

Potencijalna toksičnost titanija

Dežulović, Lara; Čanadi Jurešić, Gordana

Source / Izvornik: **Medicina Fluminensis, 2021, 57, 341 - 355**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

https://doi.org/10.21860/medflum2021_264888

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:570297>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



Repository / Repozitorij:

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



Potencijalna toksičnost titanija

Potential toxicity of titanium

Lara Dežulović¹, Gordana Čanadi Jurešić^{2*}

Sažetak. Titanij se široko primjenjuje zbog svoje biokompatibilnosti i dobrih biomehaničkih svojstava. Pokazuje dobru sposobnost vezanja za živo tkivo i kosti pa se često upotrebljava za zubne, ortopedske i srčane implantate. Upotrebljava se kao čisti titanij ili kao legura na bazi titanija, gdje dodatak drugog elementa titaniju omogućuje dobivanje boljih svojstava od samoga titanija. Unatoč inertnosti, titanij je i dalje podložan koroziji i otpuštanju štetnih metalnih iona u organizam. Većina studija pokazuje da je titanij izrazito biokompatibilan materijal, međutim određene studije ukazuju da materijali od titanija mogu postati nekompatibilni i prouzročiti štetne učinke. S obzirom na široku upotrebu titanija, javljaju se pitanja o mogućoj štetnosti titanija. Stoga je važno i dalje provoditi toksikološka ispitivanja, pomno procijeniti i ispitati potencijalnu štetnost titanija te provjeriti potencijalne zdravstvene rizike za ljude i za ekosustav.

Ključne riječi: korozija; titanij; toksičnost; zubni implantati

Abstract. Titanium is widely used due to its biocompatibility and good biomechanical properties. Often it is the material of choice for making dental, orthopaedic and heart implants because it has good binding ability to living tissue and bones. It is used as pure titanium or as a titanium alloys, where the addition of another element or more of them allows to obtain better properties than titanium itself. Despite its inertness, titanium is still susceptible to corrosion and the release of harmful metal ions into the body. Most studies show that titanium is a highly biocompatible material, however there are certain studies that show that titanium materials can become incompatible and cause harmful effects. Given the widespread use of titanium, questions arise about its possible harmfulness. It is therefore important to continue to conduct toxicological tests, to carefully evaluate and examine the potential harmfulness of titanium, and to check for potential health risks to humans and the ecosystem.

Key words: corrosion; dental implant; titanium; toxicity

¹Luka Rijeka d.d., Rijeka, Hrvatska

²Zavod za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Rijeka, Hrvatska

***Dopisni autor:**

Izv. prof. dr. sc. Gordana Čanadi Jurešić,
dipl. ing. preh. teh.
Zavod za medicinsku kemiju, biokemiju
i kliničku kemiju, Sveučilište u Rijeci,
Medicinski fakultet, Braće Brancheta 20,
51000 Rijeka, Hrvatska
E-mail: gordanacj@medri.uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Element titanij otkrio je 1795. godine njemački kemičar Martin Heinrich Klaproth. Nazvao ga je prema grčkoj riječi *titanos* što znači „bijela zemlja”, „glina” ili „gips”, a u isto vrijeme označava Titane, bogove iz grčke mitologije, kao simbol snage^{1,2}.

Titanij (Ti) je široko rasprostranjen kemijski element, atomskog je broja 22 i atomske mase 47,867. Ubraja se u lake metale zbog relativne gustoće od 4506 kg/m³. Nalazi se u kemijskoj sku-

Ovaj rad predstavlja pregledni članak o potencijalnoj toksičnosti titanija za ljudsko zdravlje. Rad pruža pregled literature osvrćući se posebno na istraživanja toksičnosti iona titanija oslobođenih iz materijala koji se koriste u izradi zubnih implantata. Iako se smatra biokompatibilnim, u određenim su se studijama pokazali njegovi mogući negativni učinci na ljudsko zdravlje.

pini prijelaznih metala. Deveti je element po zastupljenosti u zemljinoj kori. Srebrnaste je boje te ima poželjna fizikalna i mehanička svojstva, poput specifične visoke čvrstoće uz jako malu težinu odnosno gustoću, žilavost, otpornosti na kemikalije i postojanosti na zraku. Bitno je svojstvo i otpornost na koroziju koja nastaje uslijed visokog afiniteta prema kisiku i prema drugim elementima te u reakciji sa zrakom, kao mnogi drugi prijelazni metali stvara slojeve oksida na svojoj površini. Oksidacijska stanja koja može formirati jesu +4, +3 i +2, od kojih je najčešće +4. Najvažniji oksid titanija je titanijev dioksid (TiO₂), tj. titanijev (IV) oksid koji ima molekulsku masu 79,9 g/mol, točku vrelišta 2972 °C, talište 1843 °C i relativnu gustoću od 4,26 g/cm³ na 25 °C. Titanijev dioksid prah je bijele boje koji je slabo topljiv i ne gori³⁻⁵.

Titanij se široko primjenjuje zbog svojih odličnih svojstava. Primjena mu je započela još u pedesetim godinama prošloga stoljeća: prvobitno se koristio u zrakoplovnoj industriji u kojoj se i danas najviše koristi. Vremenom je došlo do sve veće inženjerske i industrijske primjene. Danas se često koristi u kemijskoj, petrokemijskoj, energetske i arhitektonskoj industriji. Materijal je izbora za izradu svemirskih letjelica te se koristi u bojama,

u kozmetičkim, farmaceutskim i prehrambenim proizvodima, u plastici, za izradu predmeta opće uporabe i sportske opreme, nakita, nalazi se u kremama za sunčanje i pastama za zube. Najčešće se koriste spojevi titanijevog dioksida (TiO₂) i titanijevog klorida (TiCl₄). Budući da se titanij smatra inertnim materijalom pogodnim za bioimplantaciju, u novije se vrijeme sve više koristi u medicinskom i stomatološkom polju: za izradu protetskih implantata, umjetnih zglobova (kuk, koljeno), premosnica i dentalnih implantata^{1-3,6,7,9}. S obzirom na široku upotrebu titanija, javljaju se pitanja o mogućoj štetnosti titanija i njegovim učincima na zdravlje. Stoga se pokušava pomno procijeniti i ispitati potencijalnu štetnost titanija te provjeriti potencijalne zdravstvene rizike za ljude i za ekosustav.

Iako se smatra da je uporaba titanija sigurna, postoje izvješća o problemima uzrokovanim titanijem. Titanij je jedan od najčešće korištenih materijala za zubne implantate iako postoji povremeno odbacivanje implantata od titanija na mehaničkoj i na biološkoj razini. Provedene su određene studije o titaniju i njegovim legurama, kao i materijalima za površinsku obradu materijala kako bi se utvrdilo njihovo toksično djelovanje^{3,4,6}.

Ovaj rad predstavlja pregledni članak o potencijalnoj toksičnosti titanija za ljudsko zdravlje. Rad pruža pregled literature osvrćući se posebno na istraživanja toksičnosti metalnih iona titanija oslobođenih iz stomatoloških materijala koji se koriste u izradi zubnih implantata. Rad je nastao pretražujući pojmove „titanij”, „legure titanija”, „toksičnost”, „korozija”, „biokompatibilnost”, „zubni implantati” i različite kombinacije navedenih pojmova u tražilici PubMed za bazu podataka Medline.

BIOKOMPATIBILNOST

Biokompatibilnost ili bioprihvatljivost definira se kao sposobnost materijala da u dodiru sa živim tkivom ne izaziva oštećenje tkiva ili alergijske reakcije organizma. Ovo je svojstvo neophodno za osiguravanje sigurnog liječenja pacijenata. Materijali koji se ugrađuju u ljudsko tijelo nazivaju se biomaterijalima te moraju biti netoksični i inertni kako ne bi reagirali s okolnim tkivom¹⁰⁻¹².

Potrebno je naglasiti da se početna biokompatibilnost može promijeniti, a to se može dogoditi bilo uslijed korozije i zamora materijala tijekom određenog vremena ili uslijed promjene stanja pacijenta u vidu bolesti ili starenja.

Biomaterijali također moraju posjedovati dobra mehanička svojstva poput tvrdoće i čvrstoće, odnosno elastičnosti, plastičnosti, duktilnosti, rastezljivosti i žilavosti¹³. Metali i njihove legure već dugo privlače zanimanje znanstvenika kao dobar biomaterijal zbog njihove biofunkcionalnosti i integracije u tkiva te razvoja mikrostruktura¹⁴.

Korozija i oslobađanje iona metala

Korozija dolazi od latinske riječi *corrodere* što znači nagrizati i predstavlja elektrokemijski spontani proces koji se definira kao nenamjerno štetno trošenje materijala pod utjecajem okolišnih faktora, a taj nepoželjni proces dovodi do narušavanja svojstava materijala. Nastaje iz dviju simultanih reakcija: oksidacije i redukcije, tijekom kojih dolazi do gubitka metalnih iona. To znači da u tkivnim tekućinama na površini metala dolazi do korozije kao elektrokemijske redoks-reakcije, u kojoj se oksidacija, tj. gubitak elektrona iz metala, povezuje s redukcijom, tj. primanjem elektrona u komponentama elektrolita. Taj se postupak korozije nastavlja sve dok se metal potpuno ne potroši, osim u slučaju pasivizacije, tj. stvaranja zaštitnog površinskog sloja. Stupanj potrošnje bilo kojeg metala ovisi o kemiji otapala u koje je uronjen^{15,16}.

