

Učinak iona metala koji se otpuštaju iz legura ortodonskih naprava na metaboličku aktivnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Šaravanja, Izabela

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:184:594511>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Izabela Šaravanja

UČINAK IONA METALA KOJI SE OTPUŠTAJU IZ LEGURA
ORTODONSKIH NAPRAVA NA METABOLIČKU AKTIVNOST
KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

Završni rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Izabela Šaravanja

UČINAK IONA METALA KOJI SE OTPUŠTAJU IZ LEGURA
ORTODONSKIH NAPRAVA NA METABOLIČKU AKTIVNOST
KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

Završni rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: Izv. Prof.dr.sc. Gordana Čanadi Jurešić, dipl.ing.

Završni rad obranjen je dana ____ u/na _____,

pred povjerenstvom u sastavu:

1.

2.

3.

Rad ima _ stranica, _ slika, _ tablica, _ literaturnih navoda.

SAŽETAK

Nitinol legura, legura nikla i titana, jedan je od materijala koji imaju dobru biokompatibilnost, otporni su na koroziju i sadrže još poneka svojstva zbog kojih se često koriste u izradi implantata. No zbog nepovoljnog fiziološkog stanja okoline i mehaničkih oštećenja moguća je biorazgradnja legure i otpuštanje iona metala u tijelo.

Cilj ovog istraživanja je odrediti učinak iona metala koji se otpuštaju iz dentalnih naprava izrađenih od Nitinol legure na stanice kvasaca. Pratio se učinak ekstrakta Nitinol legure, Ni^{2+} (NiCl_2) i Ti^{4+} (TiO_2) iona.

Kao radni mikroorganizam korišten je soj W303 kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolička aktivnost kvasaca određena je dvjema metodama: fluorimetrijski i fluorescentnim mikroskopom uz pomoć „Live/Dead Yeast Viability kit“-a.

Povećanje broja stanica nakon 20 sati uzgoja manje je kod tretmana žicom i niklom nego kod kontrolnih, netretiranih stanica. Najveći učinak na metaboličku aktivnost uočen je, i fluorimetrijski i fluorescentnim mikroskopom, kod tretmana žicom pošto je to zapravo objedinjeno tretman niklom i titanom.

SUMMARY

Nitinol alloy, alloy made of nickel and titanium, is one of the materials that are used for biomedical applications because of their good biocompatibility, corrosion resistance and other properties. However, it may come to implant biodegradation and ions can be released to peri-implant tissues because of the aggressive physiological environment along with mechanical loading.

This research aims to determine the effect of ions that are released from dental implants made of Nitinol alloy on yeast cells. We tracked effects of Nitinol alloy extract, Ni^{2+} (NiCl_2) and Ti^{4+} (TiO_2) ions.

Work microorganism used in this research was yeast *Saccharomyces cerevisiae* (strain W303). Metabolic activity of yeast cells was determined with two methods: in microplate reader and under the fluorescence microscope using „Live/Dead Yeast Viability kit“.

The increase in number of yeast cells after 20 h of culturing is lower after treatment with alloy and nickel than in the control sample. The biggest effect on metabolic activity of yeast cells was determined after the treatment with alloy because it is both treatment with nickel and titanium at the same time.

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. Uvod i pregled područja istraživanja | 1 |
| 1.1. Kvasac | 1 |
| 1.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 2 |
| 1.1.2. Metabolizam kvasaca | 3 |
| 1.2. Nikal | 4 |
| 1.3. Titanij | 5 |
| 1.4. Nikal-titan legura | 6 |
| 1.4.1. Nitinol legura u ortodontiji | 8 |
| 2. Cilj istraživanja | 9 |
| 3. Materijali i metode | 10 |
| 3.1. Materijali | 10 |
| 3.1.1. Radni mikroorganizam | 10 |
| 3.1.2. Uređaji, laboratorijski pribor, kemikalije | 10 |
| 3.2. Metode | 11 |
| 3.2.1. Priprema hranjive podloge | 11 |
| 3.2.2. Uzgoj kvasaca | 11 |
| 3.2.3. Brojanje stanica kvasaca | 12 |
| 3.2.4. Bojanje po FUN-u | 13 |
| 3.2.5. Statistička analiza | 14 |
| 4. Rezultati | 15 |
| 4.1. Povećanje broja stanica nakon 20 sati uzgoja na podlozi | 15 |

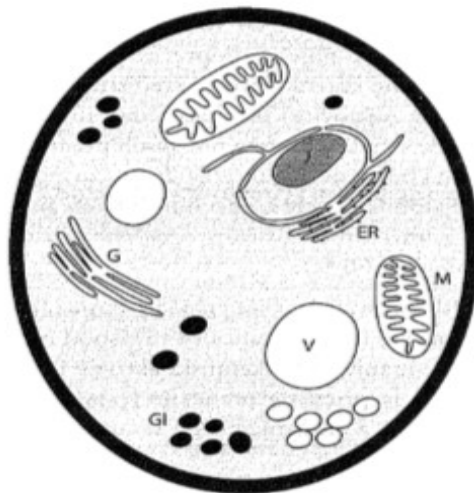
| | |
|--|----|
| 4.2. Fluorimetrijsko određivanje metaboličke aktivnosti..... | 16 |
| 4.3. Mikroskopsko određivanje metaboličke aktivnosti | 17 |
| 4.3.1. Tretman žicama | 18 |
| 4.3.2. Tretman niklom | 19 |
| 5. Rasprava | 20 |
| 5.1. Povećanje broja stanica nakon 20 sati uzgoja na podlozi | 20 |
| 5.2. Fluorimetrijsko određivanje metaboličke aktivnosti..... | 20 |
| 5.3. Mikroskopsko određivanje metaboličke aktivnosti | 21 |
| 6. Zaključak | 22 |
| 7. Literatura | 23 |
| 8. Prilozi | 25 |

1. Uvod i pregled područja istraživanja

1.1. Kvasac

Kvasci su jednostanične organizmi koji pripadaju carstvu *Fungi*, kao i plijesni i mesnate gljive. Fungi su eukarioti koji mogu biti jednostanični ili višestanični organizmi. Fungi ne posjeduju klorofil pa nemaju sposobnost obavljanja procesa fotosinteze te hranu apsorbiraju iz okoline.

Stanice kvasaca nazivaju se blastokonidije (grč. blastos – klica, conia - prašina) koje mogu imati promjer od 2 do 15 μm (većina blastokonidija je promjera 5 do 7 μm). Blastokonidije mogu biti okruglog, ovalnog ili izduženog oblika. Stanica kvasca obavijena je višeslojnom staničnom stijenkom ispod koje se nalazi citoplazma. U citoplazmi postoje jezgra, mitohondriji, Golgijev aparat, endoplazmatska mrežica, glikogenska zrnca i vakuole.



