih tvari u odnosu na umjetnu slinu i samim time kvasci su postigli bolji rast na hranjivoj podlozi. No, ako se izuzme vrsta podloge, stanice tretirane ionima metala imale su manji porast u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.
- Stanična proliferacija također se mijenjala s promjenom medija. Divlji soj kvasca razvije određenu toleranciju i povećava se broj stanica čak i u mediju bez hranjivih tvari. Ioni metala mogu utjecati i na mitohondrijsku respiraciju, ali za više informacija potrebno je provesti iscrpnija istraživanja.
- Tretirane stanice u visokom su udjelu pokazale da i dalje imaju dobru metaboličku aktivnost i da stvaraju intravakuolarne strukture. Lukovi „remanium“ uzrokovali su nešto veći udio metabolički poremećenih stanica nego lukovi „rematitan“. Metabolički poremećene stanice indiciraju da ioni metala, koji se otpuštaju iz ovakvih legura, ne moraju nužno uzrokovati staničnu smrt, već mogu i oštetiti njene stanične funkcije, poput metabolizma ili diobe, ali da stanice i dalje budu žive.
- Postoji razlika u veličini stanica divljeg soja i W303 kvasca *Saccharomyces cerevisiae* već u početku pokusa. Nakon tretmana ionima metala dolazi do promjene oblika i veličine stanica. Kvasci rastu pretežito pojedinačno (pogotovo u mediju bez glukoze) ali i u nakupinama. Stanice stvaraju nakupine kako bi se uspješnije borile s oksidativnim stresom.
- Tretman ortodontskim lukovima „remanium“ uzrokovao je veći oksidativni stres, odnosno veću proizvodnju reaktivnih spojeva kisika nego tretman lukovima „rematitan“. Budući da lukovi „remanium“ u sebi sadrže do 20% kroma, za razliku od lukova „rematitan“ koji su nikal – titanij legura, veći oksidativni stres u tom tretmanu može se povezati s kromom za kojeg je već poznato da uzrokuje takvu vrstu oštećenja stanica.

## 7. LITERATURA

1. Špalj S. (2012). Ortodontski priručnik | Repozitorij Medicinskog fakulteta u Rijeci [Internet]. Repozitorij Medicinskog fakulteta u Rijeci. str. 224. Dostupno na: <https://repository.medri.uniri.hr/islandora/object/medri%3A2804>
2. Littlewood S.J. Mitchell L. (2019). An Introduction to Orthodontics [Internet]. 5. izdanje. Oxford University Press. 408 str. Dostupno na: [https://books.google.hr/books/about/An\\_Introduction\\_to\\_Orthodontics.html?id=8BqJDwAAQBAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.hr/books/about/An_Introduction_to_Orthodontics.html?id=8BqJDwAAQBAJ&redir_esc=y)
3. Brunette D. M.; Tengvall P.; Textor M.; Thomsen P. (2001). Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering [Internet]. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Dostupno na: [https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=EhnsCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA2&dq=titanium+in+medicine&ots=X\\_Cws8Z3wT&sig=eDVTYcU0\\_2ADywtiOJsIvfwq3og&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=EhnsCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA2&dq=titanium+in+medicine&ots=X_Cws8Z3wT&sig=eDVTYcU0_2ADywtiOJsIvfwq3og&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
4. Tatarciuc M.; Diaconu Popa D.; Luca O.; Vitalariu A. (2019). Thermic treatments influence on the structure and properties of dental alloys [Internet]. Romanian Journal of Oral Rehabilitation. Dostupno na: <https://www.rjor.ro/thermic-treatments-influence-on-the-structure-and-properties-of-dental-alloys/>
5. Nickel | Definition, Properties, Symbol, Uses, & Facts | Britannica [Internet]. Dostupno na: <https://www.britannica.com/science/nickel-chemical-element>
6. Genchi G., Carocci A., Lauria G., Sinicropi M.S., Catalano A. (2020). Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. International journal of environmental research and public health [Internet];17(3). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7037090/>
7. Duraković Z. Klinička toksikologija. Zagreb: Grafos; 2000. 185–187 str.
8. Nordberg G.F., Fowler B.A., Nordberg M., Friberg L. Handbook on the toxicology of metals. 3. izdanje. Sci Total Environ. 1982;24(3):293–4.
9. NIKAL, Ni - Spojevi, dobivanje i uporaba - Periodni Sustav Elemenata [Internet]. Dostupno na: <http://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/ni/spojevi.html>
10. Wever, D. J., Veldhuizen, A. G., Sanders, M. M., Schakenraad, J. M., & van Horn, J. R.

- (1997). Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials*, 18(16), 1115–1120. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9247349/>
11. Thompson S. A. (2000). An overview of nickel-titanium alloys used in dentistry. *International endodontic journal*, 33(4), 297–310. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11307203/>
  12. Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington (DC): National Academies Press (US); 2001. 13, Arsenic, Boron, Nickel, Silicon, and Vanadium. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK222322/>
  13. Zierden M.R., Valentine A.M. Contemplating a role for titanium in organisms. *Metallomics* [Internet]. 2016; 8(1):9–16. Dostupno na: <https://academic.oup.com/metallomics/article/8/1/9/6000637>
  14. Golasik M., Herman M., Piekoszewski W. Toxicological aspects of soluble titanium – a review of in vitro and in vivo studies. *Metallomics* [Internet]. 2016; 8(12):1227–42. Dostupno na: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/mt/c6mt00110f>
  15. TITANIJ, Ti - Spojevi, dobivanje i uporaba - Periodni Sustav Elemenata [Internet]. Dostupno na: <http://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/ti/spojevi.html#SPOJEVI>
  16. Titanium - Compounds | Britannica [Internet]. Dostupno na: <https://www.britannica.com/science/titanium/Compounds>
  17. Baranowska-Wójcik E., Szwajgier D., Oleszczuk P., Winiarska-Mieczan A. Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure on Human Health—a Review. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. 2019; 193(1):118–29. Dostupno na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-019-01706-6>
  18. Titanium - Element information, properties and uses | Periodic Table [Internet]. Dostupno na: <https://www.rsc.org/periodic-table/element/22/titanium>
  19. Vanadium processing - The metal and its alloys | Britannica [Internet]. Dostupno na: <https://www.britannica.com/technology/vanadium-processing/The-metal-and-its-alloys#ref623247>



20. Lütjering G., Williams J.C. Titanium [Internet]. 2. izdanje. (2007). Dostupno na: [https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=c9iR1Lm43GEC&oi=fnd&pg=PA4&ots=aJoUu9LcO2&sig=a5yT\\_Pn871F5XOzRKIr7bdkCJ84&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=c9iR1Lm43GEC&oi=fnd&pg=PA4&ots=aJoUu9LcO2&sig=a5yT_Pn871F5XOzRKIr7bdkCJ84&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
21. Grande F., Tucci P.; Titanium Dioxide Nanoparticles: a Risk for Human Health?; *Mini Rev Med Chem.*; 2016. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26996620>
22. A survey of metal carcinogenesis - PubMed [Internet]. [cited 2021 Sep 13]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4905208/>
23. Adriano D.C. (2001) Chromium. In: *Trace Elements in Terrestrial Environments*. Springer, New York, NY. Dostupno na: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-21510-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-0-387-21510-5_9)
24. KROM, Cr - Kemijski podaci - Periodni Sustav Elemenata [Internet]. Dostupno na: [http://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/cr/kemijski\\_podaci.html#KEMIJSKI](http://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/cr/kemijski_podaci.html#KEMIJSKI)
25. Burrows, D. (Ed.). (1983). Chromium: Metabolism and Toxicity [Internet]. Dostupno na: [https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=0wTFDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=chromium&ots=Pah1n9GIir&sig=7scunAJUCFcMhBY93bat7B27sEg&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=0wTFDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=chromium&ots=Pah1n9GIir&sig=7scunAJUCFcMhBY93bat7B27sEg&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
26. Achmad R, . B, Auerkari E. Effects of Chromium on Human Body. *ARRB* [Internet]. 2017.;17(2):1-8. Dostupno na: <https://journalarrb.com/index.php/ARRB/article/view/25879>
27. DesMarais, T. L., & Costa, M. (2019). Mechanisms of Chromium-Induced Toxicity. *Current opinion in toxicology*, 14, 1–7. 2019. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31511838/>
28. Katz S., Salem H. (1994). *The Biological and Environmental Chemistry of Chromium*. Dostupno na: [https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=gyMIBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=chromium&ots=q9XYKXBxNO&sig=H6AgdqimRHrTadeDScszLn8HNos&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=gyMIBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=chromium&ots=q9XYKXBxNO&sig=H6AgdqimRHrTadeDScszLn8HNos&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
29. Jacobs, J.A., Guertin, J., Avakian, C.P. (Eds.). (2004). *Chromium(VI) Handbook*; 1. izdanje. CRC Press. Dostupno na: <https://doi.org/10.1201/9780203487969>
30. Wilbur, S., Abadin, H., Fay, M., Yu, D., Tencza, B., Ingerman, L., Klotzbach, J., James,

- S. (2012). Toxicological Profile for Chromium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24049864/>
31. Cefalu W.T., Hu F.B. Role of Chromium in Human Health and in Diabetes. *Diabetes Care* [Internet]. 2004.; 27(11):2741–51. Dostupno na: <https://care.diabetesjournals.org/content/27/11/2741>
  32. Kalenić S., i suradnici: *Medicinska mikrobiologija*; Zagreb: Medicinska naklada; 2013.; str. 511.-515.
  33. Van der Klei, I. J., & Veenhuis, M. (2006). Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1364–1373. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17050005>
  34. Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., Mietzner, T. Jawetz, Melnick A. *Medicinska mikrobiologija*, dvadeset šesto američko izdanje/prvo hrvatsko izdanje - CROSBİ [Internet]. 2015. Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/812052>
  35. Cletus, P., Kurtzman, J. W. *Fell and Teun Boekhout: The Yeast: A Taxonomic Study*; 5. izdanje; 2010.; 3. poglavlje Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/saccharomycescerevisia>
  36. Stewart, G. G. (2014). SACCHAROMYCES | Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 297–301. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300002901>
  37. Stewart, G. G. (2014). SACCHAROMYCES | *Saccharomyces cerevisiae*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 309–315. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300002925>
  38. Finosh, G.T. (2013). Reactive oxygen species—Control and management using amphiphilic biosynthetic hydrogels for cardiac applications. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 04. 10.4236/abb.2013.412150. Dostupno na: <https://www.researchgate.net/publication/260243951>
  39. Farrugia, G., Balzan, R. (2012). Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Frontiers in oncology*, 2, 64. Dostupno na: <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00064>
  40. Youseff, B.H., Holbrook, E.D., Smolnycki, K.A., Rappleye, C.A. (2012) *Extracellular*

- Superoxide Dismutase Protects Histoplasma Yeast Cells from Host-Derived Oxidative Stress. PLoS Pathog 8(5): e1002713. Dostupno na: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002713>
41. Dymond, J. S. (2013). Saccharomyces cerevisiae growth media. Methods in enzymology, 533, 191–204. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00012-X>
  42. Gal, J. Y., Fovet, Y., Adib-Yadzi, M. (2001). About a synthetic saliva for in vitro studies. Talanta, 53(6), 1103–1115. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(00\)00618-4](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(00)00618-4)
  43. Zakrajšek, T., Raspor, P., Jamnik, P. (2011). Saccharomyces cerevisiae in the stationary phase as a model organism--characterization at cellular and proteome level. Journal of proteomics, 74(12), 2837–2845. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.06.026>
  44. Broach J. R. (2012). Nutritional control of growth and development in yeast. Genetics, 192(1), 73–105. Dostupno na: <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135731>
  45. Olivares-Marin, I. K., González-Hernández, J. C., Regalado-Gonzalez, C., Madrigal-Perez, L. A. (2018). Saccharomyces cerevisiae Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism. Journal of visualized experiments : JoVE, (139), 58192. Dostupno na: <https://doi.org/10.3791/58192>
  46. Wysocki, R., Tamás, M. J. (2010). How Saccharomyces cerevisiae copes with toxic metals and metalloids. FEMS microbiology reviews, 34(6), 925–951. Dostupno na: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00217.x>
  47. Barcelos, A. M., Luna, A. S., Ferreira, N. D. A., Braga, A. V. C., Lago, D. C. B. D., Senna, L. F. D. (2012). Corrosion evaluation of orthodontic wires in artificial saliva solutions by using response surface methodology. Materials Research, 16(1), 50–64. Dostupno na: <https://doi.org/10.1590/s1516-14392012005000172>
  48. Pearce, D. A., Sherman, F. (1999). Toxicity of copper, cobalt, and nickel salts is dependent on histidine metabolism in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Journal of bacteriology, 181(16), 4774–4779. Dostupno na: <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4774-4779.1999>

49. Spalj, S., Mlacovic Zrinski, M., Tudor Spalj, V., Ivankovic Buljan, Z. (2012). In-vitro assessment of oxidative stress generated by orthodontic archwires. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*, 141(5), 583–589. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2011.11.020>
50. Ahmadzadeh, M., Horng, A., Colombini, M. (1996). The control of mitochondrial respiration in yeast: a possible role of the outer mitochondrial membrane. *Cell biochemistry and function*, 14(3), 201–208. Dostupno na: <https://doi.org/10.1002/cbf.673>
51. Millard, P. J., Roth, B. L., Thi, H. P., Yue, S. T., Haugland, R. P. (1997). Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Applied and environmental microbiology*, 63(7), 2897–2905. Dostupno na: <https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2897-2905.1997>
52. Kovač, V., Poljšak, B., Primožič, J., Jamnik, P. (2020) Are Metal Ions That Make up Orthodontic Alloys Cytotoxic, and Do They Induce Oxidative Stress in a Yeast Cell Model? *International Journal of Molecular Sciences*. 21(21):7993. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijms21217993>
53. Kwolek-Mirek, M., Zadrag-Tecza, R. (2014). Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS yeast research*, 14(7), 1068–1079. Dostupno na: <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202>
54. Alugoju, P., Mahilkar, A., Saini, S. (2021) Evolution of multicellularity and unicellularity in yeast *S. cerevisiae* to study reversibility of evolutionary trajectories. *bioRxiv* [Internet]. 2020.08.15.252361. Dostupno na: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.15.252361v2>
55. Čanadi Jurešić, G., Čurko-Cofek, B., Barbarić, M., Mumiši, N., Blagović, B., Jamnik, P. (2021). Response of *Saccharomyces cerevisiae* W303 to Iron and Lead Toxicity in Overloaded Conditions. *Current microbiology*, 78(4), 1188–1201. Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02390-3>

## 8. POPIS SLIKA

Slika 1. Hiperplazija gingive u gornjem labijalnom segmentu tijekom tretmana fiksnim aparatom. a) u vrijeme uklanjanja aparata; b) nakon uklanjanja aparata (očekuje se potpuno rješavanje hiperplazije gingive nakon što je aparat uklonjen). (2).....	2
Slika 2. Ortodontski lukovi "remanium" i "rematitan" korišteni u ovom radu. ....	4
Slika 3. Dijagramski prikaz efekta superelastičnosti nikal - titanij legura.(11) .....	7
Slika 4. Dijagramski prikaz efekta memorije oblika. (11) .....	7
Slika 5. Tetragonalne strukture kristalnih oblika ruda titanija (crveno - kisik (O <sub>2</sub> ), sivo – titanij). (17) .....	12
Slika 6. Primjeri korištenja titanija u ortodonciji. a) titanijski nosači, b) luk od legure titanij – molibden, c) prikaz pacijenta s titanijskim nosačima i lukovima. (3).....	16
Slika 7. Predloženi model apsorpcije Cr(VI) u plućima i gastrointestinalnom traktu. M – mitohondrij; N – jezgra; RBC – crvene krvne stanice. (27).....	21
Slika 8. Reakcije redukcije i oksidacije iona kroma. (26).....	23
Slika 9. Predloženi mehanizam djelovanja kroma i LMWCr-a na pojačanje djelovanja inzulina. (30) .....	25
Slika 10. Građa blastokonidije; J - jezgra, M - mitohondrij, V - vakuola, ER - endoplazmatksa mrežica, G - Golgijev aparat, GI - glikogenska zrnca. (31) .....	27
Slika 11. Shematski prikaz staničnog oštećenja oksidativnim stresom. (37).....	29
Slika 12. Shematski prikaz određivanja optičke gustoće kvasaca.....	33
Slika 13. Prikaz prebrojanih stanica na LUNA-FLTM Dual fluorescence cell counter. ....	34
Slika 14. Bürker-Türk-ova komorica za brojanje stanica.....	34
Slika 15. Shematski prikaz nasađivanja mikrotitarske pločice; plavo – stanice tretirane „rematitan“-om (1 – 3 dana, 2 – 7 dana, 3 – 14 dana), crveno – stanice tretirane „remanium“-om (4 – 3 dana, 5 – 7 dana, 6 – 14 dana), zeleno – kontrola, žuto – slijepa proba. ....	35
Slika 16. Prikaz redukcije XTT do formazana. ....	36
Slika 17. Prikaz mikrotitarske pločice pripremljene za pokus (strelicama označene jažice u koje je dodan XTT reagens).....	37
Slika 18. Shematski prikaz mikroskopskog određivanja vitalnosti kvasca.....	38
Slika 19. Shematski prikaz određivanja vijabilnosti kvasca na LUNA-FLTM uređaju. ....	38
Slika 20. Shematski prikaz određivanja unutarstanične oksidacije.....	39
Slika 21. Krivulje rasta kvasca na YPD hranjivoj podlozi tretiranih s lukovima "rematitan" i "remanium", kontrola (netretirane stanice). Tretmani dentalnim lukovima podijeljeni u skupine prema vremenskoj duljini izlaganja u mediju: 3 dana (3D), 7 dana (7D) i 14 dana (14D).....	40