Prema obliku i mjestu razaranja materijala postoje razne vrste korozija: opća, lokalna, selektivna i interkristalna. Opća korozija može ravnomjerno ili neravnomjerno zahvatiti cijelu površinu metala. Kod lokalne korozije razlikujemo pjegastu koja se javlja na većim dijelovima metalne površine i točkastu (jamičastu, engl. *pitting*) koja stvara udubine na usko lokaliziranim žarištima kružnog presjeka, a može se proširiti i ispod metalne površine. Lokalna se korozija može javiti i u kontaktu dvaju elemenata u elektrolitu, pa tako razlikujemo galvaniku kontaktnu koroziju nastalu kada su različiti metali u kontaktu od pukotinske kontaktne korozije nastale kada su dva ista metala u kontaktu. Postoji i interkristalna (intergranularna) korozija koja se širi u dubinu. Često se istodobno

pojavljuju različiti oblici korozije. Moguće je zaštititi materijale i usporiti koroziju elektrokemijskim postupcima i premazivanjem metala antikorozivskom zaštitnom oksidnom prevlakom^{13,15}.

Određeni mikroorganizmi mogu apsorbirati i metabolizirati metal iz legura, pa je moguća i korozija nastala pod mikrobiološkim utjecajem. Također, metabolički nusproizvodi mikroorganizama mogu dovesti do povoljnih uvjeta u usnoj šupljini za stvaranje korozije (npr. niži pH)¹⁵.

Metali i metaloidi mogu štetno djelovati na biološke sustave ako su otrovni ili im se poveća količina iznad određene vrijednosti. Zbog toga svaki organizam ima sustave za izbjegavanje toksičnosti i stjecanje tolerancije kako bi osigurao staničnu zaštitu od esencijalnih metala potrebnih za razne biokemijske aktivnosti. Ukoliko je sustav detoksikacije neispravan mogu nastati brojne bolesti i poremećaji. Toksičnost određenog metala ovisi o njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima, oksidacijskom stanju i mehanizmu njegove apsorpcije te o unutarstaničnoj raspodjeli, interakciji s raznim molekulama i svojstvu da stvara ligande¹⁷.

Toksični metal može imati razne štetne učinke: zbog sposobnosti vezanja na proteine može inhibirati funkcije enzima, poremetiti funkciju proteina odgovornih za regulaciju i napredovanje staničnog ciklusa te dovesti do apoptoze. Metali mogu biti citotoksični i genotoksični. Citotoksičnost je svojstvo metala da razara stanice, utječe na njihov rast i stanični ciklus. Toksičnost metala dovodi do oksidativnog stresa stvaranjem toksičnih razina slobodnih radikala, tj. vrlo reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*; ROS) iz molekularnog kisika. ROS sadrži nesparene elektrone i nastoji se spojiti u stabilne elektronske veze pa tako narušava stabilnost drugih molekula i oštećuje ih pokrećući lančanu reakciju oksidacije proteina, peroksidacije lipida i oštećenja DNA. Većina metala i metaloida slabi su mutageni i ne oštećuju izravno DNA, stoga se genotoksičnost očituje u ometanju procesa popravljavanja DNA. Metali mogu štetno djelovati i na razne druge načine, primjerice ometanjem propusnosti membrane, pogrešnim prevođenjem mRNA i nepravilnim smatanjem proteina^{17,18}.

Usna je šupljina vlažan medij u kojem se zbivaju mnogi biokemijski i mikrobiološki procesi te su

prisutne brze promjene temperature i pH vrijednosti te blago bazična slina, a može se pojaviti i jako kisela regurgitirana želučana tekućina te abrazija zbog konzumiranja određene vrste hrane^{10,13}. Poznato je da može doći do bioloških reakcija uslijed oslobađanja iona metala u usnu šupljinu iz stomatoloških materijala tijekom kratkotrajnog ili dugotrajnog perioda^{11,18}. Za procjenu lokalnih i sistemskih učinaka važno je znanje o otpuštanju različitih elemenata iz stomatoloških materijala u usnu šupljinu¹⁹.

Štetne učinke zbog zubnih metalnih materijala uglavnom uzrokuje korozija, što rezultira oslobađanjem metalnih iona i naknadnim interakcijama metal-protein ili metal-stanica. Parametri potrebni za oslobađanje metalnih iona jesu: vrsta legure, vrsta korozije, sastav i kemijske karakteristike korozivne otopine poput sline, koja pridonosi koroziji zbog fluktuacije pH vrijednosti i temperature, enzimske i mikrobnosti aktivnosti te raznih tvari unesenih u usnu šupljinu hranom i pićem²⁰.

Li i sur. proveli su istraživanje stupnja citotoksičnosti legure titanija koja sadrži Mo, Nb i Si, proizvedene metalurgijom praha. Usporedili su leguru u kompaktnom, čvrstom obliku (engl. *bulk*) s legurom u praškastom obliku, tzv. metalni prah (engl. *powder*). Citotoksičnost su testirali na SaOS₂ stanicama sličnim osteoblastima. Rezultati su pokazali značajno manji stupanj citotoksičnosti u kompaktnom obliku nego u praškastom obliku, zbog znatno niže otpuštene koncentracije metalnih iona u podlogu. Utvrdili su da ioni Ti, Nb, Mo i Si otpušteni iz praškastog oblika dovode do značajne citotoksičnosti. Prema ispitivanju je također ustanovljeno da bi sadržaj Mo trebalo ograničiti u Ti legurama jer je pokazao značajnu citotoksičnost, čak i u kompaktnom obliku²¹.

Uloga vremena bitna je za procjenu otpuštanja metalnih iona jer što je vrijeme izlaganja vlažnom oralnom okruženju duže, materijali imaju veću tendenciju korodirati i oslobađati metalne ione u usnu šupljinu. Oslobađanje metalnih iona može se ubrzati u slučaju galvanske korozije – npr. ako su žica i nosači ortodontskih naprava izrađeni od dviju različitih legura lemljeni zajedno, trenje između žica i nosača ortodontskih naprava pridonosi procesu korozije. Metalni ioni nisu biograđivi i njihovo produljeno oslobađanje može

dovesti do akumulacije u tkivima te imati toksične lokalne i sistemske učinke²². Određeni metali mogu se akumulirati u ljudska tkiva nakon gutanja sline i resorpcije u gastrointestinalnom traktu, nakon difuzije putem membrane u oralnoj sluznici ili nakon migracije na pulpu kroz dentinske tubule¹⁹.

Biokoroziju titanijevih proteza istražili su D. Cadosch i sur. s pretpostavkom da ljudske koštane stanice mogu izazvati nagrizanje metala i oslobađanje metalnih iona. Pokazalo se da kulture osteoklasta na površini titanija mogu lučenjem vodikovih iona, tj. protona, stvoriti okruženje prikladno za koroziju jer na taj način dolazi do sekrecije HCl i snižavanja pH te do destabilizacije zaštitnog oksidnog sloja i nagrizanja metalne površine. Titanijevi ioni mogu se vezati za citoplazmatske i nuklearne stanične strukture te stvoriti stabilne komplekse koji ostaju u osteoklastima. S obzirom na snažan afinitet iona titanija za fosforiliranu staničnu strukturu i vezanja za membranske fosfolipide dolazi do ometanja enzimskih i signalnih putova stanice, poremećenih staničnih funkcija i apoptoze. Nakon stanične smrti moguće je otpuštanje kompleksa titanij-proteina u izvanstanični prostor i ulazak u sistemsku cirkulaciju te izazivanje upalne imunološke reakcije. Oslobađanje titanijevih iona može potaknuti stvaranje osteolitičkih lezija u periprotetičkoj kosti, pridonoseći popuštanju implantata¹⁶.

ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI

Utvrdjivanje biokompatibilnosti, funkcionalnosti i sigurnosti materijala za implantaciju u ljudsko tijelo provodi se složenim postupcima ispitivanja. Potrebno je prvo provesti ispitivanja o akutnoj toksičnosti, citotoksičnosti, genotoksičnosti i supkroničnoj toksičnosti, a zatim ispitati kroničnu toksičnost, karcinogenost i reproduktivnu toksičnost. Biološka istraživanja koja se provode uključuju ispitivanja fizikalnih i mehaničkih svojstava materijala te ispitivanja procjene rizika moguće štete i nastalog učinka. Ispitivanja se izvode: testovima *in vitro* na kultiviranim stanicama u umjetno stvorenom okruženju, testovima *in vivo* koji se izvode na životinjama i testovima u kliničkim ispitivanjima. Testiranja moraju biti standardizirana i ponovljiva^{13,15,19,23}.