Slika 1. Građa blastokonidije; J - jezgra, M - mitohondrij, V - vakuola, ER - endoplazmatska mrežica, G - Golgijev aparat, GI - glikogenska zrnca

Stanična stijenka daje čvrstoću, oblik i zaštitu od mehaničkog oštećenja ili osmolitičke lize stanici. Ima važnu ulogu u pretvorbi blastokonidije u filamentozni oblik te je čimbenik

patogenosti gljive (npr. adherencija na umjetne i biološke supstrate). Na površini blastokonidije nekih vrsta kvasaca mogu se nalaziti fimbrije koje im omogućavaju adherenciju na ljudske epitelne stanice i na površinu raznih protetičkih materijala. Neke vrste kvasaca imaju i polisaharidnu kapsulu kao čimbenik virulencije.

Citoplazmatska membrana građena je od dva sloja fosfolipida s brojnim uvrnućima. Citoplazmatska membrana zadužena je za regulaciju propusnosti tvari u stanicu, a unutar membrane smješteni su brojni enzimi koji sudjeluju u sintezi molekula stanične stijenke. Ciljno mjesto djelovanja nekih antifungalnih lijekova je ergosterol koji je glavni sterol citoplazmatske membrane kvasaca.

Jezgra u blastokonidiji obavijena je dvostrukom jezgrinom membranom s porama. Također su u citoplazmi vidljivi mikrotubuli, mitohondriji, endoplazmatska mrežica, Golgijev aparat, pričuvna zrnca i vakuole.

Na kukuruznom agaru često se uz blastokonidije mogu pronaći prave hife i pseudohife. Pseudohife nastaju kada se blastokonidije izdužuju i slažu jedna kraj druge u kraći ili duži lanac. Prave hife nastaju klijanjem, tj. germinacijom iz blastokonidija i daljnjim izduživanjem vršne stanice te stvaranjem poprečnih pregrada. (1)

1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae je kvasac koji se koristi širom svijeta u prehrambenoj industriji i jedan od glavnih modela stanica u raznim znanstvenim istraživanjima upravo zbog njegove specifične fiziološke građe i metaboličke aktivnosti.

Stanica kvasca *S.cerevisiae* okružena je staničnom stijenkom koja sadržava proteine, polisaharide i malu količinu hitina. Elektronskim mikroskopom pokazano je da je stanični zid ovog kvasca slojevita struktura do debljine od 300 nm. (2)

Saccharomyces cerevisiae već se desetljećima koristi kao prototipska eukariotska stanica idealna za otkrivanje mnogih osnovnih pojava eukariotskog života. To je upravo zbog jednostavnosti i brzine analize kvasca, male veličine njegova genoma (12 Mbp), kratkog vremena udvostručavanja (80 min na složenim medijima), potpuno razvijenog sustava spolnog razmnožavanja sa stabilnim haploidnim i diploidnim fazama koje omogućuju komplementaciju i rekombinacijsku analizu.

1.1.2. Metabolizam kvasaca

Metabolizam je skup različitih procesa anabolizma i katabolizma, odnosno izgradnje i razgradnje. Metabolizam se može podijeliti na primarni i sekundarni. Primarnim metabolizmom stvaraju se tvari neophodne za život gljivičnih stanica. Kao i svim ostalim organizmima, za metabolizam su im potrebni osnovni izvori hranjivih tvari kao što su: ugljik i dušik, voda, anorganske soli. Gljive se svrstavaju u kemoheterotrofne organizme, tj organizme koji kemijskim procesima proizvode potrebnu energiju. Nemaju pigment klorofil te prema tome ne mogu stvarati energiju i ugljikov dioksid procesom fotosinteze. (1) Najznačajniji metabolički proces dobivanja energije i ugljika za rast i izgradnju staničnih organela je razgradnja ugljikohidrata. Razgradnja šećera može se odvijati i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima. Prema načinu razgradnje i vrsti korištenog šećera moguće je odrediti, odnosno identificirati vrstu kvasca. Razgradnjom nitrata, amonijaka i aminokiselina gljive dobivaju dušik. Također, neki drugi metabolički procesi koriste se za identifikaciju i klasifikaciju gljiva kao što su npr. asimilacija ugljikohidrata i kreatinina, hidroliza ureje, želatine. (3)

Tijekom evolucije, gljive su stekle sposobnost prilagodbe na različite životne uvjete i iskorištavanje brojnih supstrata kao izvor hranjivih tvari. Čimbenici koji utječu na preživljavanje, brzinu rasta, oblik i razmnožavanje kvasaca su: temperatura, pH vrijednost okoliša, vrsta i koncentracija hranjivih tvari, svjetlost i vlažnost. (1) Gljive za rast na

hranjivim podlogama trebaju određene makroelemente i mikroelemente. Makroelementi potrebni za rast su ugljik, vodik, kisik, fosfor, kalij, dušik, magnezij, kalcij i potrebni su u količinama od oko 10^{-3} M, dok mikroelemente, željezo, bakar, cink, molibden, mangan i dr., trebaju u puno manjim količinama približno 10^{-6} M. Većina gljiva podnosi različite pH vrijednosti okoliša, no ipak idealni pH hranjive podloge za rast je 5,4-5,6. Temperatura od 25°C idealna je za rast i razmnožavanje većine gljivičnih vrsta. (3)

1.2. Nikal

Nikal (Ni) je srebrnasto-bijeli sjajni metal, svojstvima sličan željezu te je na zraku postojan. (4) Sveprisutni je metal u tragovima koji se javlja u tlu, vodi, zraku i biosferi. (5) Nikal je 22. najzastupljeniji element u Zemljinoj kori i vrlo važan element u tragovima. Nikal ima više mogućih oksidacijskih stanja gledajući od -1 do 4, ali najzastupljeniji u biološkim sustavima je Ni (II). (6) Može se pronaći u nalazištima sulfidne rude koji sadrže pentlandit, halkopirit ili neke druge minerale. Esencijalni je element u tragovima za mnoge vrste, biljne i životinjske. Deficit nikla može ometati metabolizam glukoze i smanjiti toleranciju glukoze. (4) Nikal je neophodan za katalitičku aktivnost nekih biljnih i bakterijskih enzima. Polagano povećanje tjelesne težine, anemija i smanjena održivost opisani su kod nekih vrsta životinja nakon uskraćivanja nikla u prehrani.