Slika 22. Krivulje rasta kvasca uzgajanih u umjetnoj slini i tretiranih s iscrpinama lukova "rematitan" i "remanium" te kontrole (netretirane stanice obje vrste kvasaca). Tretmani dentalnim lukovima podijeljeni u skupine prema vremenskoj duljini izlaganja u mediju: 3 dana (3D), 7 dana (7D) i 14 dana (14D).....	41
Slika 23. Grafički prikaz određivanja metaboličke aktivnosti pomoću XTT – testa na hranjivoj podlozi YPD.....	42
Slika 24. Grafički prikaz određivanja metaboličke aktivnosti pomoću XTT – testa u umjetnoj slini.....	43
Slika 25. Grafički prikaz usporedbe tretmana lukovima "rematitan" i "remanium" na učinak metaboličke aktivnosti (kraj reakcije, 24 sata) kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> uzgajanog u YPD hranjivoj podlozi (p=0,67).....	44
Slika 26. Prikaz stanica pod fluorescentnim mikroskopom (P=400x) obojane FUN bojama nakon tretmana lukom „rematitan“; slovo a prikazuje mrtve stanice, b prikazuje žive stanice s poremećenom metaboličkom aktivnošću, c prikazuju žive stanice s crvenom cilindričnom intravakuolarnom strukturom (CIVS). .....	46
Slika 27. Grafički prikaz provjere statistički značajne razlike učinka dentalnih lukova "remanium" i "rematitan" ovisno o soju kvasca (W303 i Divlji soj - DT). Rezultati su obrađeni studentovim t - testom te je utvrđeno da nema statistički značajne razlike (p=0,89). .....	47
Slika 28. Grafički prikaz promjene koncentracije stanica (ukupan broj, žive i mrtve) uzgajane na YPD hranjivoj podlozi te tretirane: a) lukovima „rematitan“; b) lukovima „remanium“..	48
Slika 29. Grafički prikaz koncentracije ukupnog broja stanica uzgajanih u umjetnoj slini. a) stanice tretirane lukovima „rematitan“; b) stanice tretirane lukovima „remanium“.....	49
Slika 30. Prosječna veličina stanica kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> divlji tip i W303 tretiranih iscrpinama lukova „remanium“ ili „rematitan“, uzgajanih na a)YPD hranjivoj podlozi, b) u umjetnoj slini. ....	50
Slika 31. Grafički prikaz razlike formiranja stanica uzgajanih na YPD hranjivoj podlozi tijekom tretmana lukovima „rematitan“.....	51
Slika 32. Grafički prikaz razlike formiranja stanica uzgajanih na YPD hranjivoj podlozi tijekom tretmana lukovima „remanium“.....	51
Slika 33. Grafički prikaz razlike formiranja stanica uzgajanih u umjetnoj slini tijekom tretmana lukovima „rematitan“.....	52
Slika 34. Grafički prikaz razlike formiranja stanica uzgajanih u umjetnoj slini tijekom tretmana lukovima „remanium“.....	52

Slika 35. Prikaz unutarstanične oksidacija stanica kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (W303) tretiranih lukovima „rematitan“ i „remanium“. Vrijednosti su izražene relativnom fluorescencijom (RFU). Prikazan i postotak unutarstanične oksidacije obzirom na kontrolu (netretirane stanice). .....	53
Slika 36. Prikaz unutarstanične oksidacija stanica kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (divlji tip) tretiranih lukovima „rematitan“ i „remanium“. Vrijednosti izražene relativnom fluorescencijom (RFU). .....	53

## 9. ŽIVOTOPIS

Izabela Šaravanja rođena je 5. studenog 1997. u Vinkovcima. Osnovnu školu završava u Ivankovu (OŠ Antun Gustav Matoš) 2012. godine. Te iste godine upisuje opću gimnaziju u Vinkovcima (Gimnazija Matije Antuna Reljkovića). 2016. godine po završetku srednje škole upisuje Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Nakon 3 godine trajanja studija, 2019. stječe zvanje prvostupnika (baccalaureus) sanitarnog inženjerstva (bacc. sanit. ing.) i upisuje Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na istom fakultetu.

Tijekom studija sudjelovala je pasivno i aktivno na kongresima, te je radila na Nastavnom Zavodu za Javno Zdravstvo u Rijeci na epidemiološkom anketiranju.