Ispitivanje biokompatibilnosti materijala u kliničkim ispitivanjima predstavlja izazov i otežano je jer je prirodno okruženje podložno stalnim i naglim promjenama temperature, pH vrijednosti i samog sastava. Temiz i sur. proveli su kliničko ispitivanje otpuštanja iona titanija iz zubnih implantata i posljedične razine titanija u krvi. Obuhvatili su 30 pacijenata (15 žena i 15 muškaraca) kojima su izvadili krv prije i nakon implementiranja zubnih implantata. Dobiveni rezultati nisu ukazali na značajan porast titanija u krvi. Jedina značajna razlika koju su ustanovili bila je veća razina titanija u krvi kod žena u odnosu na muškarce. Istražitelji su to povezali s prisustvom titanijevog dioksida u kozmetičkim, farmaceutskim i prehrambenim proizvodima, koje su žene više koristile od muškaraca²⁴.

Kod kliničkih ispitivanja treba voditi računa o biološkim varijacijama koje su specifične za svakog pacijenta jer to može utjecati na standardiziranje studije. Hafez i sur. proveli su longitudinalno kliničko ispitivanje citotoksičnosti i genotoksičnosti vijaka i žica koje čine fiksne ortodontske naprave. Istraživanje su proveli na stanicama bukalne sluznice, uspoređujući pacijente s kontrolnom skupinom tijekom razdoblja od šest mjeseci. Rezultati su ukazali na značajan porast iona metala u stanicama pacijenata, što je dovelo do smanjenja održivosti stanica i oštećenja DNA. Metalni ioni interferiraju s mnogim zaštitnim i reparativnim putovima koji održavaju staničnu homeostazu i integritet DNA. Različite kombinacije metala iz kojih su sastavljeni vijci i žice dovele su do različitih učinaka. Kombinacija vijaka od titanija sa žicama od nikla i žicama od titanija pokazala je citotoksičnost i genotoksičnost. Usprkos biokompatibilnosti titanija došlo je do bioloških promjena kada su se vijci od titanija kombinirali sa žicama od različitih elemenata²⁵.

U studijama *in vivo* stomatološki materijali proučavani su kod pasa, majmuna i svinja. Iako se specifična anatomija ovih vrsta prilično razlikuje od ljudske, reakcije tkiva prilično su slične²³. Studije *in vivo* korisne su u objašnjavanju kako se ortodontski materijali ponašaju u svom stvarnom okruženju, ali je interpretacija rezultata otežana zbog mnogih čimbenika koji nisu pod eksperimentalnom kontrolom²⁵.

Modeli staničnih kultura *in vitro* mogu se koristiti u preliminarnoj procjeni biokompatibilnosti materijala, odnosno za testiranje citotoksičnosti i genotoksičnosti. Ovakva su se ispitivanja pokazala vrlo korisnima u proučavanju staničnih funkcija. Zbog relativne jednostavnosti pružaju lakši pristup u istraživanju jer se koristi umjetno okruženje koje ima ipak viši stupanj stabilnosti nego prirodno okruženje. Koroziji metala pridonose brojni biološki čimbenici poput sastava sline i prisutnosti mikroorganizama te konzumacije kisele hrane i pića. Habanje je još jedan važan čimbenik koji može ubrzati korozivne procese. Rezultati dobiveni u ispitivanjima *in vitro* ne odražavaju nužno kliničke uvjete, stoga ih treba ispravno tumačiti i točno ekstrapolirati te ih smatrati isključivo indikativnima. Važno je usporediti ih s rezultatima dobivenim u kliničkim ispitivanjima, zato valja provoditi ispitivanja istovremeno u uvjetima *in vitro* i u kliničkim uvjetima. To bi se pokazalo prilično korisnim ukoliko bi se otkrio specifičan biološki odgovor tijekom kliničkog testiranja kojeg bi trebalo dodatno i pomnije istražiti^{13,19,20,23}.

Postoje razni modelni organizmi koji se koriste za provođenje istraživanja o biološkim procesima koji se zbivaju u višim živim bićima, prevladavajući tako eksperimentalna i etička ograničenja u *in vivo* i u kliničkim ispitivanjima. Karathia i sur. usporedili su biološke procese u različitim organizmima koristeći biološke ortologe gena kako bi utvrdili hoće li dva organizma biti međusobno usporediva, odnosno može li određeni modelni organizam biti prikladan za korištenje u proučavanju viših organizama. Usporedili su kvasac *S. cerevisiae* sa 704 druga organizma. Razmatrajući ovaj jednostanični eukariotski mikroorganizam, njegove proteine i sličnost s organizmom kojeg se želi proučavati, može se zaključiti da je kvasac idealan modelni organizam²⁶. Zbog toga je pupajući kvasac jako bitan za znanost jer je pridonio razumijevanju osnovne biologije eukariota te je najjednostavniji model za proučavanje odnosa genotipa i fenotipa u eukariotskim stanicama. Ima brojnih prednosti: relativno je jeftin, lako se uzgaja te u kratkom vremenskom periodu može pružiti veliku količinu podataka. Eksperimente na genomu koji su izvedivi s kvascem, mnogo je teže izvoditi s ostalim modelnim organizmima^{18,27-29}.

Njegova stanična struktura i funkcionalna organizacija ima mnogo sličnosti sa stanicama organizma viših razina^{11,30,31}. Velika količina gena (30 – 45 %) koji su uključeni u ljudske bolesti ima ortologe kvasca, odnosno funkcionalne homologe^{12,22,30,32}. Yang i Pon proveli su istraživanje o učincima iona metala otpuštenih iz zubnih legura na rast stanica i na funkciju respiratorne aktivnosti mitohondrija kvasca. Budući da je većina toksičnih metalnih iona sposobna izazvati oksidativni stres na stanicama kroz mitohondrijski respirator-

U usnoj su šupljini ortodontski aparati izloženi kemijskim, biološkim i fizičkim agensima koji mogu prouzročiti koroziju i dovesti do oksidacije njihovih metalnih komponenata, otpuštanja metalnih iona u medij te poremećaja stanične oksidoredukcijske ravnoteže.

ni lanac, mitohondriji mogu pridonijeti i biti ciljna meta toksičnosti metala. Dobiveni su rezultati ukazali da su toksični učinci iona metala na rast stanica kvasca slični kao i za stanice sisavaca, a korelira i rangiranje toksičnosti (Hg) > (Ag) > (Au) > (Cu, Co, Ni, Zn) na rast stanica¹⁸. Također, transportni mehanizmi kvasca ključni su za stvaranje i održavanje gradijenata protona i kationa kroz stanične membrane i igraju važnu ulogu u istraživanjima o prijenosu metalnih iona u stanice. Postojanje mnoštva mehanizama za prijenos, korištenje specifičnih supstrata i različitih načina regulacije u samo jednoj stanici opravdava ulogu kvasca kao modelnog sustava za membranski transport u eukariotskim stanicama viših organizama²⁹. Mnoštvo je bioloških procesa koji se mogu proučavati u kvascu: oksidativni stres i starenje stanica, izučavanje i smatanje proteina, prenošenje signala, interakcije protein-protein, genske funkcije i njihova interakcija, regulacija ekspresije gena, stanični ciklus, metabolizam stanica, apoptoza^{26-28,30}. Budući da kvasac dijeli biokemijske i genetske sličnosti s višim organizmima, to omogućuje istraživanje mnogih znanstvenih pitanja od kliničkog interesa, uključujući i izučavanje neurodegenerativnih bolesti gdje se pokazao kao jako prikladan model u provedbi istraživanja na mitohondrijima^{12,33,34}.

Kvasac se pokazao izvrsnim modelom u istraživanju aspekata biologije metala, učinaka nastalih djelovanjem metala, procesa tolerancije i detoksikacije te djelovanja regulatornih mehanizama. U stjecanju tolerancije na metal uključuje se širok spektar bazalnih staničnih funkcija. Postoji mogućnost da metali na neki način aktiviraju transkripcijske faktore i signalne proteine te na taj način uđu u stanicu, što još nije u potpunosti razjašnjeno¹⁷.

Procjene citotoksičnosti metala uglavnom se najprije provode testiranjem oslobađanja metalnih iona iz materijala uronjenih u otopinu pri neutralnom pH zbog kompatibilnosti s fiziološkim uvjetima. Nakon toga ispituju se učinci na stanice tih iona oslobođenih u medij. Iako se uglavnom za procjenu citotoksičnog učinka stomatoloških materijala koriste kultivirane stanične linije poput fibroblasta i osteoblasta²⁰, i kvasac se pokazao dobrim modelnim organizmom za tu vrstu istraživanja^{11,12}.