Najviše se nikla koristi za proizvodnju nehrđajućeg čelika i ostalih legura nikla s visokom otpornošću na temperaturu i koroziju. (5) Anorganski nikal koristi se za elektroplatanje galvanizacijom (poniklavanje), za izradu slitina sa željezom (feronikal) ili bakrom gdje se upotrebljava za izradu kovanica, za izradu baterija zajedno s kadmijem, za izradu instrumenata i osjetljivih dijelova strojeva iz slitine s kromom. (4)

Unos nikla u organizam moguć je udisanjem, gutanjem ili preko kože. Dermalna izloženost važna je za indukciju i održavanje kontaktne preosjetljivosti uzrokovane

svakodnevnim kontaktom s predmetima koji sadrže nikal. Jatrogena izloženost, odnosno izloženost koja nastaje nakon liječničkih zahvata, rezultat je implantata i proteza koje su izrađene od legura nikla, intravenoznih i dijaliznih tekućina te iz radiografskih kontrastnih medija. Izlaganje niklu najčešće je zapravo povezano uz profesionalna oboljenja. Radnici su izloženi prahu i dimovima koji sadrže nikal, a otpuštaju se tijekom zavarivanja, oblaganja, brušenja, rafiniranja nikla i u čeličanama. Glavni put apsorpcije u organizam tijekom profesionalne izloženosti je respiratorna apsorpcija sa sekundarnom gastrointestinalnom apsorpcijom. Nikal se po organizmu transportira krvlju vezan za albumin. (5)

1.3. Titanij

Titanij je tamno sivi metal široko rasprostranjen u svijetu, ali pojavljuje se u malim količinama. Deveti je najzastupljeniji element u Zemljinoj kori, a većina se nalazi u netopivim mineralima. U okolini najviše ga ima u obliku rutila, jednog od kristalnog oblika titan dioksida (TiO_2), ili u obliku ilmenita (FeTiO_3). (7)

Od svog otkrića, titan se pronašao u širokoj upotrebi od aeronautičke industrije preko vojne i nuklearne industrije pa sve do inženjerstva i medicine. Najveći dio titana koristi se u obliku titan dioksida. No s druge strane postoji još jedan oblik ionskog titana koji se oslobađa iz implantata koji su izgrađeni od legure titana. (8) Topivi titan može se pronaći u površinskim vodama oceana te u vrućim izvorskim vodama. Najstabilnije oksidacijsko stanje titana u okolišu je Ti (IV), te ima slične određene karakteristike poput Al (III) i Fe (III). Ti (IV) može se vezati s određenim proteinima kao Fe (III). Vezanje Ti (IV) s manjim ili većim biomolekulama povećava topljivost ovog metala. Mnogo podataka ukazuje da je titan biološki važan, ali do sada nije utvrđena poveznica ni s jednim organizmom. (7) Procjenjuje se da ljudsko tijelo sadrži prosječno 10-20 mg titana i većinom smješten u bubrezima, jetri i plućima. Pretpostavlja se da je glavni izvor iona titana iz implantata koji sadrže leguru titana.

Otpuštanje iona metala iz implantata obično je rezultat galvanske korozije. Koliko će se iona titana otpustiti iz implantata ovisi o mnogim čimbenicima, uključujući pH, koncentraciju soli i bakterije. Istraživanjima in vivo i in vitro pokazano je da se titan otpušta iz implantata i akumulira u ponekim organima i tkivima, ali toksičnost ovih iona nije točno određena već su potrebna daljnja istraživanja. (8)

Titan oksid (TiO_2) je prirodni oksid titana. Ima zanemarivu toksičnost i biološki učinak na organizme. Zbog svojstva bio-inertnosti koristi se u prehrambenoj industriji, kao sastojak farmaceutskih i kozmetičkih preparata. Apsorpcija u organizam, odnosno u tijelo čovjeka, upravo zbog upotrebe TiO_2 , najčešće je oralno, dermalno ili putem inhalacije. Unatoč širokoj upotrebi titan dioksida, biološki učinci i mehanizmi staničnog odgovora na ovaj spoj nisu poznati. Jedan od glavnih načina na koji titan oksid može potencijalno biti toksičan je stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), što može rezultirati oksidacijskim stresom, upalnim odgovorom, genotoksičnošću ili karcinogenezom. Vrsta i opseg oštećenja stanica ovise o kemijskim i fizikalnim svojstvima titan oksida. (9)

1.4. Nikal-titan legura

Na svjetskoj razini povećava se očekivano trajanje života i demografsko starenje stanovništva. Prema tome može se i očekivati veći broj ljudi s ortopedskim, dentalnim i drugim vrstama implantata. Postoji velik broj materijala koji se mogu upotrebljavati u biomedicinskoj primjeni, ali ti materijali moraju posjedovati određena svojstva kao što su dobra biokompatibilnost, otpornost na koroziju, visoka čvrstoća i dr. Ovi zahtjevi uglavnom odgovaraju metalima, među kojima su nikal i titan te njihove legure. Karakteristično za ove materijale je brzo stvaranje sloja oksida na površini tijekom dodira s vodom u otopinama ili vlagom u zraku zbog čega i nastaje otpornost na koroziju i biokompatibilnost. Međutim, nepovoljno fiziološko okruženje uz mehaničko opterećenje može povećati rizik od

biorazgradnje implantata. Na taj način oslobađaju se ioni metala iz implantata u periplantacijskim tkivima. (8)

Početak 1960-ih. W. F. Buehler razvio je nikal-titan leguru dok je istraživao nemagnetne, otporne na sol te vodootporne legure. Nitinol je ekvivalentna legura nikla i titana koja posjeduje specifična mehanička i mikrostrukturna svojstva, odnosno efekt memorije oblika i superelastičnost. Svojstvo pamćenja oblika omogućava povratak u prvobitno stanje nakon deformacije izazvane na niskoj temperaturi. Ovaj učinak događa se zbog transformacije u kristalnoj strukturi legure. Nitinol je pogodan za izradu krvožilnih i plućnih usadaka te ortodontskih implantata, kao što su žice za ortodontsko poravnavanje zubi, osteosintetske spajalice. Postoje i mnoge druge potencijalne biomedicinske aplikacije Nitinola, npr. u ortopediji za liječenje skolioze. Biokompatibilnost ovog materijala povezana je s korozivnim svojstvima metala i kemijskom interakcijom metala i tkiva domaćina. Kako bi se Nitinol legura mogla sigurno koristiti kao materijal za implantate u ljudskom tijelu, potrebno je provesti daljnja istraživanja toksičnosti otpuštenih iona metala i uzeti u obzir sve aspekte biokompatibilnosti.(10) Zbog veće čvrstoće i manjeg modula elastičnosti, sve se više počinju upotrebljavati Nitinol legure u ortodontici, a smanjuje se upotreba nehrđajućeg čelika. Vrlo je bitno da osobe koje rukuju s ovom legurom budu upoznate s njenom metalurgijom kako bi se izrazile maksimalne kliničke karakteristike instrumenata izrađenih od Nitinol legura. Iako su instrumenti izrađeni od ove legure fleksibilniji nego oni izrađeni od nehrđajućeg čelika i imaju bržu sposobnost pripreme te bez nepotrebnih aberacija, postoje i nedostaci poput povećanog troška, nemogućnosti rezanja zbog potencijalne istrošenosti te nemogućnost da se instrumenti s različitim izvedbama svedu na određenu veličinu.