STOMATOLOŠKI MATERIJALI

Usna šupljina predstavlja izazovan medij zbog biokemijskih uvjeta poput vlažnosti, brzih promjena temperature i pH, abrazije nastale od određene hrane, djelovanja blago bazične slinje i jako kisele regurgitirane želučane tekućine te zbog mikrobioloških uvjeta prisutnih u ustima^{10,13}. Ortodontske naprave izrađuju se od različitih dijelova koji se spajaju zavarivanjem ili lemljenjem. Materijali za njihovu izradu moraju posjedovati određena fizikalna i mehanička svojstva, a izrađeni su od metalnih legura poput nehrđajućeg čelika, nikal-titanija, čistog titanija, kobalt-kroma²². U usnoj šupljini ortodontske su naprave izložene kemijskim, biološkim i fizičkim agensima koji mogu prouzročiti koroziju i dovesti do oksidacije njihovih metalnih komponenata te poremećene stanične oksidacijsko-redukcijske ravnoteže³⁵. Mogu se pojaviti lokalne ili sistemske reakcije preosjetljivosti i alergije. Otpušteni metalni ioni mogu se lokalno i sistemski raspodijeliti i imati ulogu u etiologiji oralnih i sistemskih patoloških stanja. Toksične učinke može prouzročiti živa iz zubnih amalgama te elementi iz raznih legura kao što su bakar, kositar, zlato, paladij, kobalt i krom, a nikal predstavlja čest alergen^{10,19,20}.

Kako bi se izbjeglo štetno djelovanje, citotoksičnost, genotoksičnost i reakcija preosjetljivosti, pokušava se pronaći što bolji materijal za izradu stomatoloških materijala koji bi bio inertan, stabilan i trajan, da što manje reagira s vlažnim okolišem u usnoj šupljini te da nije štetan. Stomatološki materijali moraju posjedovati svojstva prirodnih tkiva koja se zamjenjuju^{10,13}.

Švedski znanstvenik Branemark je 1960-ih godina definirao oseointegraciju, učvršćivanje umjetnog korijena u kost pacijenta i tako doveo do razvoja prvih implantata. Zubni se implantati primjenjuju za nadomještanje izgubljene prirodne trajne denticije kako bi se povratila funkcija žvakanja i pridonijelo estetici^{9,36}. Važno je postići pravilnu funkciju implantata tako da mogu održavati dinamička i statička opterećenja kojima su izloženi, a također implantati moraju biti takvi da je vrijeme zacjeljivanja što kraće, moraju imati nisku mogućnost pojave kvarova i minimalnu nelagodu za pacijente prilikom ugradnje i u fazi zacjeljivanja te ne smiju biti štetni⁵. U studijama o biološkim i mehaničkim aspektima implantacijskih sustava izvještava se da alergijski odgovor na materijale može dovesti do zatajanja implantata. „Kvar” implantata može također nastati i zbog loše oralne higijene te taloženja plaka i kamenca oko implantata⁶.

Postoje studije o biokompatibilnosti materijala ortodontskih naprava u kojima se analiziralo oslobađanje metalnih iona u umjetnu slinu pri niskim ili neutralnim pH-vrijednostima. Kako su u osnovi svi metali koji izgrađuju ortodontske sustave prijelazni metali (željezo, krom, kobalt, molibden, nikal i titanij), oni stvarajući velike količine ROS-a, mogu dovesti do oksidacijskog stresa koji narušava staničnu redoks-homeostazu i posljedično oštećuje biomolekule (lipide, proteine i DNA)²².

U današnje vrijeme titanij je jedan od najčešće korištenih materijala za zubne implantate, a niska gustoća titanija omogućuje stvaranje laganih proteza velike čvrstoće. Odljevci od titanija obično se koriste za izradu krunica, okvira mostova i cijelih ili djelomičnih okvira proteza te zubnih implantata⁹. Može se koristiti kao komercijalno čisti titanij i kao titanijeva legura. Komercijalno čisti titanij ima čvrstoću jednaku jačini nehrđajućeg čelika s upola manjom gustoćom. Posjeduje najveću for-

mabilnost i izvrsnu otpornost na koroziju i visoku temperaturu. Legure na bazi titanija nastaju dodavanjem drugih elemenata čistom titaniju kako bi mu se poboljšala svojstva. Obično se dodaju: aluminij, berilij, kadmij, kobalt, krom, bakar, željezo, mangan, molibden, nikal, paladij i vanadij². Uglavnom vlada mišljenje da je titanij, zbog svojih fizikalnih i kemijskih svojstava, jedan od biološki najkompatibilnijih metalnih materijala za izradu zubnih implantata⁹. Zaštita od korozije nastaje zbog sposobnosti da na svojoj površini tvori stabilan, kompaktan i netopiv zaštitni oksidni sloj¹⁰. Može stvoriti nekoliko oksidnih konfiguracija (TiO, TiO₂ i Ti₂O₃), od kojih je titanijev dioksid (TiO₂) najstabilniji i najčešće nastali oksid. Iako površinski zaštitni sloj dovodi do pasivizacije, često nije trajan jer je osjetljiv na mehaničke i na kemijske podražaje, pri čemu korozijska otpornost opada. U fluoriranom i kiselom okruženju povećava se osjetljivost na koroziju i to dovodi do probijanja visoko zaštitnog titanij-oksidnog sloja. Prehrana bogata natrijevim kloridom i kiselim gaziranim pićima te paste za zube i vode za ispiranje usta koje sadrže fluor pridonose koroziji¹⁵.

Iako se titanij smatra veoma poželjnim materijalom, povremeno može doći do problema na mehaničkoj i na biološkoj razini. Mehanički problemi nastaju zbog razgradnje materijala u samom implantatu, a biološki se problemi mogu pojaviti zbog oslobađanja iona iz implantacijskog sustava⁶.

POTENCIJALNA TOKSIČNOST TITANIJA

Uz biokompatibilnost, titanij posjeduje i dobra biomehanička svojstva, odnosno ima dobru sposobnost vezanja za živo tkivo i kost¹⁰. Trenutno se za medicinske i stomatološke materijale koriste najviše komercijalno čisti titanij te legure plemenitih metala na bazi titanija i legure neplemenitih metala na bazi titanija^{2,20}. Najčešće korištena legura na bazi titanija je titanij-aluminij-vanadij legura (Ti-6Al-4V), a često se koriste i nikal-titanij (Ni-Ti) i titanij-molibden (Ti-Mo) legure^{1,6}. U novije vrijeme dobra mehanička svojstva pokazuju i legure na bazi titanija bez vanadija (Ti-6Al-7Ni i Ti-5Al-3Mo-4Zr). Stvaranje legura dodatkom određenog elementa titaniju omogućuje manipuliranje njegovim svojstvima radi dobivanja optimalnih svojstava².

Iako su titanij i njegove legure pokazali veliku otpornost na koroziju, i dalje je ona moguća uslijed bioloških i elektrokemijskih procesa u usnoj šupljini⁶. Generalno vlada mišljenje da titanij nema toksičnih učinaka na humane fibroblaste i da ne dovodi do upalnog odgovora u tkivima oko ugrađenog titanija⁷. Stupanj korozije za titanij znatno je manji od maksimalno prihvaćene brzine korozije za primjenu biomaterijala: < 0,02 mm/g u usporedbi s 0,13 mm/g². Međutim, zabilježeno je da materijali od titanija mogu postati nekompatibilni i prouzročiti štetne učinke^{37,38}. Znanje o fizikalno-kemijskom stanju elemenata oslobođenih uslijed korozije od velike je važnosti za toksikološku procjenu legura.

Lee i sur. istražili su učinak iona metala oslobođenih elektrokemijskom galvanskom korozijom na mišje fibroblaste L-929. Iako nisu ispitivali cjelokupno intraoralno okruženje, slinu i mikroorganizme, došli su do zaključka da ukoliko su Ni-Cr legure bile u kontaktu s titanijem, dolazi do smanjenog staničnog rasta, zato što galvanska korozija dovodi do bržeg oslobađanja iona metala (Ni, Cr, Mo, Be i Ti), izazivanja citotoksičnosti i fizioloških nuspojava na tkivu³⁹.

Ortiz i sur. u svom su istraživanju testirali tri vrste iscrpina metala i pratili njihov utjecaj na vijabilnost i oštećenje DNA na stanicama humanih fibroblasta 142BR. Iscrpine su pripremili iz ortodontskih nosača i bravica izrađenih od triju vrsta materijala, odnosno od nehrđajućeg čelika, titanija (sastava: 99 % Ti i 1 % Cr) i legure na bazi titanija bez nikla s tragovima C, Si, Mn, Cr, Mo. Nakon 30 dana u svakoj su iscrpini odredili udio i vrstu metalnih iona koji su se otpustili te su utvrdili da su količine i vrste metalnih iona bile različite od deklariranih (početnih). Iscrpina od nehrđajućeg čelika pokazala je najveću toksičnost, dok iscrpina od titanija nije imala toksičan učinak na fibroblaste. Iscrpine s titanijem pokazale su gotovo 1,5 puta veću vijabilnost od kontrolnih medija bez metalnih iona te genotoksičnost jednaku kontrolnoj skupini. Na temelju toga istraživači smatraju da kod materijala presvučenih titanijem dolazi i do manje korozije, a zbog veće vijabilnosti i do hormeze – povoljnog biološkog odgovora na malu izloženost toksinima i drugim stresorima³⁶.