Nitinol legure sadrže otprilike 56% nikla i 44% titana. U nekim legurama malena količina nikla zamijenjena je kobaltom. (11)

Unatoč zadovoljavajućoj kliničkoj upotrebi Nitinol legura, njegova se biokompatibilnost u nekim situacijama još uvijek dovodi u pitanje zbog povećane količine nikla. (10)

1.4.1. Nitinol legura u ortodonciji

U početku se legura Nitinol koristila za žice u ortodontskoj napravi za izravnavanje zubi. Ovako načinjene žice smanjile su broj promjena žica za kompletno liječenje, omogućena je brža rotacija zuba, bez povećanja neugode pacijenata, povećana je otpornost na koroziju. Najvažnije prednosti Nitinolove žice bila je njegova konstrukcija kao elastična, pravokutna žica koja je omogućila istodobne rotacije, izravnavanje, prevrtanje i zakretanje zavoja već u početku liječenja. No, uočena su i ograničenja u korištenju materijala, kao što su vrijeme potrebno za savijanje žica, nužnost upotrebe instrumenata s oštrim kutom koji mogu dovesti do loma i nemogućnosti lemljenja ili zavarivanja na sebe.

Nakon dobro pokazane prakse korištenja Nitinol legure za izradu žica u ortodontskim napravama, počinje se koristiti i za izradu zubnih proteza, krunica te kod oralnih operacija kosti nakon mandibularnog prijeloma. Tijekom ispitivanja, Nitinol legura pokazala se superiornijom od nehrđajućeg čelika. Među jednim nedostacima kod zubnih proteza je poteškoća prilikom konvencionalne tehnike lijevanja zuba. Došlo je do gubitka posebnih svojstava ove legure pošto je titan vrlo reaktivan pri visokim temperaturama te materijali kalupa mogu utjecati na mehanička svojstva i uvjete površine. (10)

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti učinak iona metala koji se otpuštaju iz legure korištene za izradu dentalnih naprava na metaboličku aktivnost kvasaca *S.cerevisiae*. Pratio se učinak „ekstrakta“ Nitinol žice, Ni^{2+} - iona u količini koja je eksperimentalno utvrđena da se otpušta iz žica, a dodana je kao NiCl_2 te Ti^{4+} - iona u količini koja je eksperimentalno utvrđena da se otpušta iz žica, a dodana je kao TiO_2 . Metabolička aktivnost kvasaca praćena je „Live/Dead Yeast Viability kit“-om, jednim od testova za utvrđivanje vitalnosti kvasca.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizam

U ovom istraživanju korišten je soj W303 kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Radni kvasac uzgajali smo po principu Scale-up na kompletnoj kvaščevoj podlozi (YPD).

3.1.2. Uređaji, laboratorijski pribor, kemikalije

- Stakleno posuđe (tikvice od 250 mL, 500 mL, 1000 mL; čaše, epruvete)
- Automatske pipete, Eppendorf, Njemačka
- pH-metar MP 220, Mettler Toledo, EU
- Tehnička vaga PCB 1000-2, Kern-Sohn, Njemačka
- Analitička vaga Explorer, OHAUS, Švicarska
- Magnetska miješalica MR Hei Standard, Heidolph, Njemačka
- Fluorescentni mikroskop Olympus BX51; Olympus, Tokyo, Japan
- Fluorimetar Tecan F200 Infinite multiplate reader, Tecan Austria GmbH, Austria
- Tresilica Unimax 1000, Heidolph, Njemačka
- Bürker-Türk-ova komorica
- Svjetlosni mikroskop Olympus BX40F; Olympus, Tokyo, Japan
- Koncentrirana otopina klorovodične kiseline (HCl), Merck
- Glukoza, Biolife, Italija
- Pepton, Liofilchem, Italija
- Kvaščev ekstrakt, Biolife, Italija
- LIVE/DEAD Yeast Viability Kit, Thermo-Scientific, SAD
- Autoklav za sterilizaciju, CertoClav, Austrija
- Vorteks, Technokartell TK3S, Australija

3.2. Metode

3.2.1. Priprema hranjive podloge

Hranjiva podloga YPD (yeast extract, peptone, dextrose) pogodna je za rast velikog broja sojeva s obzirom da je vrlo bogat medij. Podloga može biti pripremljena kao kruta ili tekuća, ovisno zahtjevima pokusa. Podloga se priprema prema recepturi: 20 g/L glukoze, 20 g/L pepton i 10 g/L kvašćevog ekstrakta. Potrebno je izvagati glukozu, pepton i kvašćev ekstrakt i zajedno promiješati u staklenoj čaši. Smjesi se doda određena količina destilirane vode zajedno s magnetom te se stavi na magnetsku miješalicu sve dok otopina ne postane bistra. Optimalan pH za rast kvasaca je 5,5, stoga je potrebno korigirati pH dobivene hranjive podloge. pH se korigira s koncentriranom otopinom HCl-a. Pripremljena hranjiva podloga sterilizira se u autoklavu prije početka uzgoja kvasaca. (12)

Pripremane su i podloge za tretman niklom, titanom i žicama. Za tretman niklom u podlogu je dodana 1M otopina NiCl_2 i u podlozi ga se nalazi 2,15 $\mu\text{g/mL}$ pošto ga se toliko otpusti iz žica u roku 3 dana. U tretmanu s titanom u podlozi ga je 2,29 $\mu\text{g/mL}$ i dodaje se 0,1M otopina TiO_2 . Tretman žicom provodi se tako da se u podlogu doda 28 cm žice, što znači da je 1 mL otopine po 1 cm žice. 28 cm žice odgovara prosječnoj potrebi za izradu jedne dentalne naprave.

3.2.2. Uzgoj kvasaca

Uzgoj kvasaca traje 44 ± 2 h i odvija se u dvije faze. Za prvu fazu potrebno je u epruvete prebaciti po 10 mL gotove hranjive podloge. Prva faza je rast biomase kvasaca na hranjivoj podlozi u epruvetama. Uzorak kvasca se s krute hranjive podloge precijepi s bakterijskom ušicom u priređene epruvete sa sterilnom tekućom hranjivom podlogom. Epruvete s otopljenom biomasom kvasca se miješaju na tresilici 24 sata, na temperaturi 30°C , brzinom

200 rpm. Nakon 24h u epruvetama je primjetno zamućenje hranjive podloge zbog rasta kvasaca.

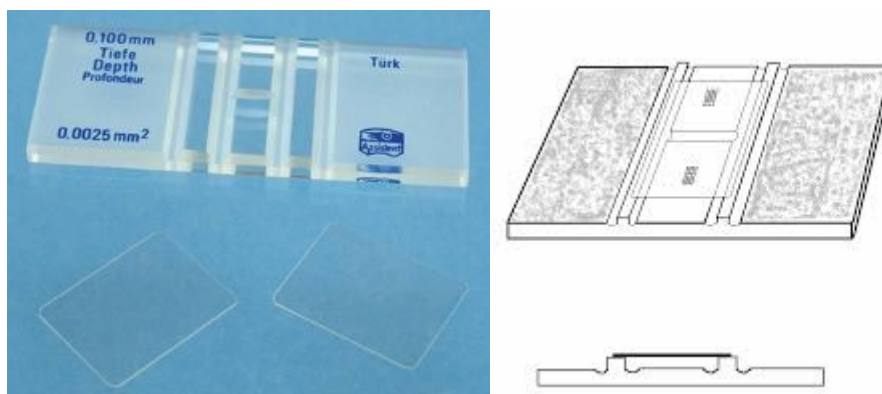
Druga faza je rast biomase kvasca na hranjivoj podlozi u tikvicama. U tikvice od 200/250 mL ulije se 100 mL hranjive podloge i 1 epruveta poraslog kvasca, u tikvice od 500 mL po 200 mL hranjive podloge i dvije epruvete poraslog kvasca. Tikvice s biomasom kvasca potrebno je začepiti vatom i ostaviti na tresilici 20h uz temperaturu od 30°C i brzinom 200 rpm.

3.2.3. Brojanje stanica kvasaca

Brojanje stanica kvasaca izvodi se na Bürker-Türk-ovoj komorici koja ima ugraviranu kvadratnu mrežu sa 16 velikih kvadrata (4x4), a svaki veliki kvadrat ima 25 malih kvadrata (5x5). Brojanje stanica kvasaca radi se netom nakon prebacivanja poraslih kvasaca u tikvici i nakon završetka inkubacije. Kapljica suspenzije (uzimano 8 µL) stavi se na ploču komorice i poklopi s pokrovnim stakalcem. Svjetlosnim mikroskopom s povećanjem 400x prebroje se minimalno 4 manja kvadratića, a kasnije kao rezultat potrebno je izraziti srednju vrijednost. Iz srednje vrijednosti broja stanica po kvadratu moguće je izračunati broj stanica u 1 mL hranjive podloge. Za izračunavanje broja stanica kvasaca u 1 mL suspenzije koristi se sljedeća formula:

$$\text{CFU/mL} = 16 \times \frac{n_{sr}}{V} \times \text{recipročna vrijednost faktora razrjeđenja}$$

gdje je n_{sr} - srednja vrijednost broja stanica , V- volumen komorice (10^{-4} mL)



Slika 2. Bürker-Türk-ova komorica za brojanje stanica.

3.2.4. Bojanje po FUN-u

LIVE/DEAD Yeast Viability Kit sadrži dvobojnu fluorescentnu boju, FUN 1 i Calcofluorwhite. Calcofluor je fluorescentni reagens koji se veže na površinu stanice te se koristi za obilježavanje staničnog zida gljiva. FUN 1 može se koristiti samostalno ili u kombinaciji s Calcofluor-om za određivanje metaboličke aktivnosti fluorescentnim mikroskopom ili nekim drugim instrumentalnim metodama. FUN 1 iskorištavaju normalne endogene biokemijske mehanizme koji su dobro očuvani među različitim vrstama kvasaca i ostalih gljiva. Pretvorba FUN 1 iz difuzne zelene fluorescentne intracelularne mrljice u kompaktne narančasto-crvene intravakuolarne strukture zahtjeva metaboličku aktivnost i intaktnu plazma membranu kvasaca. Metabolički aktivne stanice imaju jasno definirane fluorescentne intravakuolarne strukture, dok mrtve stanice imaju difuznu zeleno-žutu fluorescenciju. Stanice s neoštećenom membranom s malo ili nimalo metaboličke aktivnosti imaju difuznu zelenu citoplazmatsku fluorescenciju. Relativna metabolička aktivnost stanica kvasaca može se izmjeriti fluorometrom. Ova metoda omogućava istraživačima brzo, jednostavno i kvantitativno razlikovati žive i mrtve stanice. (13)