Špalj i sur. ispitali su šest vrsta ortodontskih žica: od nehrđajućeg čelika, Ni-Ti i Cu-Ni-Ti žica, Ni-Ti

žica presvučenih rodijem te Co-Cr i Ti-Mo žica. Umjetna slina u koju su bile uronjene žice igrala je aktivnu ulogu zbog pojave korozije i pasivnu ulogu zbog transporta oslobođenih iona metala do stanica. Toksičnost otpuštenih metalnih iona ispitivali su na staničnim kulturama fibroblasta miša L-929. Ispitivane žice ne izazivaju akutnu toksičnost, ali zato stvaraju slobodne radikale i tako dovode do oksidacijskog stresa. Standardne Ni-Ti žice stvaraju najvišu razinu oksidacijskog stresa i tako pokazuju najmanju biokompatibilnost. Oksidacijski stres vrlo vjerojatno nastaje zbog iona Ni jer je prisutan u visokom omjeru u navedenim žicama (50-60 %). Nešto nižu razinu oksidacijskog stresa stvaraju žice Ni-Ti presvučene rodijem, Cu-Ni-Ti i Co-Cr, dok žice Ti-Mo dovode do najmanjeg stvaranja oksidacijskog stresa. Sve ispitivane žice koje sadrže Ni, pokazuju tendenciju stvaranja oksidacijskog stresa. U Ni-Ti žicama presvučenim rodijem prevlaka rodija djeluje kao zaštita i usporava koroziju te stvaranje oksidacijskog stresa. U Cu-Ni-Ti žicama nizak udio Ni razlog je manjeg izazvanog stresa. Najmanji oksidacijski stres i inhibiciju rasta stanica pokazale su Ti-Mo žice, ali je došlo do niže održivosti stanica, što bi moglo biti posljedica prisutnosti molibdena³⁵. Prema ovom istraživanju, titanij se ne smatra toksičnim nego je toksičnost nastala kao rezultat prisutnosti drugih elemenata u legurama.

Yonekura i sur. proveli su slično istraživanje. Ispitivali su stabilnost ortodontskih Ni-Ti žica, β-Ti (Ti-Mo-Zr) žica, Co-Cr-Ni žica i žica od nehrđajućeg čelika te njihovu osjetljivost na koroziju nakon uranjanja u 0,9-postotnu otopinu NaCl. Količinu oslobođenih iona metala odredili su atomskom apsorpcijskom spektrofotometrijom. Iz Ni-Ti žica i Ti-Mo-Zr oslobodile su se male količine iona Ni i Mo, dok su količine oslobođenih iona Ti bile ispod granice detekcije. Otpornost na koroziju bila je veća kod žica od legura titanija jer je ukupna količina oslobođenih iona metala iz tih žica bila izrazito mala. Uspoređujući testirane žice, Ti-Mo-Zr žica pokazala se najprikladnijom zbog najveće otpornosti na opću i lokaliziranu koroziju⁴⁰.

Iako je otpuštanje iona metala smanjeno zbog površinskog oksidnog sloja, u slučaju njegovog uklanjanja došlo bi do povećanja brzine korozije

te posljedično veće količine oslobođenih iona metala. To može nastati, primjerice, prilikom abrazije ili prilikom ogrebotina nastalih na površini ortodontskih žica zbog njihovog savijanja ili djelovanja sila⁴⁰. Također, niska pH vrijednost nastala uslijed zubnog plaka formiranog od bakterija može prouzročiti pucanje zaštitnog sloja i ubrzanje procesa korozije⁴¹. Jednom kad se zaštitni sloj poremeti ili odvoji od dijela površine, titanij može korodirati jednako kao i drugi metali³⁶. Ortodontski miniimplantati moraju podnijeti velika opterećenja tijekom postavljanja, što može rezultirati lomovima. Čistom se titaniju, stoga, dodaju elementi koji će mu poboljšati svojstva i pojačati čvrstoću. Legura Ti-6Al-4V ima veću čvrstoću i otpornost od čistog titanija, te formirani oksidni sloj na površini legure osigurava otpornost na habanje i koroziju. Međutim, kada se legura ugradi u ljudsko tijelo, mogu se dogoditi promjene u zaštitnom sloju djelovanjem tjelesnih tekućina, prisutnosti različitih aminokiselina i proteina, visoke koncentracije kloridnih iona i niske koncentracije otopljenog kisika te niže pH vrijednosti. Otpušteni metalni ioni mogu se akumulirati u lokalna i udaljena tkiva i dovesti do nuspojava u ljudskom tijelu. Na toj su tematici radili de Moraes i sur. koji su istraživali akumulaciju metalnih iona u tkivima bubrega, jetre i pluća kunića nakon različite vremenske izloženosti. Testirali su ortodontske implantate izrađene od legure Ti-6Al-4V postavljajući ih u tibiju kunića. Koristili su kuniće kao životinjski model zbog dobre korelacije između zečje i ljudske fiziologije, iako treba pretpostaviti da su praćeni vremenski periodi od 1, 4 i 12 tjedana za kuniće otprilike 3, 12 i 36 tjedana za ljude i treba uzeti u obzir razlike u omjerima dimenzije implantata i mase tijela životinje odnosno ljudi. Primijetili su otpuštanje iona Ti, Al, V i njihovo nakupljanje u tkivima. Ti i V dosegli su najviše vrijednosti nakon četiri tjedna, dok se Al konstantno otpuštao u svim vremenskim intervalima. Međutim, nijedna vrijednost metalnih iona nakupljenih u tkivima kunića nije dosegla toksične koncentracije⁴².

Legura Ti-6Al-4V često se koristi za izradu ortodontskih minivijaka. Ta legura stvara površinski oksidni sloj od TiO_2 s malim primjesama Al_2O_3 . Složenom procesu korozije u usnoj šupljini može

podgovati i prisutnost određenih kemikalija poput otopina na bazi natrijevog fluorida, gdje visoke koncentracije fluorida pospješuju koroziju⁶ jer umanjuju otpornost titanija na koroziju⁴³. Da bi to ispitali, Blaya i sur. ortodontske su minivijke izrađene od Ti-6Al-4V legura izlagali fluoridima u oralnom okolišu. Koristili su pokuse preživljavanja kako bi utvrdili citotoksičnost. To su proveli na dva načina: izravnim izlaganjem stanica kvasca *S. cerevisiae* minivijcima u tekućem mediju i neizravnim izlaganjem ionima metala koji su se oslobodili u komercijalnoj umjetnoj slini. Zaključili su da se iz minivijaka u prisutnosti fluoridnih iona ne otpuštaju značajne količine metalnih iona niti one pokazuju citotoksičan učinak³¹. Utjecaj pH vrijednosti na koroziju ispitali su Koike i Fujii testirajući otpornost čistog titanija u organskim kiselinama: mravljoj i mliječnoj kiselini. Pokazali su da niske pH vrijednosti pogoduju otpuštanju iona titanija. Uspoređujući rezultate otpuštanja iona titanija u mravljoj i mliječnoj kiselini, došli su do zaključka da je korozija aktivnija u mravljoj nego u mliječnoj kiselini pri istoj koncentraciji kiseline, što znači da korozivna svojstva titanija izrazito ovise o pH⁴⁴.

Prema istraživanju Reigose i sur. o štetnosti zubnih implantata od titanija nije nastupio toksičan učinak na štakorske stanične linije. Ispitali su tri različita komercijalno dostupna zuba implantata od titanija: ASTM titanij (površina urezana kiselinom), Nobel (anodno oksidirana površina) i 3i titanij (pjeskarena površina). Medij koji su koristili za kulturu stanica bio je sličan oralnom okruženju. Korozijom na metalnoj površini potaknulo se oslobađanje iona titanija, međutim takvo oslobađanje nije utjecalo na održivost stanica. Također, rezultati Comet testa pokazali su da niti jedna vrsta proučavanih zubnih implantata od titanija nije izazvala genotoksičnost⁴⁵.

Ni-Ti legura često se koristi za izradu implantata, proteza, krunica, vijaka, žica i nosača. Postoje studije koje daju različite rezultate o toksičnim učincima navedenih materijala. Dinca i sur. istraživali su citotoksičnost legure Ni-Ti testovima *in vitro* koristeći stanične kulture mikroorganizama kvasca *S. cerevisiae* i bakterija *E. coli*. Mjerali su koncentraciju otpuštenih iona metala u otopinu i zatim proučili rast staničnih kultura. Nisu utvrdili

citotoksičan učinak te su zaključili da su Ni-Ti legure prikladne za upotrebu u stomatološkim i medicinskim napravama¹⁴.

Rincic Mlinaric i sur. objavili su istraživanje o citotoksičnom učinku iona Ni i Ti koji se oslobađaju iz zubnih implantata od legura na bazi titanija⁴¹. Ni-Ti leguru (Ni = 50,4 % i Ti = 49,6 %) izložili su umjetnoj slini te je došlo do korozije i oslobađanja metalnih iona, s time da se oslobodilo više iona nikla od iona titanija. Određivanje citotoksičnog učinka proveli su na staničnim linijama stanica jezika (CAL 27), jetre (Hep G2) i debelog crijeva (Caco-2) izlažući ih titanijevom dioksidu odnosno niklovom kloridu u odgovarajućim koncentracijama. Nije došlo do značajnog citotoksičnog učinka, a otkriveno je da niske koncentracije oslobođenih iona čak i potiču rast stanica. Međutim, pokazalo se da titanij i nikal međusobno imaju sinergistički učinak i tako mogu uzrokovati umjerenu do jaku citotoksičnost pri višim koncentracijama (minimalna ukupna konc. Iznosi 162 µg/L, s pojedinačnim koncentracijama od Ni 75,5 µg/L i Ti 86,5 µg/L). Citotoksičan učinak i stvaranje slobodnih radikala bilo je jače za stanice jezika nego za stanice crijeva i jetre. Zanimljivost u ovom istraživanju jest da povećanje koncentracije iona titanija povećava stvaranje slobodnih radikala nešto više nego u slučaju povećanja koncentracije iona nikla⁴¹.