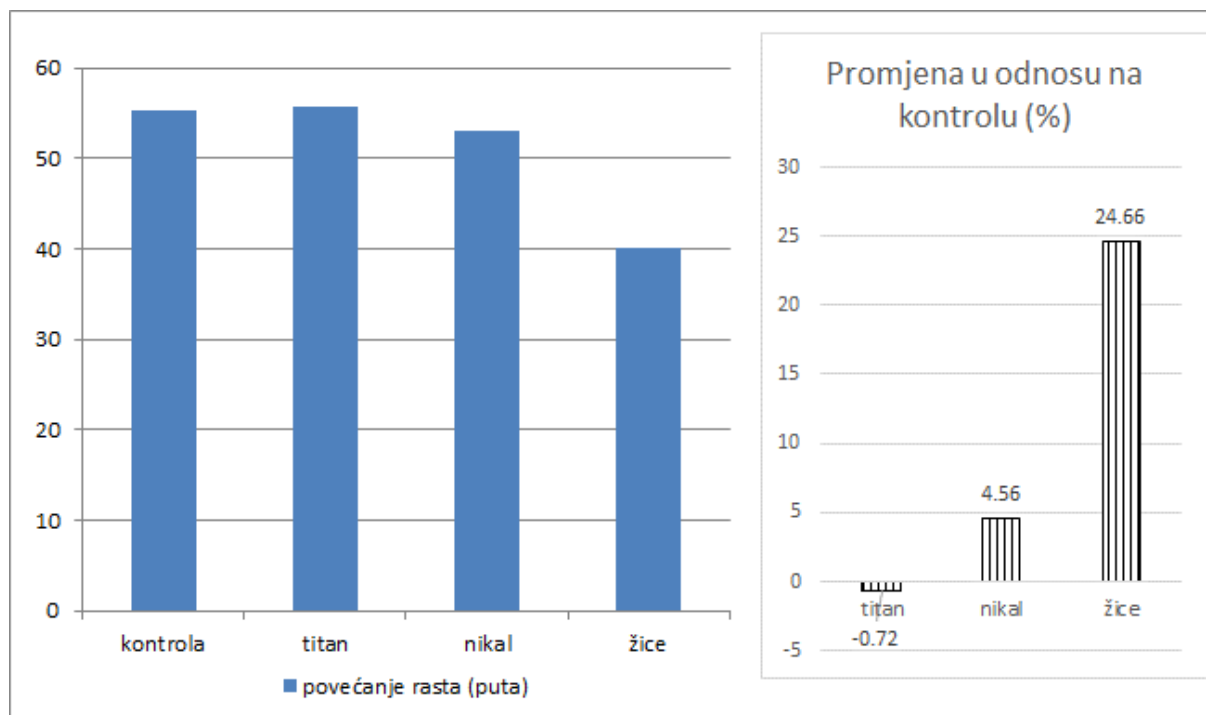
3.2.5. Statistička analiza

U ovom istraživanju korištena je osnovna statistička analiza, izračun srednje vrijednosti i standardne devijacije.

4. Rezultati

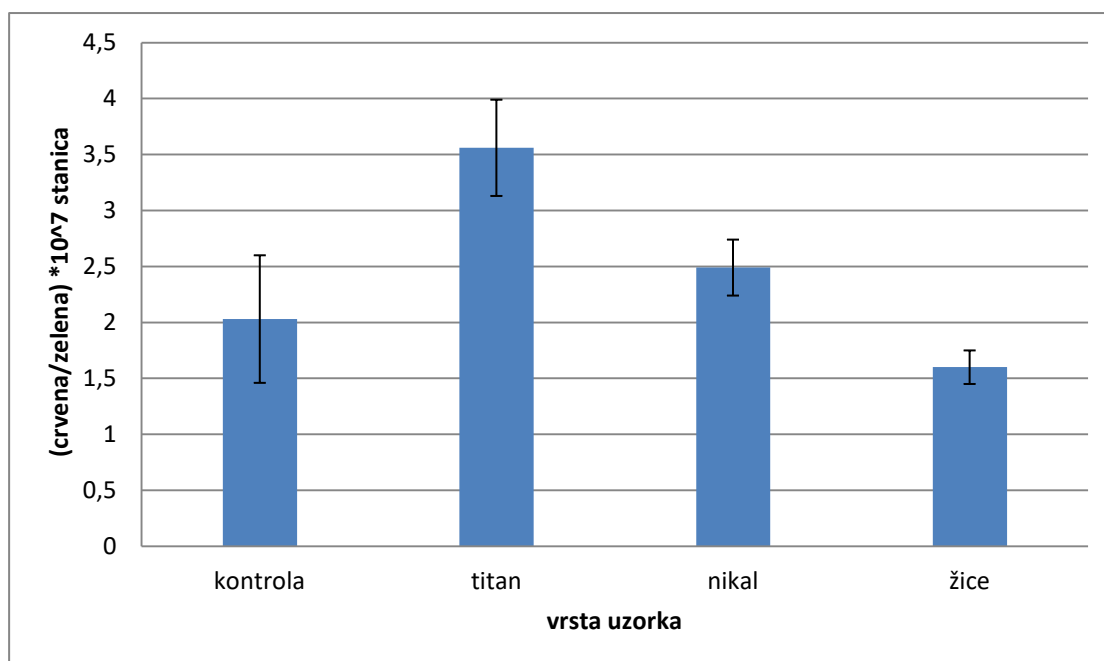
4.1. Povećanje broja stanica nakon 20 sati uzgoja na podlozi

Prikaz povećanja broja stanica kontrolne skupine i tretiranih skupina nakon 20 h uzgoja na podlozi prikazan je slikom 3.



Slika 3 Grafički prikaz povećanja broja stanica kvasca nakon 20 h uzgoja na podlogama. Na lijevoj je strani, uz kontrolnu (netretiranu) skupinu, prikazan porast na podlozi u koju je dodana ortodontska žica, ioni nikla i ioni titana. Na desnoj strani je prikazana navedena promjena u broju stanica izračunata prema kontroli, a izražena postotkom.

4.2. Fluorimetrijsko određivanje metaboličke aktivnosti



Slika 4 Prikaz omjera crvene i zelene boje fluorimetrijskim određivanjem metaboličke aktivnosti. Što je veći omjer crvenih i zelenih stanica to je veća konverzija boje iz zelenih mrljica u crvene CIVS strukture, što zapravo označava veći broj živih metabolički, aktivnih stanica i mrtvih stanica.

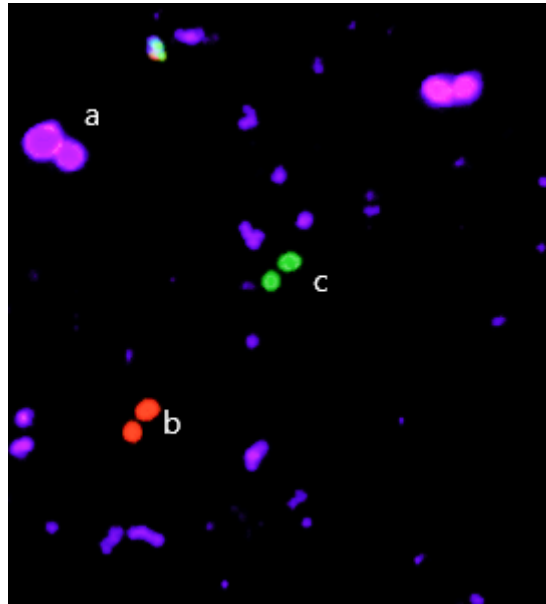
4.3. Mikroskopsko određivanje metaboličke aktivnosti

Tablica 1. Metabolička aktivnost stanica tretiranih s Ni^{2+} , Ti^{4+} i žicom te kontrolne, netretirane stanice mjerena fluorescentnim mikroskopom. Stanice su obilježene dvjema bojama, FUN- 1 i Calcofluor white. Stanice s neoštećenom membranom ali s malom ili čak nimalo metaboličke aktivnosti daju intenzivnu crvenu fluorescenciju, a mrtve stanice daju zelenu fluorescenciju.

| | % od ukupnog broja stanica | | | |
|---|----------------------------|------------------|------------------|-----------|
| | KONTROLA | Ni^{2+} | Ti^{4+} | ŽICA |
| Metabolički poremećene stanice, ne mogu stvarati CIVS (b) | 7,73 ± 1,78 | 5,21 ± 1,31 | 6,32 ± 1,73 | 9,20±2,32 |
| Zelene, mrtve stanice (c) | 6,83 ± 1,67 | 4,70 ± 1,20 | 6,24 ± 2,19 | 6,94±3,35 |

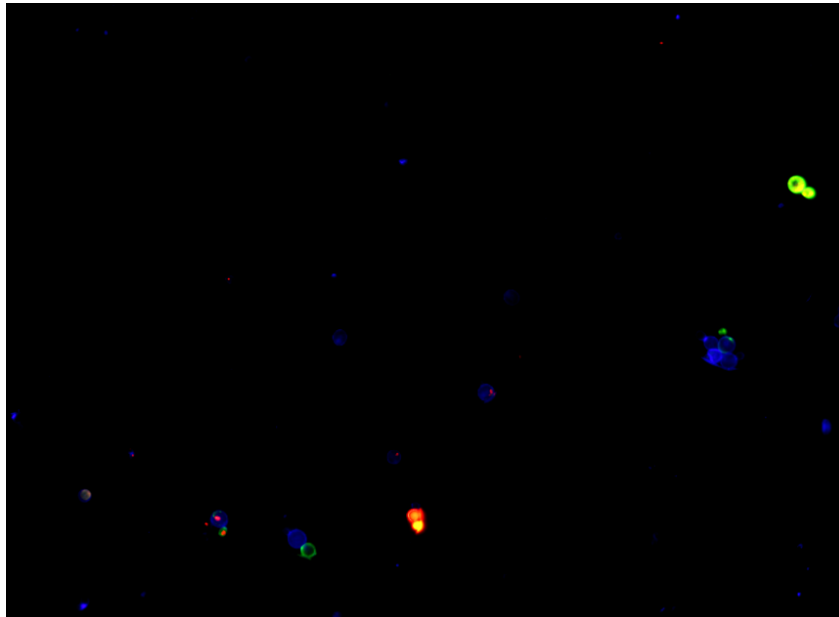
4.3.1. Tretman žicama

Analizom otpuštenih metala nakon 3 dana stajanja žice u podlozi određeno je da se u podlogu otpušta $6.19 \pm 0.44 \mu\text{g/L}$ titana i $27,53 \pm 1,25 \mu\text{g/L}$ nikla.



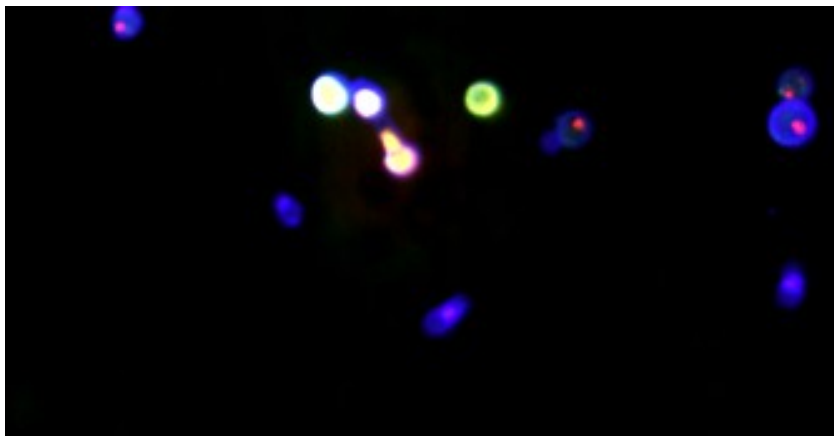
Slika 5. Prikaz stanica pod fluorescentnim mikroskopom obojane FUN bojama nakon tretmana žicom; slovo a prikazuje žive stanice s normalnom metaboličkom aktivnošću, b prikazuje žive stanice s poremećenom metaboličkom aktivnošću, c prikazuju mrtve stanice.

4.3.2. Tretman niklom



Slika 6 Prikaz stanica pod fluorescentnim mikroskopom obojane FUN bojama nakon tretmana niklom (NiCl_2)

4.3.3. Tretman titanom



Slika 7 Prikaz stanica pod fluorescentnim mikroskopom obojane FUN bojama nakon tretmana titanom (TiO_2)

5. Rasprava

5.1. Povećanje broja stanica nakon 20 sati uzgoja na podlozi

Nakon 20 sati uzgoja na podlozi uočen je porast broja stanica, i kontrolnih i tretiranih stanica. S obzirom na kontrolnu grupu, stanice tretirane žicom i niklom, odnosno NiCl_2 , broj stanica je manji kao što je prikazano slikom 3. Stanice tretirane žicom porasle su za 24,66% manje nego kontrolne stanice, odnosno netretirana skupina. Stanice tretirane niklom porasle su za 4,56% manje nego kontrolne. Jedini negativni porast, odnosno veći broj stanica, očituje se kod stanica tretiranih posebno titanom (TiO_2). Razlog većem porastu stanica kod tretmana titanom može biti zbog toga što je titan u obliku titan dioksida inertan i nema skoro nikakav učinak na stanice.

5.2. Fluorimetrijsko određivanje metaboličke aktivnosti

Fluorimetrom moguće je odrediti relativnu metaboličku aktivnost stanica kvasaca. Budući da konverzija boje iz zelenih fluorescentnih intracelularnih mrljica u kompaktne narančasto-crvene fluorescentne intravakuolarne strukture zahtjeva metaboličku aktivnost kvasaca, veći omjer crvene/zelene stanice označava više stanice s valjanom metaboličkom aktivnosti već onih s poremećenom metaboličkom aktivnošću ili mrtvih stanica. Najveći omjer uočen je kod stanica tretiranih titanom, odnosno tretman titan dioksidom najmanje je štetio normalnom rastu i razmnožavanju stanica kvasaca. Prema dobivenim podacima u ovom istraživanju, najveći učinak na rast i razmnožavanje kvasaca ima tretman žicama. Mogući razlog tomu je što je tretman žicama zapravo dvojak tretman pošto se iz žice otpuštaju i titan i nikel. Titan koji se otpušta iz žica reaktivniji je od titan dioksida korištenom u zasebnom tretmanu. Bez obzira na dobivene rezultate, D.J. Wever, A.G. Veldhuizen, M.M. Sanders, J.M. Schakenraad i J.R. van Horn ispitivali su kratkoročnu biološku sigurnost Nitinol legure i

potvrdili da je sigurna te nema citotoksičan ni genotoksičan učinak na stanice. Dugoročna biološka sigurnost ove legure još nije istražena. (10)