Izazivanje oksidacijskog stresa uslijed oslobađanja metalnih iona ispitali su Kovač i sur. Istraživanje su proveli na kvascu *S. cerevisiae*, divljeg tipa i dva mutanta s nedostatkom antioksidativnih obrambenih enzima: Δ Sod1, kojem nedostaje superoksid dismutaza (SOD) i Δ Ctt1, kojem nedostaje katalaza (CAT). Uz citotoksičnost tako su mogli istražiti i doprinos nedostatka enzima, koji pružaju obrambeni mehanizam za uklanjanje reaktivnih vrsta kisika. Testirali su legure koje se najčešće koriste za izradu fiksnih ortodontskih naprava: nehrđajući čelik, Ni-Ti, β -titanij i Co-Cr. Sve legure, tj. njihovi metalni ioni, pri koncentraciji od 1000 µM pokazale su citotoksičan učinak, dok su u slučaju mutiranih vrsta čak i koncentracije od 100 µM bile citotoksične. Analizom unutarstanične oksidacije potvrđeno je da je citotoksičnost metalnih iona posljedica stvaranja ROS-a, te posljedičnog oksidacijskog stresa koji

narušava staničnu redoks-homeostazu i oštećuje biomolekule (lipide, proteine i DNA). Prema ovom istraživanju, budući da samo visoke koncentracije oslobođenih metalnih iona iz ortodontskih naprava induciraju citotoksičnost i oksidativni stres, testirane legure mogu se smatrati nisko rizičnima. Međutim, veći se rizik može javiti u bolesnika s nedostatkom antioksidativnih obrambenih sustava²².

U modernoj se stomatologiji za površinsku obradu, tj. oblaganje zubnih implantata na bazi titanija koristi i mnoštvo nanomaterijala⁶. Ugrađivanjem metalnih nanočestica u biomaterijale poboljšavaju se svojstva biomaterijala. U stomatologiji se uz metalne nanočestice (Ag, Ti, Cu, Au, Zn i Zr) najviše koriste nanočestice titanijeva dioksida. Potencijalna opasnost nanočestica je u njihovom otpuštanju iz nanomaterijala dužim stajanjem ortodontskih sustava u ustima. Otpuštanjem nanočestica u slinu i njihovim ulaskom u krvotok može doći i do sustavnih učinaka. O njihovim toksičnim učincima još uvijek se vrlo malo zna⁴⁶. Toksikološka procjena nanočestica stoga je od izuzetne važnosti. Tablica 1 sažeto prikazuje studije testiranja nanočestica, prvenstveno titanijeva dioksida na raznim modelnim organizmima te polučeni toksični učinak.

ZAKLJUČCI

Široka primjena materijala na osnovi titanija opravdava pitanja o upotrebi titanija kao sigurnog elementa. Iako se smatra biokompatibilnim, u određenim su se studijama pokazali njegovi mogući negativni učinci na ljudsko zdravlje. Bitno je poznavati okolnosti u kojima bi titanij mogao izazvati oštećenja, bolesti ili reakciju preosjetljivosti te mehanizme nastanka takvih učinaka.

U stomatološkoj primjeni bitno je testiranje biokompatibilnosti materijala koji se primjenjuju. Najčešće se upotrebljavaju titanij i legure na bazi titanija te je bitno pronaći najprikladniju i najsigurniju leguru koja će biti što manje podložna koroziji i otpuštanju štetnih metalnih iona, koji bi dalje mogli pokrenuti brojne negativne učinke. Što je manja količina otpuštenih iona metala, to je manji rizik za zdravlje. Unatoč prikladnosti titanija koji ima minimalnu bioreaktivnost i minimalno odbacivanje tijela, treba voditi računa i o određenoj

Tablica 1. Prikaz istraživanja toksičnog djelovanja nanočestica titanija

Testirane nanočestice	Modelni organizam	Toksičan učinak	Zaključci	Autori istraživanja
nano TiO ₂ (ZnO i CuO)	kvasac <i>S. cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> Nije se pokazao 	Moguće je da stanična stijenka ometa ulazak nanočestica u stanicu kvasca	Kasemets i sur. ³²
nano TiO ₂	alveolarne epitelne stanice A549 i limfoblastoidne TK6 stanice	<ul style="list-style-type: none"> Neznatna citotoksičnost Oštećenje DNA Genotoksičnost 	Oštećenje DNA može nastati izravnom interakcijom nanočestica s DNA ili neizravnim putem, indukcijom oksidacijskog stresa	El Yamani i sur. ⁴⁷
nano TiO ₂ u usporedbi sa mikro Ti i mikro Ni-Ti	stanice parodontalnog ligamenta (PDL-hTERT stanice)	<ul style="list-style-type: none"> Nano TiO₂ imaju značajnije toksično djelovanje i najveće oštećenjem na DNA (mikro Ni-Ti su toksičnije od mikro Ti) 	Toksični učinci ovise o veličini čestica i učinkovitosti staničnog unosa, ali i o kemijskom sastavu legure	He i sur. ³⁷
nano TiO ₂ , mikro TiO ₂	plućni fibroblasti kineskog hrčka	<ul style="list-style-type: none"> Oštećenje DNA uslijed stvaranja oksidativnog stresa što smanjuje održivost stanica 	Nanočestice u usporedbi s većim česticama mogu potaknuti veće stvaranje ROS-a, što dovodi do oksidacijskog stresa, a dokazana je značajna razlika između učinaka nanočestica i mikročestica (nanočestice su toksičnije)	Hamzeh i Sunahara ⁴⁸
nano TiO ₂ , mikro TiO ₂	izlaganje miševa oralnim putem analiza stanica mozga, koštane srži, jetre, debelog crijeva i testisa	<ul style="list-style-type: none"> Oštećenje DNA u koštanoj srži i jetri Citotoksični učinci u stanicama mozga, koštane srži, debelog crijeva i testisa Apoptoza samo pri visokoj dozi 	Suprotno očekivanjima, rezultati ove studije pokazali su malu razliku između učinaka nanočestica i mikročestica. Obje dovode do navedenih toksičnih učinaka u relativno jednakim mjerama	Sycheva i sur. ⁵⁸
nano TiC, nano TiCN, nano TiO, nano Ti ₂ O ₃ , nano TiO ₂ , nano TiN, nano TiSO ₂	alveolarne HPAEpiC stanice i stanice ždrijela HPPC	<ul style="list-style-type: none"> Oksidativni stres Oštećenje DNA Upala Apoptoza 	Sve testirane nanočestice izazvale su na objema staničnim linijama značajno oštećenje DNA, oksidacijski stres, upalu i apoptozu	Aydn i sur. ⁴⁹
nano TiO ₂ (nano ZnO)	humani epitel HEp-2	<ul style="list-style-type: none"> Modifikacija fosforilacije tirozina Oštećenje DNA 	Dokazan je genotoksičan učinak, došlo je do znatnog povećanja kromosomskih mutacija pri najvišim koncentracijama, dok citotoksičan učinak nije bio značajan	Osman i sur. ⁵⁰
nano TiO ₂	kultivirani ljudski limfociti	<ul style="list-style-type: none"> Blagi citotoksičan učinak Genotoksičnost s UVA izloženosti se pojačava i dovodi do apoptoze 	Nanočestice TiO ₂ i UVA zračenje imaju sinergijski učinak na održivost stanica. UVA zračenje (0,5 J/cm ²) pojačava genotoksične učinke nanočestica TiO ₂ , dolazi do brzog stvaranja ROS-a i aktivacije kaspaze, što značajno povećava apoptotsku staničnu smrt	Kang i sur. ⁵¹
nano TiO ₂ različitih veličina: 5 nm 15 nm < 100 nm	hibridne AL stanice čovjeka i hrčka kojima nedostaje mitohondrijski DNA	<ul style="list-style-type: none"> Manje veličine nanočestica induciraju povećano stvaranje ROS-a i genotoksičnost, dok veće veličine jače stimuliraju apoptotsku smrt stanica 	Mitohondrijska disfunkcija značajno pridonosi toksičnosti izazvanoj nanočesticama TiO ₂ tijekom procesa starenja, ovisno o veličini čestica. Mitohondriji su potencijalan cilj toksičnog odgovora nanočestica TiO ₂ koje uzrokuju oštećenje funkcije mitohondrija i aktivaciju kaspaze, dovodeći do apoptoze i povećane citotoksičnosti	Wang i sur. ⁵²

Testirane nanočestice	Modelni organizam	Toksičan učinak	Zaključci	Autori istraživanja
nano TiO ₂	ljudske amnijske epitelne stanice WISH	<ul style="list-style-type: none"> • Stvaranje ROS-a • Aktivacija kaspaze, što inducira staničnu smrt • Oštećenje DNA 	Oksidacijski stres pokreće oštećenje staničnih membrana i bioloških makromolekula. Pri kritičnoj koncentraciji od 20 µg/ml nano TiO ₂ izazivaju oštećenje DNA. Inhibicija razine antioksidacijskih enzima nastupa pri nižim koncentracijama od 10 µg/ml, dok pri višim koncentracijama nano TiO ₂ mogu negativno utjecati na sposobnost popravljivanja DNA	Saquib i sur. ⁵³
nano TiO ₂	ljudske neuronske stanice SHSY5Y	<ul style="list-style-type: none"> • Nije došlo do smanjene održivosti neuronskih stanica • Genotoksičnost 	Učinci nano TiO ₂ na ljudske neuronske stanice nisu povezani sa stvaranjem ROS-a i oksidacijskog oštećenja te ostaje upitan mehanizam nastanka učinaka: internalizirane nanočestice dovode do promjena u staničnom ciklusu i genotoksičnosti	Valdiglesias i sur. ⁵⁴
nano TiO ₂	tri plućne stanične linije: alveolarne epitelne stanice, endotelne stanice i makrofagi	<ul style="list-style-type: none"> • Neuravnoteženo redoks-stanje i oksidativni stres • Oštećenja staničnih makromolekula: proteini, lipidi i DNA 	ROS dovodi do oksidacijskog stresa koji uzrokuje daljnje fiziološke učinke, uključujući genotoksičnost, upalu i fibrozu, aktivacijom staničnih signalnih putova	Hanot-Roy i sur. ⁵⁵
nano TiO ₂	ljudske alveolarne epitelne stanice A549 i bronhijalne stanice BEAS-2B	<ul style="list-style-type: none"> • Niska citotoksičnost • Oštećenje DNA uslijed oksidacijskog stresa samo pri najvišoj konc. • U BEAS-2B ne dolazi do genotoksičnosti niti do upale, već samo do blage indukcije TNF-α 	Različiti stanični odgovori objašnjavaju se različitim interakcijama nano TiO ₂ s različitim vrstama stanica zbog njihovih specifičnih karakteristika (veličina, naboj i tendencija aglomeracije), zbog sastava specifičnih medija za kulturu i zbog različite stanične osjetljivosti	Ursini i sur. ⁵⁶
nano TiO ₂	ljudske alveolarne epitelne stanice A549 i bronhijalne stanice BEAS-2B	<ul style="list-style-type: none"> • Umjerena citotoksičnost • Oštećenje DNA uslijed oksidacijskog stresa 	Rezultati ukazuju na neizravnu genotoksičnost nano TiO ₂ i toksično djelovanje na sustave popravka DNA u objema testiranim staničnim linijama	Biola-Clier i sur. ⁵⁷
nano TiO ₂	mišje RAW 264,7 stanice i supkronično testiranje na albino miševima oralnom ekspozicijom tijekom 90 dana	<ul style="list-style-type: none"> • Smanjena stanična održivost pri višim dozama • Prisutnost upalnih, nekrotičnih, apoptičnih stanica u jetri i bubrežima • Genotoksičnost 	Oštećenje DNA posljedica je stvaranja ROS-a. Sposobnost nanočestica da izazovu toksičnost na različitim ciljnim mjestima organizma ovisi o njihovom ulasku i prijenosu putem krvi. Genotoksičnost dokazana i u uvjetima <i>in vitro</i> i u <i>in vivo</i>	Chakrabarti i sur. ⁵⁹
nano TiO ₂	dugotrajna izloženost na mužjacima štakora tijekom 90 dana	<ul style="list-style-type: none"> • Smanjenje tjelesne težine • Splenomegalija • Trombocitopenija, leukopenija, neutrofilija i eozinofilija • Značajan porast razina IgG i IgM, stimulacija CD4 + i CD8 + stanica slezene • Povišene razine LDH i smanjena proliferacija limfocita • Značajno oštećenje DNA 	Zabilježen je značajan pad prirasta tjelesne težine kod izloženih štakora jer TiO ₂ može poremetiti regulaciju crijevne funkcije i tako smanjiti sposobnost apsorpcije hranjivih tvari. U hematološkom testiranju značajna je bila trombocitopenija, što ukazuje na poremećaj zgrušavanja krvi. Histopatološka analiza pokazala je infiltraciju neutrofila i eozinofila u slezeni. Aktivacija eozinofila nakon oralne primjene nastaje zbog sposobnost TiO ₂ da izazove alergijsku reakciju tkiva. Kao posljedica neravnoteže u imunološkom sustavu mogu nastati sistemske ili autoimune reakcije. Dugotrajno izlaganje TiO ₂ dovodi do značajnog smanjenja imunološkog odgovora tijela s citotoksičnim i genotoksičnim djelovanjem.	Hasem i sur. ⁶⁰

Testirane nanočestice	Modelni organizam	Toksičan učinak	Zaključci	Autori istraživanja
nano TiN	zametci ribe zebre	• Razvojni toksičnost	Izloženost je dovela do skraćene duljine tijela i smanjene pokretljivosti te je utjecala na razvoj srca, jetre, živaca i drugih organa, a dovela je i do povišene razine ROS-a i smanjenog antioksidacijskog kapaciteta, odnosno smanjene regulacije ekspresije antioksidacijskih gena (nrf2, gclc, gclm, ho-1 i nqo1)	Wang i sur. ⁸

nim okolnostima u kojima se narušava sigurnost titanija te o sinergističkom djelovanju s drugim metalima i tvarima. Stoga je važno i dalje provoditi procjenu biokompatibilnosti titanija kako bi se mogli odrediti uvjeti uporabe ovisno o vremenu izloženosti, vrsti upotrijebljene legure i zdravlju pacijenata.

ZAHVALE

Ovaj je rad sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost, Slovensko-hrvatskim bilateralnim projektom (IPS-2020-01-7418) „Utvrđivanje pojavnosti, uzroka i štetnih učinaka oksidativnog stresa izazvanog uporabom fiksnih ortodontskih naprava”.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju kako ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

- Oshida Y. Introduction. In: Oshida Y (ed). *Bioscience and bioengineering of titanium materials*. Amsterdam: Elsevier Science, 2007;1-8.
- Wood MM, Warshaw EM. Hypersensitivity reactions to titanium: diagnosis and management. *Dermatitis* 2015; 26:7-25.
- Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol* [Internet]. 2013;10. [cited 2021 Feb 10]. Available from: <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-15>.
- Fage SW, Muris J, Jakobsen SS, Thyssen JP. Titanium: a review on exposure, release, penetration, allergy, epidemiology, and clinical reactivity. *Contact Derm* 2016;74: 323-345.
- Turzo K. Surface Aspects of Titanium Dental Implants. In: Sammour R (ed). *Biotechnology – Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life*. London: IntechOpen, 2012.
- Kim KT, Eo MY, Nguyen TTH, Kim SM. General review of titanium toxicity. *Int J Implant Dent* [Internet]. 2019;5. [cited 2021 Feb 16]. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40729-019-0162-x>.
- Velasco-Ortega E, Jos A, Cameán AM, Pato-Mourello J, Segura-Egea JJ. *In vitro* evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of a commercial titanium alloy for dental implantology. *Mutat Res* 2010;702:17-23.
- Wang J, Liu K, Mo C, H Minchenko O, Zhang Y, Chen JR et al. Nano-titanium nitride causes developmental toxicity in zebrafish through oxidative stress. *Drug Chem Toxicol* 2020;9:1-10.
- ADA Council on Scientific Affairs. Titanium applications in dentistry. *J Am Dent Assoc* 2003;134:347-349.
- Mallineni SK, Nuvvula S, Matinlinna JP, Yiu CK, King NM. Biocompatibility of various dental materials in contemporary dentistry: a narrative insight. *J Investig Clin Dent* 2013;4:9-19.
- Limberger KM, Westphalen GH, Menezes LM, Medina-Silva R. Cytotoxicity of orthodontic materials assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dent Mater* [Internet]. 2011;27. [cited 2021 Feb 16]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.01.001>.
- Gonçalves TS, de Menezes LM, Ribeiro LG, Lindholz CG, Medina-Silva R. Differences of cytotoxicity of orthodontic bands assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014;2014. [cited 2021 Feb 16]. Available from: <https://doi.org/10.1155/2014/143283>.
- Katić V, Špalj S. Testing methods of materials to be used in dental medicine. *Med Flum* 2014;50:268-278.
- Dinca VC, Soare S, Barbat A, Dinu CZ, Moldovan A, Stolica I et al. Nickel–titanium alloy: Cytotoxicity evaluation on microorganism culture. *Appl Surf Sci* 2006;252:4619-4624.
- House K, Sernetz F, Dymock D, Sandy JR, Ireland AJ. Corrosion of orthodontic appliances--should we care? *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008;133:584-592.
- Cadosch D, Al-Mushaiqri MS, Gautschi OP, Meagher J, Simmen HP, Filgueira L. Biocorrosion and uptake of titanium by human osteoclasts. *J Biomed Mater Res A* 2010; 95:1004-1010.
- Wysocki R, Tamás MJ. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiol Rev* 2010;34:925-951.
- Yang HC, Pon LA. Toxicity of metal ions used in dental alloys: a study in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Drug Chem Toxicol* 2003;26:75-85.
- Brune D. Metal release from dental biomaterials. *Biomaterials* 1986;7:163-175.
- Geurtsen W. Biocompatibility of dental casting alloys. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:71-84.
- Li Y, Wong C, Xiong J, Hodgson P, Wen C. Cytotoxicity of titanium and titanium alloying elements. *J Dent Res* 2010;89:493-497.

22. Kovač V, Poljšak B, Primožič J, Jamnik P. Are metal ions that make up orthodontic alloys cytotoxic, and do they induce oxidative stress in a yeast cell model? *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020;21. [cited 2021 Mar 7]. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21217993>.
23. Ciocan LT, Miculescu F, Miculescu M, Patrascu I. Biological reactions to dental implants. In: Turkyilmaz I (ed). *Implant dentistry – a rapidly evolving practice*. London: IntechOpen, 2011:505-530.
24. Temiz M, Dayi E, Saruhan N. Evaluation of blood titanium levels and total bone contact area of dental implants. *BioMed Res Int* [Internet]. 2018;4121639. [cited 2021 Mar 21]. Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/4121639>.
25. Hafez HS, Selim EM, Kamel Eid FH, Tawfik WA, Al-Ashkar EA, Mostafa YA. Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: a longitudinal *in-vivo* study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011;140:298-308.
26. Karathia H, Vilaprinyo E, Sorribas A, Alves R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS One* [Internet]. 2011;6. [cited 2021 Mar 21]. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016015>.
27. Botstein D, Fink GR. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* 2011;189:695-704.
28. Botstein D, Chervitz SA, Cherry JM. Yeast as a model organism. *Science* 1997; 277:1259-1260.
29. Kschischo M, Ramos J, Sychrová H. Membrane transport in yeast, an introduction. *Adv Exp Med Biol* 2016;892:1-10.
30. Nielsen J. Yeast systems biology: model organism and cell factory. *Biotechnol J* [Internet]. 2019;14. [cited 2021 Mar 21]. Available from: <https://doi.org/10.1002/biot.201800421>.
31. Blaya MG, Marquezan M, Baptista-Silva A, Hirakata LM, Medina-Silva R. Cytotoxicity evaluation of orthodontic miniscrews. *Saúde* [Internet]. 2017;43. [cited 2021 Mar 24]. Available from: <https://doi.org/10.5902/2236583422559>.
32. Kasemets K, Ivask A, Dubourguier HC, Kahru A. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol In Vitro* 2009;23:1116-1122.
33. Miller-Fleming L, Giorgini F, Outeiro TF. Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Biotechnol J* 2008;3:325-338.
34. Škara J, Nadalin S, Buretić-Tomljanović A, Blagović B. The study of neurodegenerative diseases on yeast model. *Med Flum* 2016;52:14-27.
35. Špalj S, Mlacović Zrinski M, Tudor Špalj V, Ivanković Buljan Z. *In-vitro* assessment of oxidative stress generated by orthodontic archwires. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012;141:583-589.
36. Ortiz AJ, Fernández E, Vicente A, Calvo JL, Ortiz C. Metallic ions released from stainless steel, nickel-free, and titanium orthodontic alloys: toxicity and DNA damage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* [Internet]. 2011;140. [cited 2021 Apr 6]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2011.02.021>.
37. He X, Hartlieb E, Rothmund L, Waschke J, Wu X, Van Landuyt KL et al. Intracellular uptake and toxicity of three different Titanium particles. *Dent Mater* 2015;31:734-744.
38. Dias Corpa Tardelli J, Lima da Costa Valente M, Theodoro de Oliveira T, Cândido Dos Reis A. Influence of chemical composition on cell viability on titanium surfaces: A systematic review. *J Prosthet Dent* 2021;125:421-425.
39. Lee JJ, Song KY, Ahn SG, Choi JY, Seo JM, Park JM. Evaluation of effect of galvanic corrosion between nickel-chromium metal and titanium on ion release and cell toxicity. *J Adv Prosthodont* 2015;7:172-177.
40. Yonekura Y, Endo K, Iijima M, Ohno H, Mizoguchi I. *In vitro* corrosion characteristics of commercially available orthodontic wires. *Dent Mater J* 2004;23:197-202.
41. Rinčić Mlinarić M, Durgo K, Katić V, Špalj S. Cytotoxicity and oxidative stress induced by nickel and titanium ions from dental alloys on cells of gastrointestinal tract. *Toxicol Appl Pharmacol* 2019;10:383.
42. de Moraes LS, Serra GG, Albuquerque Palermo EF, Andrade LR, Müller CA, Meyers MA et al. Systemic levels of metallic ions released from orthodontic mini-implants. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;135:522-531.
43. Noguti J, de Oliveira F, Peres RC, Renno AC, Ribeiro DA. The role of fluoride on the process of titanium corrosion in oral cavity. *Biomaterials* 2012;25:859-862.
44. Koike M, Fujii H. The corrosion resistance of pure titanium in organic acids. *Biomaterials* 2001;22:2931-2936.
45. Reigosa M, Labarta V, Molinari G, Bernales D. Cytocompatibility, cytotoxicity and genotoxicity analysis of dental implants. *J Phys Conf Ser* [Internet]. 2007;90. [cited 2021 Apr 6]. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/90/1/012044>.
46. Agnihotri R, Gaur S, Albin S. Nanometals in dentistry: applications and toxicological implications – a systematic review. *Biol Trace Elem Res* 2020;197:70-88.
47. El Yamani N, Collins AR, Rundén-Pran E, Fjellsbø LM, Shaposhnikov S, Zienolddiny S et al. *In vitro* genotoxicity testing of four reference metal nanomaterials, titanium dioxide, zinc oxide, cerium oxide and silver: towards reliable hazard assessment. *Mutagenesis* 2017;32:117-126.
48. Hamzeh M, Sunahara GI. *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. *Toxicol In Vitro* 2013;27:864-873.
49. Aydın E, Türkez H, Hacımüftüoğlu F, Tatar A, Geyikoğlu F. Molecular genetic and biochemical responses in human airway epithelial cell cultures exposed to titanium nanoparticles *in vitro*. *J Biomed Mater Res A* 2017;105:2056-2064.
50. Osman IF, Baumgartner A, Cemeli E, Fletcher JN, Anderson D. Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEP-2 cells. *Nanomedicine* 2010;5: 1193-1203.
51. Kang SJ, Lee YJ, Kim BM, Choi YJ, Chung HW. Cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in UVA-irradiated normal peripheral blood lymphocytes. *Drug Chem Toxicol* 2011;34:277-284.
52. Wang Ju, Wang Ji, Liu Y, Nie Y, Si B, Wang T et al. Aging-independent and size-dependent genotoxic response induced by titanium dioxide nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci* 2019;85:94-106.
53. Saquib Q, Al-Khedhairi AA, Siddiqui MA, Abou-Tarboush FM, Azam A, Musarrat J. Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicol In Vitro* 2012;26:351-361.
54. Valdiglesias V, Costa C, Sharma V, Kiliç G, Pásaro E, Teixeira JP et al. Comparative study on effects of two differ-

- ent types of titanium dioxide nanoparticles on human neuronal cells. *Food Chem Toxicol* 2013;57:352-361.
55. Hanot-Roy M, Tubeuf E, Guilbert A, Bado-Nilles A, Vigneron P, Trouiller B et al. Oxidative stress pathways involved in cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on cells constitutive of alveolo-capillary barrier *in vitro*. *Toxicol In Vitro* 2016;33:125-135.
 56. Ursini CL, Cavallo D, Freseghna AM, Ciervo A, Maiello R, Tassone P et al. Evaluation of cytotoxic, genotoxic and inflammatory response in human alveolar and bronchial epithelial cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. *J Appl Toxicol* 2014;34:1209-1219.
 57. Biola-Clier M, Beal D, Caillat S, Libert S, Armand L, Herlin-Boime N et al. Comparison of the DNA damage response in BEAS-2B and A549 cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Mutagenesis* 2017;32:161-172.
 58. Sycheva LP, Zhurkov VS, Iurchenko VV, Daugel-Dauge NO, Kovalenko MA, Krivtsova EK et al. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice *in vivo*. *Mutat Res* 2011;726:8-14.
 59. Chakrabarti S, Goyary D, Karmakar S, Chattopadhyay P. Exploration of cytotoxic and genotoxic endpoints following sub-chronic oral exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol Ind Health* 2019;35:577-592.
 60. Hashem MM, Abo-El-Sooud K, Abd-Elhakim YM, Badr YA, El-Metwally AE, Bahy-El-Dien A. The long-term oral exposure to titanium dioxide impaired immune functions and triggered cytotoxic and genotoxic impacts in rats. *J Trace Elem Med Biol [Internet]*. 2020;60. [cited 2021 Apr 6]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126473>.