5.3. Mikroskopsko određivanje metaboličke aktivnosti

Mikroskopskim određivanjem metaboličke aktivnosti stanica kvasaca brojane su stanice koje se očituju zelenom i crvenom fluorescencijom te su brojane stanice pod plavim svjetlom kao ukupan broj stanica. Žive stanice s normalnom metaboličkom aktivnošću vidljive su kao plave stanice s malom crvenom mrljicom unutar stanice. Stanice s poremećenom metaboličkom aktivnošću vidljive su kao izrazito narančasto-crvene fluorescentne stanice, dok su mrtve stanice vidljive kao zelene fluorescentne stanice. Tretman s niklom pokazuje $5,21 \pm 1,31$ % metabolički poremećenih stanica koje ne mogu stvarati CIVS, a $4,70 \pm 1,20$ % mrtvih stanica. Prema istraživanju Eduarda V. Soaresa, Kristela Hebbelincka, i Helene M.V.M. Soares nikal je toksičan pri koncentracijama višim od $500 \mu\text{M}$. No, ipak dokazano je da je toksičnost metala povezana sa slobodnom koncentracijom metala u tijelu više nego s ukupnom količinom metala. (14) $6,32 \pm 1,73$ % metabolički poremećenih stanica i $6,24 \pm 2,19$ % mrtvih stanica određeno je nakon tretmana titanom. U tretmanu sa žicom određen je veći postotak metabolički poremećenih stanica koje ne mogu stvarati CIVS ($9,20 \pm 2,32$ %) i mrtvih stanica ($6,94 \pm 3,35$ %) nego kod kontrolne skupine, čime je potvrđen veći učinak tretmana žicom na metaboličku aktivnost stanica kvasaca.

6. Zaključak

Nitinol legura predstavlja dobar materijal za izradu implantata i sve se više koristi u medicini stoga je bitno znati njegove moguće negativne učinke. Ovim istraživanjem pokazano je da se ioni metala iz ove legure otpuštaju i čine negativan učinak na stanice kvasaca. Zaseban tretman ionima metala koji su sadržani u ovoj leguri, nikel i titan, pokazao je puno manji negativan učinak nego njihov zajednički učinak na metaboličku aktivnost kvasaca koji je moguć nakon otpuštanja iz legure. Ioni nikla i titana mogu poremetiti metaboličku aktivnost stanica kvasaca ili čak u dovoljnim koncentracijama uništiti stanice. Prema ovim podacima preporučljivo bi bilo mijenjanje implantata nakon određenog vremena i briga o tome da se ti implantati ne oštete u procesu ugradnje.

7. Literatura

1. S. Kalenić i suradnici; Medicinska mikrobiologija; Medicinska naklada – Zagreb: 2013.; str. 511.-515.
2. Cletus P. Kurtzman, Jack W. Fell and Teun Boekhout; The Yeast: A Taxonomic Study; 5. izdanje; 2010.; 3. poglavlje
Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/saccharomyces-cerevisiae>
3. S. Kalenić, E. Mlinarić-Missoni i suradnici ; Medicinska bakteriologija i mikologija; 2. izdanje; Zagreb: Merkur A.B.D.; 2005., str. 421.-426.
4. Zijad Duraković i suradnici; Klinička toksikologija; Zagreb: Grafos; 2000., str. 185.-187.
5. Nickel, element; TOXNET- Toxicology data network [Internet]; [Pristupljeno 9.8.2019.]
Dostupno na: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~INDiOV:3>
6. Babar Shahzad, Mohsin Tanveer, Abdul Rehman, Sardar Alam Cheema, Shah Fahad, Shamsur Rehman i sur.; Nickel; whether toxic or essential for plants and environment - A review; Plant Physiology et Biochemistry (2018)
Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30340176>
7. Zierden MR, Valentine AM; Contemplating a role for titanium in organisms; Metallomics 2016.
Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26577470>
8. Golasik M., Herman M., Piekoszewski W.; Toxicological aspects of soluble titanium - a review of in vitro and in vivo studies; Metallomics; Dec. 2016.
Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27714021>

9. 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>
10. D.J. Wever, A.G. Veldhuizen, M.M. Sanders, J.M. Schakenraad and J.R. van Horn; Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy; Elsevier Ltd.; Biomaterials 18 (1997)
Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961297000410>
11. S. A. Thompson; An overview of nickel–titanium alloys used in dentistry; International Endodontic Journal; 1999.
Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2591.2000.00339.x>
12. Dymond JS1.; Methods Enzymol. 2013; *Saccharomyces cerevisiae* growth media; Elsevier Inc.; 2013.
Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24182924>
13. Probes for Yeast Viability; Molecular probes, Inc.; 2001.
14. Soares EV, Hebbelinck K, Soares HM.; Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study; Can. J. Microbiol.; 2003.
Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897827>

8. Prilozi

- Slika 1. Građa blastokonidije; J - jezgra, M - mitohondrij, V - vakuola, ER - endoplazmatksa mrežica, G - Golgijev aparat, GI - glikogenska zrnca* _____ 1
- Slika 2. Bürker-Türk-ova komorica za brojanje stanica.* _____ 13
- Slika 3 Grafički prikaz povećanja broja stanica kvasca nakon 20 h uzgoja na podlogama. Na lijevoj je strani, uz kontrolnu (netretiranu) skupinu, prikazan porast na podlozi u koju je dodana ortodontska žica, ioni nikla i ioni titana. Na desnoj strani je prikazana navedena promjena u broju stanica izračunata prema kontroli, a izražena postotkom.* _____ 15
- Slika 4 Prikaz omjera crvene i zelene boje fluorimetrijskim određivanjem metaboličke aktivnosti. Što je veći omjer crvenih i zelenih stanica to je veća konverzija boje iz zelenih mrljica u crvene CIVS strukture, što zapravo označava veći broj živih metabolički, aktivnih stanica i mrtvih stanica.* _____ 16
- Slika 5. Prikaz stanica pod fluorescentnim mikroskopom obojane FUN bojama nakon tretmana žicom; slovo a prikazuje žive stanice s normalnom metaboličkom aktivnošću, b prikazuje žive stanice s poremećenom metaboličkom aktivnošću, c prikazuju mrtve stanice.* _____ 18
- Slika 6 Prikaz stanica pod fluorescentnim mikroskopom obojane FUN bojama nakon tretmana niklom (NiCl₂)* 19
- Slika 7 Prikaz stanica pod fluorescentnim mikroskopom obojane FUN bojama nakon tretmana titanom (TiO₂)* 19

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 5.11.1997. godine u Vinkovcima. Pohađala sam osnovnu školu August Cesarec u Ivankovu i bila odličan učenik. Nakon toga, 2012. godine, upisala sam se u srednju školu Gimnazija Matije Antuna Reljkovića u Vinkovcima, opći smjer, i završila ju 2016. godine s vrlo dobrim. Na Medicinski fakultet u Rijeci upisala sam se 2016. godine na smjer Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva.