

# Proteomski izričaj mitohondrija kvasca tretiranog iscrpinama dentalnih materijala

---

**Pedisić, Irinea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:184:108140>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Irinea Pedisić

**PROTEOMSKI IZRIČAJ MITOHONDRIJA KVASCA TRETIRANOG ISCRPINAMA  
DENTALNIH MATERIJALA**

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Irinea Pedisić

**PROTEOMSKI IZRIČAJ MITOHONDRIJA KVASCA TRETIRANOG ISCRPINAMA  
DENTALNIH MATERIJALA**

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

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

Diplomski rad obranjen je dana 28.9.2023. u/na  
Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1.doc.dr.sc. Mirna Petković Didović, dipl.ing.kemije

2.dr.sc. Božena Čurko-Cofek, dr.med

3.prof.dr.sc. Gordana Čanadi Jurešić, dipl.ing.

Rad ima 52 stranice, 29 slika, 7 tablice, 86 literaturnih navoda.

## SAŽETAK

Kvasci, posebno vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, organizmi su od vitalnog značenja za procese fermentacije, a koriste se i u istraživačke svrhe. Jedan od često korištenih sojeva u istraživanju je *Saccharomyces cerevisiae* W303. Mitohondriji kvasaca igraju ključnu ulogu u proizvodnji energije i praćenjem promjena na proteomu mitohondrija (skupu svih ekstrahiranih proteina), dobiva se dobar uvid u funkcionalnost ovih organela. Za proučavanje proteoma mitohondrija često se koristi dvodimenzionalna (2D) elektroforeza. Cilj ovog rada je bio analizirati 2D-proteom mitohondrija kvasca *S. cerevisiae* W303 tretiranog različitim količinama i vrstama metalnih iona eluiranih iz dentalnih naprava. Dentalne naprave, odnosno „ortodontski aparatići“ su danas najčešće korišten oblik ortodontske terapije, a sastoje se od 2 luka, 20 bravica, 20 ligatura i 4 prstena. Iscrpine dobivene eluiranjem metalnih iona iz takvih dentalnih naprava kroz period 3, 7 i 14 dana u kvašćevu podlogu kao medij, dalje su korištene za uzgoj kvasca do rane eksponencijalne faze te pripremu frakcije mitohondrija i proteina u svakoj od frakcija. 2D-elektroferogrami tretiranih mitohondrija obrađivani su i uspoređivani korištenjem programa Dymension (Syngene™ Dymension 2 Software), dok je sadržaj i sastav metalnih iona u iscrpinama određen ICP-MS metodom. U iscrpinama su prevladavali ioni Fe, Ni i Cr, a njihov se sadržaj povećavao s duljinom eluiranja, s maksimumom nakon 14 dana. 2D elektroforezom otkriveno je da tretiranjem kvasca iscrpinama dolazi do promjena na proteinima mitohondrija uključenima i u transport elektrona, sintezu ATP-a te regulaciju oksidativnog stresa.

**Ključne riječi:** 2D-proteom, mitohondriji, proteini, *Saccharomyces cerevisiae*

## SUMMARY

Yeasts, especially *Saccharomyces cerevisiae*, are organisms that are essential for fermentation processes but are also used for scientific purposes. One of the strains commonly used in scientific research is *Saccharomyces cerevisiae* W303. Yeast mitochondria play a key role in energy production, and monitoring changes in the mitochondrial proteome (from all proteins extracted) provides good insight into the functionality of these organelles. Two-dimensional (2D) electrophoresis is commonly used to study mitochondrial proteomes. The aim of this work was to analyze the mitochondrial 2D proteome of the yeast *S. cerevisiae* W303 treated with different amounts and types of metal ions eluted from dental appliances. Dental or orthodontic appliances are the most commonly used form of orthodontic therapy today and consist of 2 archwires, 20 brackets, 20 ligatures, and 4 bands. Eluates obtained by eluting metal ions from such dental appliances over a period of 3, 7, and 14 days into a yeast growth medium were used to grow yeast to early exponential phase and produce fractions of mitochondria and proteins, respectively. 2D electroferograms of the treated mitochondria were processed and compared using Dymension software (Syngene™ Dymension 2), while the content and composition of metal ions in the precipitates were determined using the ICP-MS method. The ions Fe, Ni and Cr predominated in the extracts. Their content increased with the duration of elution and was highest after an elution period of 14 days. 2D electrophoresis showed that treatment of yeasts with eluates leads to changes in mitochondrial proteins, especially those involved in electron transport, ATP synthesis and combating oxidative stress.

**Keyword:** 2D-proteom, mitochondria, proteins, *Saccharomyces cerevisiae*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Kvasci .....	1
1.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	1
1.1.2. Proteom mitohondrija .....	5
1.2. Dvodimenzionalna elektroforeza (2-D elektroforeza) .....	6
1.3. Metali (metalni ioni) i njihova štetnost u ortodonciji .....	8
1.3.1. Elektrokemijska korozija metala u usnoj šupljini .....	9
1.3.2. Metali važni u ortodonciji .....	11
1.3.2.1. Nikal (Ni) .....	11
1.3.2.1.1. Toksičnost nikla u ortodonciji .....	12
1.3.2.2. Krom (Cr) .....	13
1.3.2.2.1. Toksični učinci kroma u ortodonciji .....	14
1.3.2.3. Molibden (Mo) .....	15
1.3.2.3.1. Toksikologija molibdena .....	15
1.3.2.4. Titanij (Ti) .....	16
1.3.2.4.1. Toksičnost titanija .....	17
1.3.2.4.2. Toksičnost titanija u ortodonciji .....	17
1.3.2.5. Željezo (Fe) .....	18
1.3.2.5.1. Toksičnost željeza .....	18
1.4. Oksidativni stres .....	19
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	21
3. MATERIJALI I METODE .....	22
3.1. Materijali .....	22
3.1.1. Radni organizam .....	22
3.1.2. Popis opreme, uređaja i kemikalija .....	22
3.2. Metode .....	23
3.2.1. Priprema eksperimentalnih hranjivih podloga .....	23
3.2.2. Uzgoj kvasaca na podlogama s eluiranim metalnim ionima .....	23
3.2.3. Određivanje broja stanica .....	23
3.2.3.1. Optička gustoća .....	24
3.2.3.2. Brojanje stanica .....	24
3.2.3.3. Određivanje krivulje rasta .....	25
3.2.4. Izolacija mitohondrija .....	26
3.2.5. Izolacija proteina iz mitohondrija .....	27

3.2.6.	Određivanje koncentracije proteina mitohondrija .....	28
3.2.7.	Određivanje koncentracije metalnih iona ICP-MS metodom .....	29
3.2.8.	Dvodimenzionalna elektroforeza.....	30
3.2.8.1.	Prva dimenzija – izoelektrično fokusiranje .....	30
3.2.8.2.	Druga dimenzija – SDS – PAGE elektroforeza.....	32
3.2.9.	Obrada gelova.....	34
3.2.10.	Analiza slika gelova.....	35
4.	<b>REZULTATI</b> .....	36
4.1.	Određivanje vijabilnosti stanica Lunom .....	36
4.2.	Ispitivanje utjecaja otpuštenih metalnih iona na stanice kvasca krivuljama rasta.....	38
4.3.	Određivanje sadržaja i sastava metalnih iona otpuštenih u eksperimentalne podloge .	39
4.4.	Određivanje koncentracije proteina u mitohondrijima kvasaca tretiranih pripremljenim eksperimentalnim podlogama s otpuštenim metalnim ionima .....	40
4.5.	Analiza proteoma mitohondrija kvasca .....	41
5.	<b>RASPRAVA</b> .....	47
5.1.	Određivanje vijabilnosti stanica Lunom .....	47
5.2.	Ispitivanje utjecaja otpuštenih metalnih iona na stanice kvasca krivuljama rasta.....	47
5.3.	Određivanje sadržaja i sastava metalnih iona otpuštenih u eksperimentalne podloge .	48
5.4.	Određivanje koncentracije proteina u mitohondrijima kvasaca tretiranih pripremljenim eksperimentalnim podlogama s otpuštenim metalnim ionima .....	50
5.5.	Analiza proteoma mitohondrija kvasca .....	50
6.	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	52
7.	<b>LITERATURA</b> .....	53
8.	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	64



# 1. UVOD

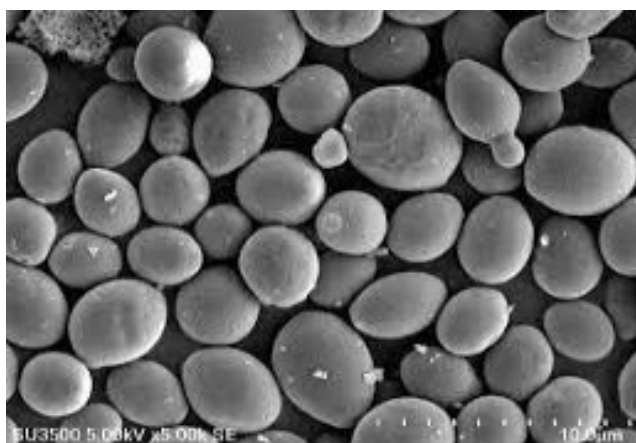
## 1.1. Kvasci

Kvasci su jednostanične gljive koje se nespolno dijele pupanjem ili cijepanjem. Pojedinačna stanica može dosežati 2 – 50  $\mu\text{m}$  u duljinu i 1 – 10  $\mu\text{m}$  u širinu (1). Kako nemaju sposobnost fotosinteze, kvasci su kemoheterotrofi. Svoje hranjive tvari dobivaju izvanstaničnom probavom zahvaljujući aktivnosti enzima, nakon čega slijedi apsorpcija otopljenih produkata razgradnje. (2). Pupanje je najčešći način vegetativnog razmnožavanje kvasaca i tipično je za kvasac poput *Saccharomyces cerevisiae*. Matična stanica se izdužuje od pupoljka do određene veličine i dijeli se na stanice kćeri koje se ne mogu lako odvojiti, ali kad dosegnu određenu veličinu dijele se kao i matična stanica (3).

Lako je uzgajati kvasce u laboratoriju jer većina kvasaca uspijeva u toplim, razrijeđenim, slatkim, kiselim i aerobnim okruženjima. Većina najbolje raste na temperaturi od 20 do 30 °C. Za rast i metabolizam potrebna im je i voda. Većina raste pri pH 4,5 do 6,5. Ekstrakt slada ili ekstrakt kvasca dopunjen peptonom i glukozom (YPG ili YEPG) obično se koristi za održavanje i rast većine kvasaca (4).

### 1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* (pekarski ili pivski kvasac) (Slika 1.) vrsta je jednostanične gljive koje pripada rodu *Ascomicota*, razredu *Hemiascomicete* i redu *Sacchareomicetales*.

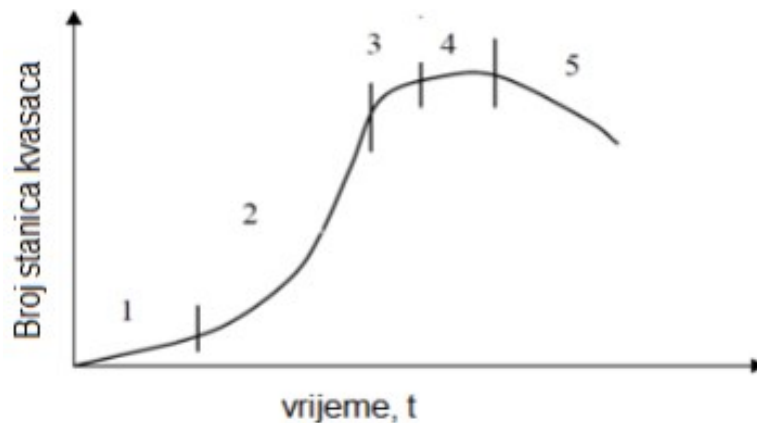


Slika 1. *Saccharomyces cerevisiae* snimljena elektronskim mikroskopom (5).

Ima široku rasprostranjenost, kemoheterotrof je – nema sposobnost fotosinteze pa koristi organske spojeve (glukoza) kao izvor energije pri čemu većinski nastaju etanol i CO<sub>2</sub> –

poznatije kao alkoholna fermentacija. Fakultativni je anaerobni mikrob kojemu nije potreban kisik za rast (6). Hranidbena podloga za uzgoj kvasca *S. cerevisiae* sadrži kao izvor ugljika šećer heksozu (glukoza), kvašćev ekstrakt i peptonsku vodu. Optimalna temperatura za rast je 25 – 35 °C (*Saccharomyces Cerevisiae Growth Media*), uz pH vrijednost 4,5 – 6,5. Krivulja rasta kvasaca, kao što prikazuje Slika 2., ide u sljedećih pet faza:

1. Faza prilagodbe
2. Log (eksponencijalna) faza
3. Post log faza
4. Stacionarna faza
5. Faza ugibanja

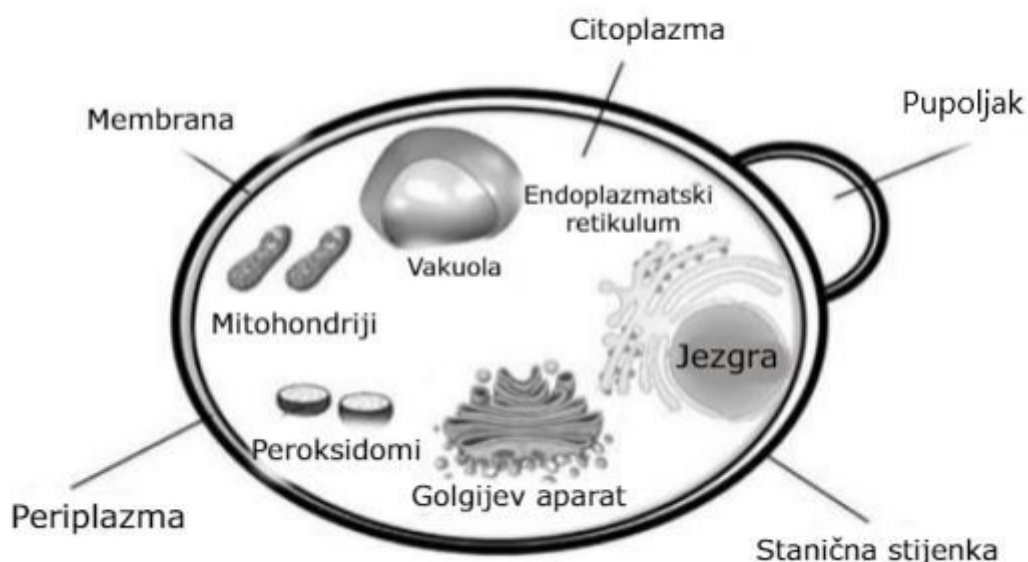


Slika 2. Krivulja rasta kvasaca u pet faza (7).

U prvoj fazi, fazi prilagodbe ne dolazi do rasta broja stanica jer se kvasci prilagođavaju novim uvjetima rasta. U drugoj se fazi postiže se najveće povećanje broja stanica, dok se u trećoj fazi ta brzina rasta smanjuje. Četvrta, odnosno stacionarna faza, predstavlja trenutak kada dolazi do istovremenog nastajanja, ali i ugibanja stanica. Ta faza nastupa kada koncentracija šećera kao limitirajućeg nutrijenta ne može pratiti brzinu rasta kvasaca. U posljednjoj fazi, fazi ugibanja, dolazi do pada broja stanica kvasaca (7). U eksponencijalnoj fazi, stanice kvasca održavaju svoj rast proizvodnjom ATP-a kroz fermentaciju ili disanjem preko mitohondrija. Tijekom fermentacije, koncentracija ugljika upravlja načinom na koji stanice stvaraju ATP. Proučavanje fermentacije i mitohondrijskog disanja bitno je za istraživanje molekularnih mehanizama (8). Glavni izvor proizvodnje energije (ATP) u *S. cerevisiae* je glukoza, a glavni put za pretvorbu glukoze u piruvat je glikoliza. Piruvat ulazi u dva procesa za stvaranje energije: respiracija i fermentacija. U respiraciji, piruvat oksidira do CO<sub>2</sub> putem enzima piruvat-dehidrogenaze i

ciklusa limunske kiseline, a dobiva se ATP i reducirani kofaktori (NADH i FADH<sub>2</sub>) koji u mitohondrijskom matriksu mogu oksidirati i proizvesti više molekula ATP-a. Fermentacijom, piruvat dekarboksilira putem enzima piruvat-dekarboksilazom u acetaldehid, potom pomoću enzima alkohol-dehidrogenaze reducira u etanol. Respiracijom kvasca proizvodi se oko 16 molekula ATP-a po molekuli glukoze, dok putem fermentacije 2 molekule ATP-a po molekuli glukoze. *S. cerevisiae* koristi glukozu ovisno o dostupnosti kisika i izvora ugljika. Iako respiracijom nastaje više molekula ATP, *S. cerevisiae* fermentira glukozu u aerobnim uvjetima, kada je visoka koncentracija ugljika, i takav efekt naziva se Crebtree-ov učinak (9).

Organele (Slika 3.) koje su sadržane u citoplazmi *S. cerevisiae* sadrže topljive proteine i druge makromolekule, zajedno s metabolitima niske molekularne mase. Dodatno, u citoplazmi se mogu naći ribosomi, proteosomi, lipidne čestice i citoskelet koji daju stabilnost citoplazmi. Stanična stijenka kod *S. cerevisiae* zauzima oko 15 % ukupnog volumena i glavna uloga stanične stijenke je kontrola osmotskih i propusnih svojstava stanice. Ako gledamo od unutrašnje prema vanjskoj strani, citosol kvasca okružen je membranom, periplazmatskim prostorom i staničnom stijenkom. Kada se ukloni stanična stijenka nastaju protoplasti koji mogu regenerirati stijenku (9). Stanična stijenka dakle predstavlja egzoskelet koji štiti protoplast od vanjskog okoliša i definira smjer rasta, čvrstoću i oblik stanice. Sastoji se od polisaharida (pretežno β-glukana), proteina, lipida, hitina i anorganskog fosfata (1).



Slika 3. Stanica kvasca i organele (10).

Membrana kvasca se može opisati kao lipidni dvosloj koji sadrži proteine potrebne za sintezu

stanične stijenke, prijenos signala i transport proteina. Membrana *S. cerevisiae* debela je oko 7,5 nm. Lipidne komponente se sastoje od fosfolipida i sterola. Kao i stanična stijenka i membrana mijenja svoju strukturu i funkciju ovisno o uvjetima rasta (9).

Citoplazma kvasca je mjesto stanične aktivnosti i prostor za unutarstanični promet – vodenasta, blago kisela (pH 5,2) koloidna tekućina koja sadrži spojeve kao što su proteini, glikogen i druge topljive makromolekule. Mnoge funkcije se provode u citoplazmi kao što je sinteza masnih kiselina i sinteza komponenti enzima za biosintezu proteina (9).

Citoskelet obuhvaća mikrotubule i mikrofilamente, dinamičke strukture koje obavljaju mehanički rad u stanici slaganjem i razdvajanjem pojedinih proteinskih podjedinica. Mikrotubuli i mikrofilamenti sudjeluju u mitozu i mejozi (9).

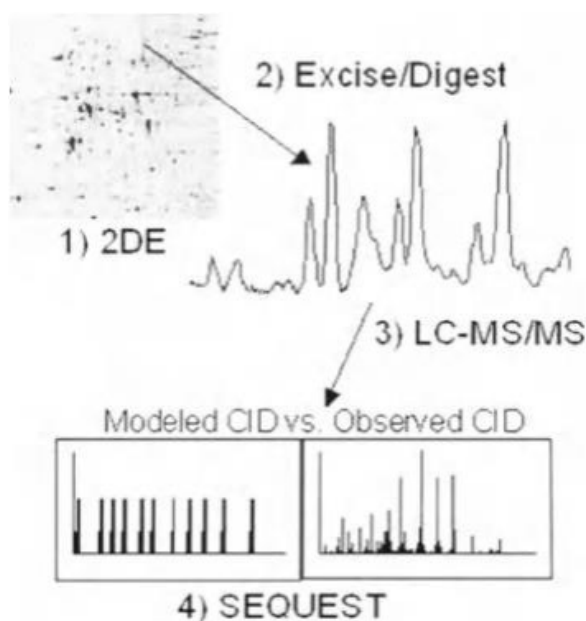
Jezgra kvasaca je okrugla organela oko 1,5  $\mu$ m smještena u središtu stanice ili ekscentrično. Okružena je dvostrukim membranskim slojem čime se odvaja od citoplazme. Jezgra se tijekom mitoze ne odvaja kao što je slučaj kod eukariotskih stanica (9). Jezgrica je gusta regija unutar jezgre koja nestaje tijekom mitoze i pojavljuje se u interfazi. Jezgrica locira rRNA gene i mjesto je sinteze i obrade rRNA (9).

Endoplazmatski retikulum (ER) organela je koja kontrolira stabilnost, modifikaciju i transport proteina. ER čini 10 % volumena stanice. Proteini se sintetiziraju na ribosomima prenose se na membranu endoplazmatskog retikuluma iz citosola u unutrašnjost endoplazmatskog retikuluma – što je važno za pravilno presavijanje i obradu proteina u endoplazmatskom retikulumu. Proteini iz endoplazmatskog retikuluma pakiraju se u vezikule i prenose na Golgijev aparat. Proteini u Golgijevom aparatu prolaze kroz različite obrade i sinteze dodavanja šećera ili lipida kako bi se formirali glikoproteini ili lipoproteini. Takvi proteini se sortiraju i pakiraju u vezikule i prenose do odredišta ili izlučuju iz stanice putem egzocitoze (9).

U mitohondrijima se događaju važni katabolički proces kao što su Krebsov ciklus (ciklus limunske kiseline),  $\beta$ -oksidacija masnih kiselina i razgradnja aminokiselina. Ključni su u održavanju visoke razine ATP/ADP-a u stanici koji je potreban za pokretanje biokemijskih reakcija. Krebsov ciklus stvara metaboličke intermedijere koji su uključeni u anabolizam ugljikohidrata, nukleotida, lipida i aminokiselina (11). Dostupnost nutrijenata, kao što su ugljikohidrati, aminokiseline, dušični spojevi određuje razvoj i stope rasta stanica kvasca. Niz preklapajući signalnih mreža usredotočene su na protein kinazu A, kinazu aktiviranu AMP-om informiraju stanicu o dostupnosti hranjivih tvari i utječu na transkripciju, translaciju, posttranslaciju i metaboličke procese u stanici, kao i njihove razvojne oblike. Ali nemamo potpuno razumijevanje uzvodnih komponenti glukoze koja signalizira regulaciju proteina kinazu A ili drugih malih proteina u tom procesu (12).

### 1.1.2. Proteom mitohondrija

Proteom se definira kao kompleks proteina koji se izražava putem genoma organizma. U višestaničnim organizmima proteom se odnosi na proteinski komplement koji je prisutan u tkivima ili diferenciranim stanicama. U obradi i analizi proteoma, najčešći pristupi uključuju jednodimenzionalnu ili dvodimenzionalnu gel-elektroforezu, enzimatsko cijepanje odabranih proteina i masenu spektrometriju peptida. Konačno podaci se tumače i interpretiraju pomoću računalnih tehnika koje pretražuju relevantne baze podataka (13). (Slika 4.)



Slika 4. Shema proteomske analize

(Postupak: 1) odvojeni s 2-DE i vizualizacija bojenjem srebrom; 2) mrlje koje se izrezuju i otapaju s tripsinom; 3) proteini koji su analizirani LC-MS/MS; 4) pretraživanje baze podataka SEQUEST (13))

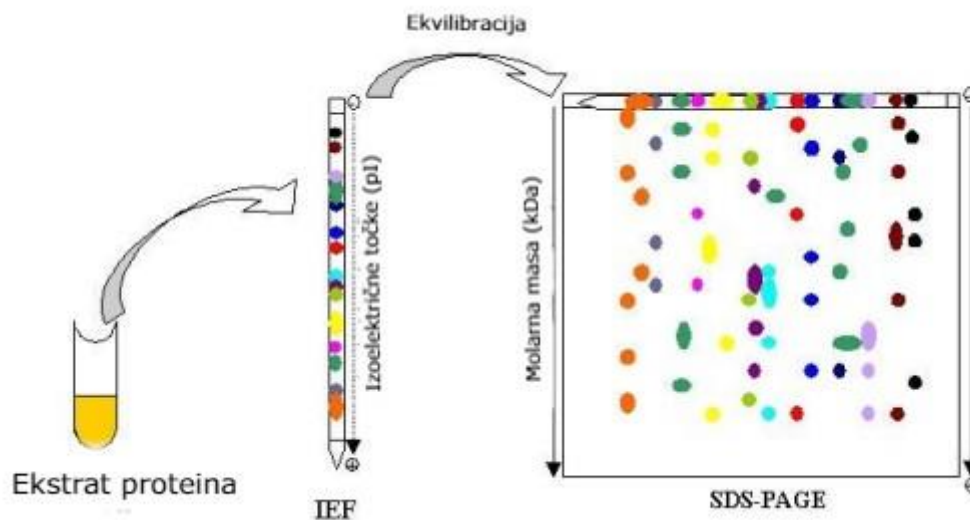
Sekvence proteina brže se identificiraju pomoću masene spektrofotometrije, ali i dalje postoje prepreke koje sprječavaju automatizaciju analize proteoma. Prepreke koje mogu spriječiti završetak analize proteoma su: (13)

- a) nemogućnost umnožavanja proteinskih sekvenci;
- b) posttranslacijske modifikacije;
- c) prisutnost izoformi.

Dodatne komplikacije prilikom analize proteoma mogu nastati zbog dinamičke prirode proteoma i modifikacije u fizikalno-kemijskim svojstvima između proteina kao što su pI, topljivost i veličina proteina (13).

## 1.2. Dvodimenzionalna elektroforeza (2-D elektroforeza)

Još početkom 70-tih godina prošloga stoljeća, dvodimenzionalna elektroforeza (Slika 5.) koristila se kao najbolja metoda razdvajanje proteina. Prvi koji su uveli dvodimenzionalnu elektroforezu su P.H.O'Farrell i J.Klose 1975. godine (14).



Slika 5. Tijek rada dvodimenzionalne elektroforeze (15).

Elektroforezu možemo objasniti kao gibanje čestica u električnom polju, a one zapravo ovise o jakosti električnog polja, svojstvima čestice (naboju, veličini i obliku), sredini u kojoj se gibaju (ionska jakost, viskoznost, temperatura) (16). Veliki broj čimbenika djeluju na put čestice koja se giba u električnom polju kroz određeni medij, ali ova metoda je jednostavna, brza i vrlo osjetljiva, stoga je u kombinaciji s drugim tehnikama postala jedna od najčešće primjenjivanih metoda (16).

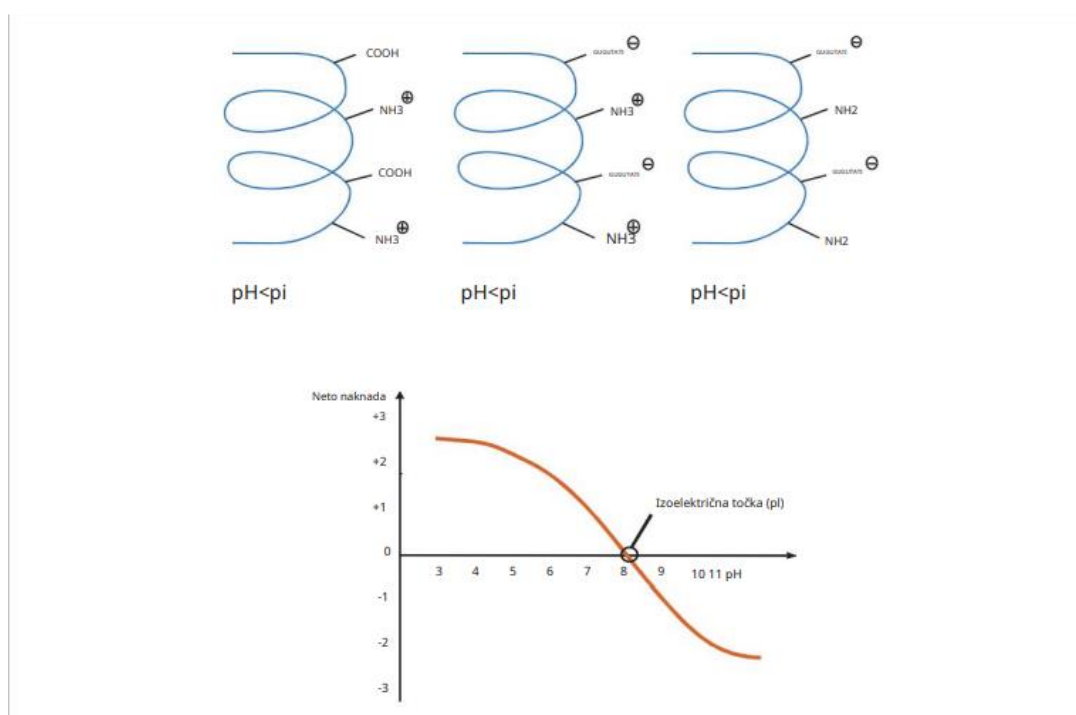
Danas u modernome smislu koristi kao analiza složenih proteinskih smjesa ekstrahiranih iz stanica, tkiva ili bioloških uzoraka (14). Ova analiza razvrstava proteine prema dva neovisna svojstva: izoelektrično fokusiranje (IEF), koji razdvaja proteine prema njihovim izoelektričnim točkama (pI), dok drugo svojstvo je molarna masa za koju se koristi SDS-poliakrilamidni gel

(SDS-PAGE). Svaka točka (mrljica) na dvodimenzionalnom gelu predstavlja jednu vrstu proteina u uzorku - tako se mogu razlikovati tisuće različitih proteina i ostale informacije kao što su pI, molarna masa i količina svakog proteina (14).

### 1.2.1. Izoelektrično fokusiranje (IEF)

IEF je elektroforetska metoda koja razdvaja proteine prema njihovim izoelektričnim točkama (pI). Proteini su amfoterne molekule koje nose pozitivan, negativan ili nulti naboj, ovisno o pH okoline (Slika 6.).

Izoelektrična točka (pI) je specifični pH kod kojeg je naboj proteina jednak nuli. U pH gradijentu pod utjecajem električnog polja, protein će se pomaknuti do položaja u gradijentu gdje mu je naboj nula. Protein s pozitivnim nabojem migrirati će prema katodi, postajući manje pozitivno nabijen dok ne dosegne svoj pI. Protein s negativnim nabojem migrirati će prema anodi, postajući manje negativno nabijen dok ne dosegne svoj nulti naboj. IEF koncentrira proteine na njihovim pI i omogućuje razdvajanje proteina na temelju vrlo malih razlika u naboju (12). IEF se nastavlja dok se ne postigne stabilno stanje. Razlučivost proteina ovisi i o jakosti električnog polja. Stoga se IEF izvodi na visokim naponima (većim od 1000 V) (14).



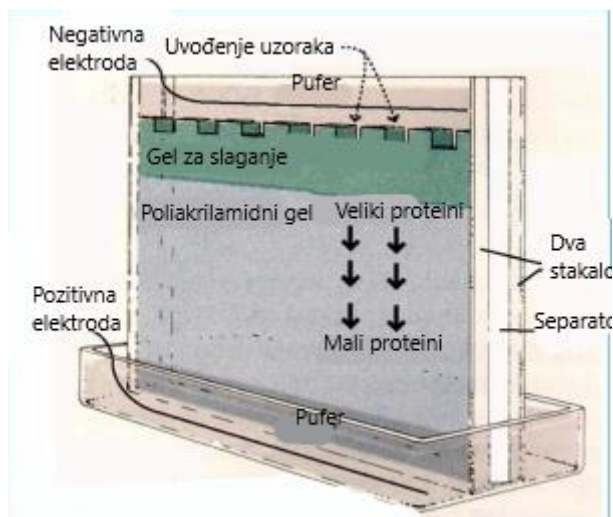
Slika 6. Naboj proteina ovisi o pH okoline. Točka sjecišta krivulje na x-osi (dolja slika) predstavlja izoelektričnu točku proteina (14)

Danas se koriste "DryStrip" gelovi koji imaju imobilizirani pH gradijent pa se skraćeno nazivaju

IPG trake (eng. *strip*) (14). Oni se obavezno moraju se rehidrirati (14). Prednosti "DryStrip" gelova su: jednostavnost rukovanja, veći kapacitet prihvata proteina, uzorak se može unijeti tijekom rehidracije, i osigurana je ponovljivost pH gradijenta (14).

### 1.2.2. SDS-PAGE (eng. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

SDS-PAGE (Slika 7.) je metoda denaturacije proteina s deterdžentom (natrijev dodecil sulfat – SDS) i uporabom električne struje na poliakrilamidnom gelu (ili poliakrilamidni gel elektroforeza – PAGE). SDS se veže na proteine i denaturira ih do njegove primarne strukture, čime proteini dobivaju negativan naboj proporcionalno svojoj molarnoj masi i tako putuju kroz gel na pozitivan pol. Što je manja molarna masa protein će brže putovati kroz gel (16). Poliakrilamidni gel nastaje polimerizacijom akrilamida s N,N-metilen-bis-akrilamidom (BIS) u prisutnosti amonijeva persulfata (APS) i TEMED-a (N,N,N,N – tetrametilendiamin) (16).

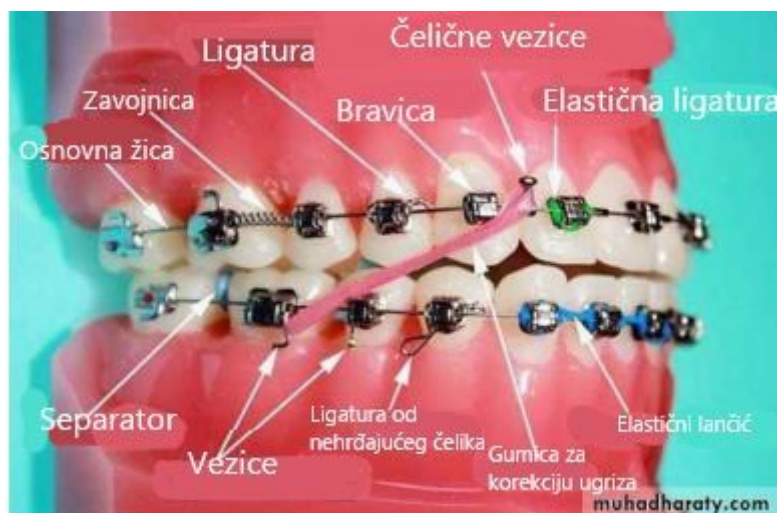


Slika 7. Slika aparature koja se koristi u SDS-PAGE-u (17).

### 1.3. Metali (metalni ioni) i njihova štetnost u ortodontici

Ortodoncija je dio stomatologije koja uključuje metode i korekciju zubnih abnormalnosti gdje uz pomoć adekvatnih i mehaničkih alata pozicioniraju zubi u ispravniju poziciju (38). Ovakav tretman je bitan za poboljšanje i održavanje zdravlja usne šupljine i zuba, za jačanje samopoštovanja i privlačan osmijeh (46). Metali se koriste u ortodontici zbog svojih jednostavnih fizikalnih svojstva. Neki se koriste kao pasivni nadomjesci tvrdim tkivima (implantat) ili kao sredstva za cijeljenje prijeloma (koštane pločice i viljci). Drugi pak imaju ulogu kao dijelovi ortodontskih bravica i žica (47). Svaki dio ortodontskog aparata (Slika 8.) – luk, bravica ili prsten – razlikuje se po sastavu i karakteristikama (48).





Slika 8. Dijelovi ortodontskog aparata (49).

Ortodontska terapija temelji se na pohranjenoj elastičnoj energiji koja se pretvara u mehaničku pomicanjem zuba uz pomoć karakterističnih sila korištenjem ortodontskih žica. Odgovarajućom uporabom žica može se reducirati trajanje tretmana i povećati praktičnost (46). Stoga je važno da žice koje se koriste imaju zadovoljavajuće karakteristike i važno je obratiti pozornost na elastičnost – granicu i modul elastičnosti, otpornost, "efekt pamćenja oblika", mogućnost oblikovanja i trenje te biokompatibilnost (47).

### 1.3.1. Elektrokemijska korozija metala u usnoj šupljini

Korozija je nenamjerno trošenje metalnih površina, oštećenje vanjskih i unutarnjih slojeva njihove površine uzrokovano izlaganjem kemijskoj ili elektrokemijskoj reakciji okolnog područja (50). Direktni kontakt metala s tkivima dovodi do stvaranja okoline koja izaziva koroziju metala i legura (38).

Slina u usnoj šupljini je dobar elektrolit za provođenje elektrona i iona. Ulaskom hrane i pića kroz usnu šupljinu i pod utjecajem čimbenika kao što pH, temperatura, enzimske aktivnosti i raznih kemikalija doprinose koroziji metala u usnoj šupljini (38). Potencijal korozije sline raste kako se njezin pH smanjuje i kako se koncentracija klorida povećava, jer slina je medij jakog korozivnog djelovanja (blago kisela tekućina koja sadrži katione i anione, proteine) (50). Galvanska struja u usnoj šupljini može se proizvesti izravnim kontaktom između dva metala razlikom potencijala kroz tekući medij, gdje je slina elektrolit. Ioni metala otpušteni u usnoj

šupljini, mogu biti bezopasni, ali mogu se pretvoriti u trajno aktivne patološke faktore i uzrokovati bolesti u usnoj šupljini ili drugim dijelovima tijela. Metalni ioni otpušteni tijekom korozije mogu ući u gastrointestinalni trakt i akumulirati u želucu, jetri, bubrezima, kostima, slezeni, mozgu ili plućima. Kliničke manifestacije koje se mogu pojaviti su osjećaj žarenja, bolovi na jeziku i obrazima, metalni, kiseli ili gorki okus, suha usta, ranice u ustima, gingivitis (51).

U radu Panova i Markove (2018.) (52) istraživana je potencijal korozije u zdravim pacijentima koji su imali metalne materijale u usnoj šupljini. Testiranju je podvrgnuto 42 sudionika između 21-72 godine. Mjerenje je provedeno s "Dentotest Six" uređajem. Na metalni dio zuba u usnoj šupljini postavila se elektroda, a druga elektroda stavljena je iznad zuba koji se pregledava. Ukupni korozijski potencijal u 42 sudionika iznosio je 4 %, ali nijedan sudionik nije imao povećan ukupni potencijal korozije, što ukazuje da slučajevi patogalvanizma s povišenom vrijednošću rijetki.

U današnje vrijeme, zbog estetskih, biofunkcionalnih i kirurških razloga, primjenjuju se biomaterijali u usnoj šupljini jer su izloženi čimbenicima koji mogu poremetiti svojstva materijala. Takvi materijali uključuju široku skupinu polimera, keramike, kompozita, metala i njihovih legura. Najčešći metalni biomaterijali su plemenite legure, čelici, titanij i legure kobalta. Slina utječe na metalne biomaterijale, ograničavajući kvalitetu i vijek trajanja dentalnih materijala. Slina stvara tekućinu u usnoj šupljini, odnosno ima svojstvo "podmazivanja" kako bi održala homeostazu sluznice. U slini se može stvoriti biofilm. Biofilm je površinski film koji se sastoji od organskih i anorganskih komponenti u slini u kojoj su kolonizirani mikroorganizmi s visokim sadržajem hranjivih tvari. Biofilm dovodi do promjena u usnoj šupljini, kao što su promjene u koncentraciji elektrolita, vrijednosti pH i razine kisika. Pozicija i struktura biofilma ovisi o lokalizaciji biomaterijala. Prisutnost biofilma na biomaterijalu vezana je za procese površinskog oštećenja, kao što su korozija i trenje. Uz biofilm, površinsko oštećenje ovisi i o drugim čimbenicima kao što je oralna higijena, prehrana, bolesti. Aerobni mikroorganizmi mogu povećati stvaranje drugih procesa koji potiču razvoj korozije, što dovodi do otpuštanja i disfunkcije implantata, i alergijskih reakcija na metale koje se koriste u ortodontskim materijalima. Negativni učinci biofilma uključuju stvaranje plaka, karijes, bakterijske i gljivične infekcije što dovodi do strukturne promjene, smanjenje izdržljivosti i samog uništenja biomaterijala (51).

U radu Procházková i sur. (2005.) (53) provedeno je istraživanje među 357 sudionika, 81 muškaraca i 276 žena, zbog promjena u usnoj šupljini. Simptomi su bili lokalni (bol, metalni okus, metalne pigmentacije, upalni znakovi sluznice), i kronični (umor, omamljenost, probavne

smetnje, glavobolja, bolni zglobovi). Svi sudionici su imali amalgamska punjenja i razne ostale zubne legure u usnoj šupljini. Grupa 1. je činilo 159 sudionika koji su imali metalne materijale u usnoj šupljini čija galvanska vrijednost iznosila 5 – 50  $\mu\text{A}$ . Grupa 2. je bila kontrolna grupa, odnosno 21 volonter koji nisu metalne materijale u usnoj šupljini. Protok struja između zubnih legura i usne šupljine mjereno je pomoću specijaliziranog voltmetra/ampermetra. Nakon analize metala u slini, u velikih koncentracija prisutni su Hg, Sn, Ag, Cu. Važno je istaknuti da je visoka koncentracija Al otkrivena je u obje grupe, zbog izloženosti okolišu.

### 1.3.2. Metali važni u ortodontiji

#### 1.3.2.1. Nikal (Ni)

Nikal (Slika 9.) je prijelazni element atomskog broja 28, relativnom atomskom masom od 58.6934 i gustoćom od 8908  $\text{kg/m}^3$ , i široko je rasprostranjen u okolišu, zraku, vodi i tlu (18).

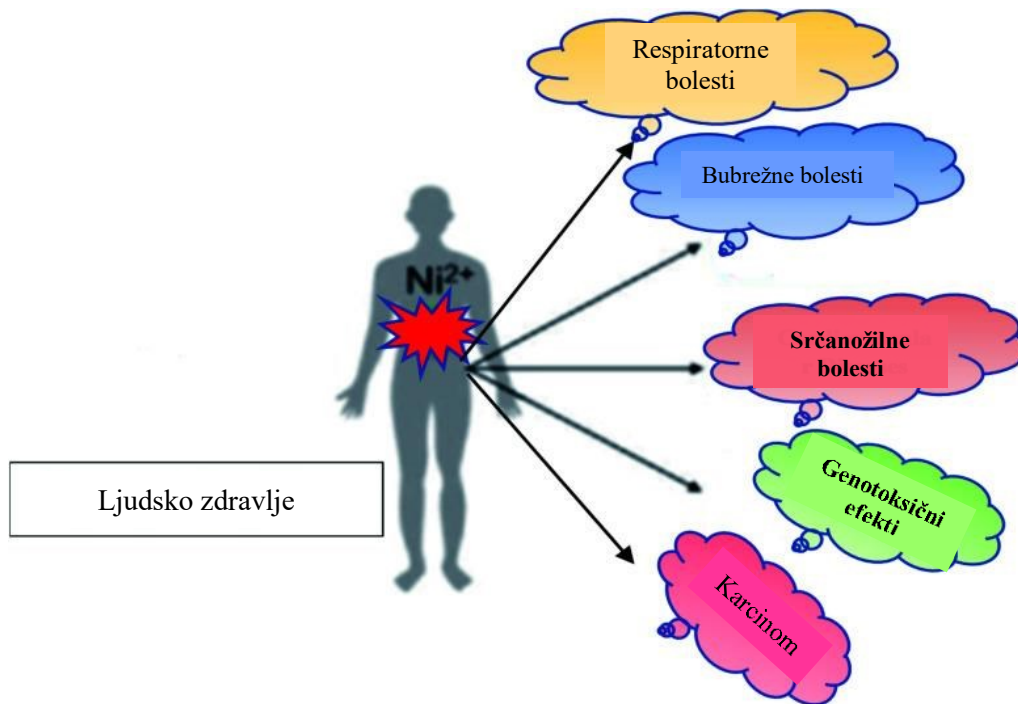


Slika 9. Nikal (19).

Potječe iz prirodnih izvora ili antropogenih aktivnosti (emitira se kao oksid i sulfid). Nikal je tvrd, srebrno-bijeli metal koji postiže nekoliko oksidativnih stanja (-1 do +4), ali je  $\text{Ni}^{2+}$  najrašireniji u okolišu. Elementarni nikal ima visoku toplinsku i električnu vodljivost (18).

Nikal je lako topiv u pri pH vrijednostima većim od 6,5 u razrijeđenim oksidirajućim kiselinama. Niklove soli jakih kiselina (kloridi, nitrat i sulfat) i organske soli topive su u vodi, dok slabe soli, niklovi sulfidi i niklovi oksidi slabo topivi u vodi (18).

Izloženost ovom metalu može uzrokovati akutne i teške štetne učinke na ljudsko zdravlje (20). (Slika 10.)



Slika 10. Shematski prikaz toksičnosti nikla u ljudima (20).

Nikal i njegovi spojevi, zahvaljujući fizikalno-kemijskim svojstvima, sjaju i niskoj cijeni, primjenjuju se u industriji. Otporan na vrlo visoke temperature, koroziju i oksidaciju, uz rastezljivost, lako se legira i može se potpuno reciklirati. Spojevi nikla koriste se u galvanizaciji, proizvodnji baterija i elektroničke opreme (18). Godišnje se u atmosferu emitira 30 000 tona nikla iz njegovih prirodnih izvora (20).

Drugi izvor izloženosti niklu je putem prehrane, posebno putem povrća poput špinata, šparoga, mrkve, brokule, mahuna, rajčica, te kakaa, čokolade i orašastih plodova (18). Profesionalna izloženost radnika niklu dovodi do visoke razine nikla u krvi, mokraći i tjelesnim tekućinama, a naročito u plućima (18).

Nikal je jedan od alergena koji uzrokuje kontaktni dermatitis. Preosjetljivošću na nikal češće su pogođene žene, zbog nošenja nakita, kozmetike, odjeće i uporabe kućanskih predmeta s niklom (21). Kada znoj dođe u reakciju s niklom, otpuštaju se topive soli nikla, koje koža apsorbira što dovodi do reakcije preosjetljivosti (21).

#### 1.3.2.1.1. Toksičnost nikla u ortodonciji

Nikal je često korišten metal u ortodonciji, zbog svoje elastičnosti i memorije oblika žica. Uobičajena je komponentna ortodontskih materijala, vezana uz nehrđajući čelik ili leguru nikal-titanij (Ni-Ti) gdje koncentracija nikla iznosi 50 % ili više (22).

Nikal izaziva kontaktni dermatitis, koji je imunološki odgovor tipa IV odgođene preosjetljivosti posredovan T-stanicama. Promjena oralne sluznice djelovanjem nikla može biti promjenjiva i teža za dijagnosticiranje nego promjene na koži (22). Simptomi koji su povezani s ispuštanjem nikla iz ortodontskih aparata su (22):

- gingivitis u nedostatku plaka;
- hiperplazija gingive;
- deskvamacija usana (Slika 11.);
- osjećaj pečenja u ustima;
- metalni okus;
- osjećaj bockanja;
- oticanje;
- bolnost bočne strane jezika.



Slika 11. Deskvamacija usana (23).

#### 1.3.2.2. Krom (Cr)

Krom (Slika 12.) je kemijski element atomskog broja 24, s relativnom atomskom masom 51,996 i gustoćom 7150 kg/m<sup>3</sup> (24).



Slika 12. Krom (25).

Krom sadrži oksidativna stanja od -2 do +6, ali najčešće dolazi u obliku 0, +2, +3 i +6. Elementarni krom nije prirodno prisutan u zemlji. Gotovo sav krom u prirodi u oksidacijskom je stanju +3, a industrijskog podrijetla je u stanju +6. Divalentni krom je jaki reducens, reagira sa zrakom i ne može biti prisutan u okolišu (24).  $\text{Cr}^{6+}$  je jako oksidirajuće sredstvo, pogotovo u kiselom mediju. Vezan je za kisik kao kromat ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) ili dikromat ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ). Prolazi kroz gotovo sve biološke membrane, reagira s proteinima i nukleinskim kiselinama unutar stanice, prilikom čega se reducira do  $\text{Cr}^{3+}$ . Trovalentni krom je jedino oksidacijsko stanje kroma koji se nalazi u živim bićima (24).

Velike količine kroma mogu se prirodno naći u dva minerala: kromit ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ) i krokoit ( $\text{PbCrO}_4$ ) (26).

Krom je bijeli, tvrdi, sjajni i lomljiv metal koji je otporan na koroziju, zato se koristi kao zaštitni premaz u galvanizaciji. Koristi se u metalurgiji, kemijskoj industriji i refraktorima (26).

Krom u prehrani je prisutan u obliku anorganskih ili organskih kompleksa. Elementarni krom (0) se ne apsorbira, dok  $\text{Cr}^{6+}$  u organizam dopijeva inhalacijom ili industrijskom kontaminacijom. Trovalentni krom dopijeva u organizam preko gastrointestinalnog trakta, ali nije poznat mehanizam apsorpcije (24).

#### 1.3.2.2.1. Toksični učinci kroma u ortodonciji

U studiji Amira i sur. (2018.) (27) procijenjeno je otpuštanje iona nikla i kroma iz ortodontskih žica od nehrđajućeg čelika i nikal-titanija legure nakon uporabe četiri tekućine za ispiranje usta. U rezultatima se pokazalo kako nikal i krom podliježu koroziji u oralnom okruženju i dolazi do fizikalno-kemijskih, mikrobioloških i enzimatskih promjena koje dovode do oslobađanja iona u usnoj šupljini. U radu Park i Shearer (1983.) (28) izmjerene su otpuštene količine nikla i kroma iz 10 eksperimentalnih ortodontskih aparata i 10 kontrolnih ortodontskih aparata

inkubiranih u 0,05%-tnoj otopini natrijevog klorida i dvije kapi toluena na 37 °C. Nikal i krom analizirani su pomoću atomske apsorpcijske spektrofotometrije. Nakon 12 dana, ukupna količina oslobođenog topivog nikla dosegnuo je 120 µg, a ukupna količina oslobođenog topivog kroma 40 µg. Čimbenici kao što su pH, temperatura, količina sline, plaka, proteina, fizikalno-kemijska svojstva hrane, opće zdravstveno stanje utječu na otpuštanje njihovih metalnih iona u usnoj šupljini, što dovodi do oksidoredukcijske neravnoteže. Nikal i krom su normalno prisutni u hrani koju konzumira čovjek, ali postoji mogućnost da nikal i krom otpušteni u usnoj šupljini iz ortodontskih proizvoda od nehrđajućeg čelika, kao što su bravice i žice mogu izazvati alergijske reakcije pomoću mehanizma korozije, stoga karakteristični simptomi koji se pojavljuju su gubitak okusa, osjećaj peckanja, bol u zahvaćenom području, dermatitis i gingivitis.

#### 1.3.2.3. Molibden (Mo)

Molibden je kemijski element atomskog broja 42, relativne atomske mase 96 i gustoće 10000 kg/m<sup>3</sup>. Molibden sadrži pet oksidativnih stanja od +2 do +6. Izraziti je halkofil ili siderofilni metalni element koji tvori molibdenit (MoS<sub>2</sub>), vulfenit (PbMoO<sub>4</sub>) i povelit (Ca(MoW)O<sub>4</sub>) (29). Dvije trećine molibdena proizvedeno 2008. godine utrošeno je za proizvodnju legiranih čelika i superlegura. Nehrđajući čelici koji sadrže molibden imaju čvrstoću i otpornost na koroziju te se upotrebljavaju u sustavima distribucije vode, rukovanja hranom, kemikalijama, te bolničkoj i laboratorijskoj opremi. Čelici legirani molibdenom koriste se i za izradu automobila, u građevini te prijenosu plina cijevima. Molibden je mikroelement. Biljke trebaju male količine molibdena za produkciju "molibdenoenzima" koji reguliraju funkciju biljke. Toksičnost molibdena u biljkama je rijetka, ali ovce i goveda koje se hrane biljkama s visokom koncentracijom molibdena mogu oboljeti od molibdenoze (30). Molibden se apsorbira preko pluća, oralno i transdermalno. Molibden se u ljudima brzo apsorbira u gastrointestinalnom traktu, preko jetre u žuč, i u bubrege. Heksavalentni molibden se lako apsorbira nakon oralne primjene, dok se četverovalentni ne apsorbira lako (31).

##### 1.3.2.3.1. Toksikologija molibdena

Nakon apsorpcije, molibden se brzo pojavljuje u krvi i ostalim organima. Soli molibdena inhibiraju crijevnu apsorpciju željeza i bakra. Ovisno o spoju u kojem se nalazi, molibden ima značajnu varijabilnost u toksičnosti. Topivi spojevi molibdena (trioksid, amonijev molibdat)

otrovniji su od netopivih spojeva (molibden disulfid, molibden oksid). Simptomi koji se mogu pojaviti nalik su insuficijenciji bakra. Vrlo malo se zna kako molibden utječe na ljude, jer se većina informacija temelji na pokusima na životinjama. Nema podatka o smrtonosnim dozama molibdena u ljudi. Postoji mogućnost toksičnosti niskog stupnja jer je molibden neophodan element u tragovima, koji se s flavoproteinskim enzima brzo eliminira putem urina (32).

#### 1.3.2.4. Titanij (Ti)

Titanij je tvrd, sjajan i jak metal, koji je dobio ime po Titanu, sinu božice Zemlje iz grčke mitologije. Prijelazni je metal, atomskog broja 22, relativnom atomskom masom od 47,867 i gustoćom od  $4506 \text{ kg/m}^3$  (33). Titanij je čvrst kao čelik, ali je lakši od čelika za 50 %, dvostruko jači od aluminija, ali 60 % teži od aluminija (34).

Titanij (IV) oksid koristi se kao reflektor infracrvenog zračenja pa se dodaje kremama za sunčanje kako bi spriječio UV svjetlo da prodre do kože (33).

Titanij kao element nije toksičan i nema poznatu biološku ulogu, ali prašina titanijevog (IV) oksida je kancerogena (33).

Najviše se koristi u proizvodnji metalnih legura zbog svojih jakih fizikalno-kemijskih svojstava – visoka čvrstoća, otpornost na koroziju, toplinska stabilnost. U zemljinoj kori četvrti je nezastupljeni metal s 0,6% nakon željeza, magnezija i aluminija (35).

Titanij se primjenjuje u medicini i stomatologiji preko 30 godina. Legure titanija koriste se kao zubni implantati, endoproteze, pacemakeri, ortodontski nosači. On se smatra prikladnim materijalom u stomatologiji zbog oksidnog sloja koji se formira na površini metala, što sprječava koroziju i pokazuje visoku biokompatibilnost (36). Nosači od titanija zamijenili su nehrđajući čelik, zbog toga što se elementi kao Ni i Cr dodaju nehrđajućim čelicima i mogu izazvati alergije, toksične ili kancerogene učinke (37).

Titanij i legure titanija primjenjuju se kao ortodontski materijali zbog sljedećih karakteristika koje posjeduju (38):

- visoka čvrstoća – granice razvlačenja i vrijednosti vlačne čvrstoće vrlo su visoke;
- relativno niska gustoća – titanijeve legure s gustoćom od  $4506 \text{ kg/m}^3$  dvostruko su lakše od čelika i niklovih superlegura;
- visoka specifična čvrstoća – omogućuje titanijevim legura da zamijene čelik u mnogim primjenama;
- visoka dinamička izdržljivost – titanijeve legure imaju bolju izdržljivost od legure aluminija;



- toplinska stabilnost (postojane od 300 – 600 °C);
- otpornost na koroziju zbog oksidne prevlake koja nastaje na površini metala;
- biokompatibilnost, tj. otpornost na djelovanje tjelesnih tekućina.

#### 1.3.2.4.1. Toksičnost titanija

Titanij se zbog dobrih fizikalno-kemijskih i biomehaničkih svojstava koristi u stomatologiji i ortopediji. Uporaba titanija u te svrhe dana je u preglednom članku Dežulović i Čanadi Jurešić (2021.) (39). Titanij i njegove legure otporni su na koroziju zbog stvaranja pasivnog sloja na površini metala. Kada je metal izložen zraku ili tekućini, dolazi do reakcije oksidacije gdje se stvara tanki sloj oksida na metalu, koji – osim što štiti materijal od korozije – povećava biokompatibilnost. (39)

Zabilježeni su i štetni učinci korozije titanija u ljudskom tijelu, tj. razni upalni procesi kao što su periimplantitis i perimukozitis. Periimplantitis zahvaća meka i tvrda tkiva oko implantiranog zuba i uzrokuje resorpciju kostiju koje drže implantat. Kada nije dokazan gubitak kostiju, dijagnoza je perimukozitis, koji zahvaća samo meka tkiva i reverzibilno je upalno stanje. Izloženost titanija može se povezati sa "sindromom žutih noktiju" (YNS), gdje bolesnik pokazuje žućkastu promjenu boje noktiju uz druge simptome kao što su upala sinusa i kašalj (40). U radu Berglunda i sur. (2011.) (41) istraženo je o oksidativnom otpuštanju iona titanija iz titanijevih implantata u 26 sudionika koja je dovela do nastanka sindroma žutih noktiju. Rezultati su pokazali da je razina titanija u noktima iznosila 1,1 do 170  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Odrezani nokti sudionika imali su veće razine titanija (48 – 111  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Sudionici su pokazali na početku ispitivanja simptome kao što su bljedoća, blijedo-žuti nokti, kašalj, bronhitis, sinusitis, rinosinusitis što ukazuje na sindrom žutih noktiju. Nakon uklanjanja titanijevih implantata, sudionici su se osjećali bolje i simptomi su nestali.

#### 1.3.2.4.2. Toksičnost titanija u ortodonciji

U medicinskoj implantaciji, ortodontskim protezama i zubnim implantatima koriste se legure titanija. Zabilježeni su sljedeći slučajevi toksičnosti titanija u dentalnim materijala (38,39):

- alergijska reakcija: osobe mogu biti alergične na titanij ili druge komponente u materijalu koji sadrži Ni, Cr ili Mo;
- korozija: iako je titanij visoko rezistentan na koroziju, tijekom vremena u kiseloj sredini može početi korodirati;
- preopterećenje: zubni implantati mogu biti podvrgnuti prekomjernoj sili i izazvati

gubitak kostiju i kvar implantata, što dalje znači otpuštanje metalnih iona u okolna tkiva i stvaranje upale.

Niklove i titanijeve legure često se koriste u ortodonciji. Titanij u ortodontskih materijalima dolazi u nikal-titanij legurama (Ni-Ti), u titanij-molibden legurama (Ti-Mo) ili titanij-aluminij-vanadij legurama (Ti-Al-V). U radu Zigante i sur. (2020.) (42) 250 ispitanika podvrgnulo se ortodontskom liječenju fiksini ortodontskim aparatom kako bi se istražila alergijska senzibilizacija na titanij. Prevalencija alergijske senzibilizacije na titanij i/ili nikal iznosila je 16 %. Izolirana senzibilizacija za titanij iznosila je 2 % na 250 ispitanika, dok je izolirana senzibilizacija za nikal iznosila 12 %. Žene su bile više senzibilizirane na nikal nego muškarci. Isto tako senzibilizacija na titanij zabilježena je više (6 %) kod žena, nego kod muškaraca (1 %). Iako se alergijska reakcija na titanij rijetko događa, ne smije ju se zanemariti.

#### 1.3.2.5. Željezo (Fe)

Željezo je kemijski element, metal s atomskim brojem 26, relativnom atomskom masom od 55,847 i gustoćom od 7874 kg/m<sup>3</sup>. Može se pronaći u pet oksidativnih stanja: +6, +3, +2, 0 i -2 (43). Neophodan je većini bioloških sustava, ali toksičan u prekomjernim količinama. 70 % željeza u sisavcima nalazi se u hemoglobinu, dok 5 – 10 % u mioglobinu, kao Fe<sup>2+</sup>. Fe<sup>3+</sup> skladišti se u hemosiderinu, feritinu i transferinu u jetri, slezeni i koštanoj srži. Ioni željeza sadržani su u enzima kao što je peroksidaza, katalaza i citokrom C (44). Željezo može apsorbirati iz crijeva u stanice sluznice, ali većina apsorpcije događa se u duodenumu i gornjem jejunumu. Kako bi željezo bilo apsorbirano, mora biti ionizirano u fero ili feri obliku. Prehrana bogata ugljikohidratima i vitaminom C povećava apsorpciju željeza, a prehrana bogata fosfatima smanjuje apsorpciju. Željezo se prenosi na feritin ili u krvotoku je vezan za transferin. Transferin je globulin koji se proizvodi u jetri. U slučaju nedostatka željeza, on se brzo veže za transferin i skladišti u koštanoj srži. Ako se željezo ne veže za protein, oslobađaju se štetni slobodni radikali. Slobodni radikali povećavaju peroksidaciju lipida, uz oštećenje membrane mitohondrija, mikrosoma i ostalih organela (44).

##### 1.3.2.5.1. Toksičnost željeza

Toksičnost može biti akutna ili kronična. Akutna uzrokuje korozivni učinak na gastrointestinalni trakt i oštećuje stanice zbog željeza koji se nije vezalo za protein. Simptomi koji se pojavljuju izazvani su ozljedom gastrointestinalne sluznice, a to su mučnina, povraćanje, bolovi u trbuhu i proljev, dolazi do gubitka tekućine i hipovolemije. Velika doza željeza

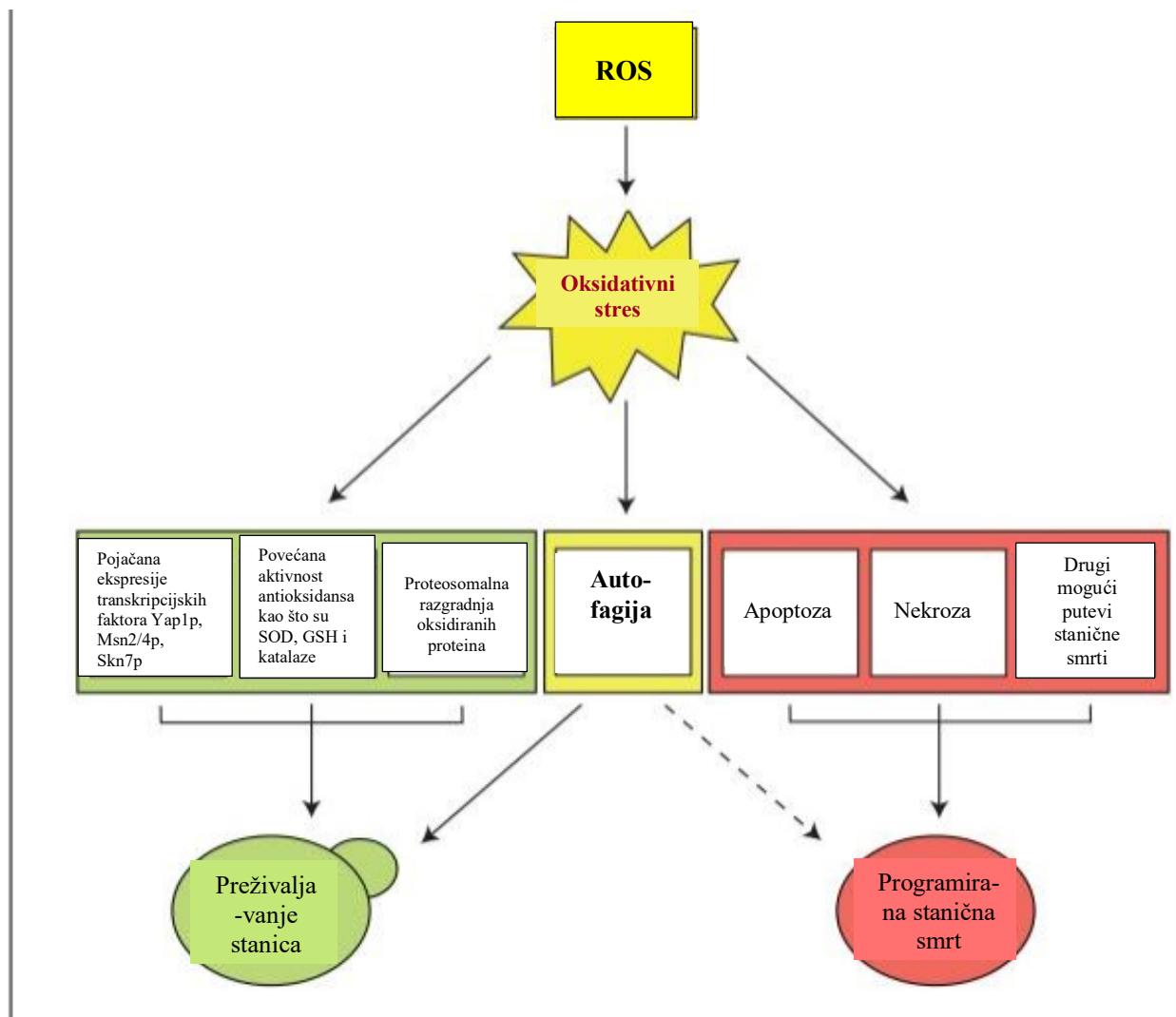
oštećuje metabolizam stanice u srcu, jetri i središnjem živčanom sustavu. Takvo željezo je slobodno i koncentrira se u mitohondrijama. Ometa procese koji se zbivaju u mitohondrijama, stvara slobodne radikale i dolazi do smrti stanice (45).

#### 1.4. Oksidativni stres

Oksidativni stres označava pojam stanje neravnoteže između stvaranja prooksidansa (eng. *reactive oxygen species*, ROS) i antioksidansa što dovodi do oksidativnog oštećenja stanice. Reaktivne vrste kisika (ROS) su komponente nastale djelomičnom redukcijom iz molekule kisika, O<sub>2</sub>. U ROS spadaju radikal vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoksid O<sub>2</sub><sup>-</sup> i hidroksil-radikal OH<sup>-</sup>, koji nastaju zbog "otpuštanja" elektrona iz transportnog lanca tijekom aerobnog disanja. Izloženost teškim metalima, UV-zračenju, herbicidima, ksenobioticima i drugim egzogenim faktorima uvjeti su koji mogu potaknuti proizvodnju ROS-a. Ako se stanica ne uspije obraniti antioksidativnim mehanizmima, proizvest će se velika količina ROS-a, odnosno rezultirati oksidativnim stresom. Akumulirani ROS mogu oštetiti esencijalne biomolekule kao što su nukleinske kiseline, proteini i lipidi. Akumulacija ROS-a ima važnu ulogu u staničnoj smrti (apoptozi) ili može uzrokovati nekrozu u stanice (54).

*Saccharomyces cerevisiae* je kvasac koji služi kao model za proučavanje oksidativnog stresa dugi niz godina. Akumulacija ROS-a u kvascima iščitava se iz metaboličkih procesa povezanih s disanjem, ali je potaknuta i podražajima iz okoliša (54). Model kvasca *Saccharomyces cerevisiae* relevantan je za proučavanje ljudi zbog proteina homolognih ljudskim proteinima. Koristan je pri proučavanju oštećenja izazvanih oksidativnim stresom zbog načina disanja (mitohondrijsko) i nakupljanja oksidativnih oštećenja u stanici kvasca, slično kao i kod ljudi (48).

Na Slici 13. prikazano je kako stanice kvasca odgovaraju na oksidativni stres. Nakupljeni ROS-ovi izazivaju reakcije koje rezultiraju ili preživljavanjem stanica ili staničnom smrću. Neki od mehanizama koji rezultiraju preživljavanjem su: aktivacija transkripcijskih faktora (poput Yap 1p), povećana aktivnost antioksidanasa (superoksid dismutaze, katalaze ili glutaciona) te proteasomska razgradnja oksidiranih proteina. U slučaju velikog stupnja autofagije, počinje stanična smrt, odnosno stanica se izlaže ozbiljnom oksidativnom stresu što izaziva odgovor poput apoptoze, nekroze i slično (54).



Slika 13. Odgovor stanice kvasca *S. cerevisiae* na oksidativni stres (54)

ROS-ovi u povećanim količinama uzrokuju oštećenje određenih bioloških struktura i metaboličkih puteva, ali u optimalnim uvjetima, pomažu održati homeostazu u stanici i reagiraju na endogene i egzogene podražaje. Stanice mogu posjedovati endogene enzime kao što je superoksid-dismutaza (SOD) koji pomaže održati ravnotežu ROS-a uzrokovan slobodnim radikalima. Visoka razina ROS-a iz vanjskih (onečišćujuće tvari u okolišu) ili unutarnjih čimbenika (mitohondrijski put) može dovesti do izravnog ili neizravnog oštećenja. Oštećenje proteina, DNK i lipida u stanici, djeluje na njihove stanične funkcije, što dovodi do mijenjanja oblika i strukture tih makromolekula (55).

U radu Ayers i sur. (2020.) (56) dokazali su da glutation djeluje kao antioksidans unutar stanice (u mitohondriju i endoplazmatskom retikulumu) i ima ključnu ulogu u homeostazi željezo-sumpor (Fe-S).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj metalnih iona koji se ispiru iz ortodontskih aparatića na vitalnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 te na sadržaj i sastav njegovih mitohondrijskih proteina. Iscrpine s eluiranim metalnim ionima pripremane su iz jednog ortodontskog aparatića (sastavljenog od 2 luka, 4 prstena, 20 ligatura i 20 bravica) eluiranjem istog u kvašćevu podlogu tijekom 3, 7 ili 14 dana. Sadržaj i sastav metalnih iona u tim iscrpinama određen je ICP-MS metodom. Nakon uzgoja kvasca na pripremljenim eluiranim podlogama do rane stacionalne faze, stanicama je određena vitalnost (preko promjene gustoće stanica te krivuljama rasta), a iz stanica su izolirani mitohondriji, i iz njih proteini. 2D-elektroforezom mitohondrijski proteini su razdijeljeni, a programom "Dymension 2" kvantificirani te im je uspoređen sadržaj i sastav. Međusobno su uspoređivani mitohondrijski proteomi različito tretiranih kvasaca, odnosno svaki je tretirani uzorak uspoređen s kontrolnim uzorkom (proteomom mitohondrija netretiranog kvasca) kako bi se utvrdila povezanost sadržaja i sastava metalnih iona u iscrpinama s izazvanim promjenama na mitohondrijskom proteomu kvasca.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Radni organizam

U ovom radu korišten je soj W303 kvasca *Saccharomyces cerevisiae* WT, ključni modelni organizam za istraživanje bioloških mehanizama, koji je usko povezan s prvim potpuno sekvenciranim sojem kvasca, S288C. Soj S288C dijeli više od 85 % genoma s W303, a razlikuju se po nukleotidnim pozicijama i sekvencama. Soj W303 sadrži genotip MATa/MAT $\alpha$ {leu2-3,112trp1-1can1-100ura3-1ade2-1his3-11,15}[phi<sup>+</sup>] (57).

Ovaj mikroorganizam prikladan je model za eksperimente usmjerene na manipuliranje nakupljanja razine teških metala. Ima visok biosorpcijski kapacitet za teške metale, koji staničnom stijenkom, odnosno njenim vanjskim slojem koji se sastoji od visoko glikoziliranih proteina bogatih negativno nabijenim skupinama (fosfat i karboksilat), metalni ioni se elektrostatski vežu na površinu stanice (58).

##### 3.1.2. Popis opreme, uređaja i kemikalija

- pH-metar MP 220, Mettler Toledo, EU
- tehnička vaga Kern 572, Kern, Njemačka
- autoklav za sterilizaciju, CertoClav, Austrija
- mini centrifuga UniCFUGES, LLG Labware
- vorteks, Tecnokartell TK3S, Australija
- kit za određivanje proteina, Pierce<sup>TM</sup> Rapid Gold BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific<sup>TM</sup>, SAD
- magnetska miješalica IKA RCT Standard; LLG Labware, R. Njemačka
- tresilica Unimax 1000, Heidolph, R. Njemačka
- LUNA-FL<sup>TM</sup> Dual fluorescence cell counter, Logos Biosystems, Južna Korea
- optički čitač mikrotitarskih pločica, Tecan EL808, Švicarska
- stakleno laboratorijsko posuđe (čaše, tikvice, epruvete...)
- kvašćev ekstrakt, Biolife, Italija
- glukoza, Biolife, Italija
- pepton, Biolife, Italija

- koncentrirana otopina klorovodične kiseline (HCl), Merck, Njemačka
- skener BIO-6000, Microtek, (Microtec<sup>©</sup> 2020 Microtek International, INC.) Tajvan
- sustav za elektroforezu TV 400YK, SCIE PLAS, Velika Britanija
- uređaj za izoelektrično fokusiranje Etan-IPGphor 3, GE Healthcare, Švedska
- "Dymension 2", "Syngene<sup>TM</sup> Dymension 2 Software", Syngene, Velika Britanija
- ICP-MS 2030 sustav, Shimadzu, Kyoto, Japan
- kit za izolaciju mitohondrija "Yeast Mitochondria Isolation Kit", Abcam, SAD

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprema eksperimentalnih hranjivih podloga

YPD (Yeast Peptone Dextrose) je ekstrakt kvasca, peptona i glukoze (dekstroze) koja služi kao hranjiva podloga za uzgoj kvasaca. Na 1 L vode odvaže se: 10 g kvašćevog ekstrakta, 20 g peptonske vode i 20 g dekstroze. Dodaje se određena količina destilirane vode, i miješa dok otopine ne postane bistra. Kako bismo stvorili optimalne uvjete za rast kvasca, potrebno je namjestiti pH na 5,5 s koncentriranom klorovodičnom kiselinom (HCl, konc.).

Takva pripremljena YPD podloga korištena je za pripremu iscrpina dentalnih materijala tako da se dijelovi jednog ortodontskog aparatića (2 žičana luka, 20 bravica, 20 ligatura i 4 prstena) urone u 28 mL te podloge. Po svakom cm žičanog luka dodaje se 1 mL podloge. Obzirom da su dva luka, svaki po 14 cm, ukupno se dodaje 28 mL.

Nakon autoklaviranja na 121 °C tijekom 15 min, pripremljene se tikvice s podlogama i ortodontskim materijalom stavljaju na tresilicu - 160 o/min, 37 °C, kako bi se što bolje oponašali uvjeti u usnoj šupljini, na period od 3, 7 i 14 dana, nakon čega se pažljivo, sterilno odvaja podloga od ortodontskog materijala. Tako se dobivaju eluati od 3, 7 i 14 dana koji se koriste za daljnji uzgoj kvasca.

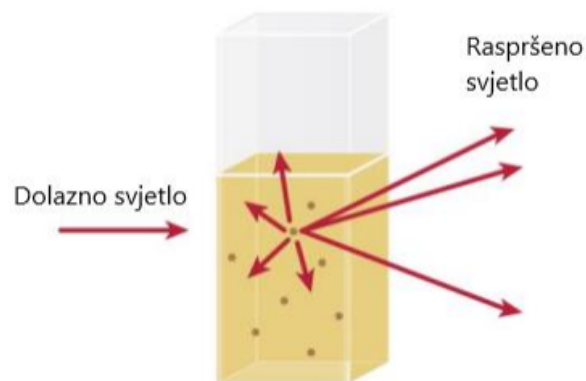
### 3.2.2. Uzgoj kvasaca na podlogama s eluiranim metalnim ionima

Kvasci su uzgajani na pripremljenim eluiranim podlogama, u tikvicama pri 200 okretaja u minuti na 30°C kroz 24 sata na tresilici (Unimax 1000). Zamućenje podloge indicira umnožavanje, odnosno rast kvasaca.

### 3.2.3. Određivanje broja stanica

### 3.2.3.1. Optička gustoća

Optička gustoća (OD) kvasaca radi se za procjenu gustoće stanica tijekom uzgoja i praćenje rasta stanica, pri valnoj dulji od oko 600 nm, koristeći mikrotitarske pločice s 96 mjesta i optički čitač (Tecam EL808). Između mjerenja, mikrotitarske pločice je potrebno držati na tresilici uz temperaturu 28 – 30 °C, koja je optimalna za rast i razvoj kvasaca. Prema Beer-Lambertovom zakonu, optička gustoća temelji se na mjerenju zamućenosti. Optička gustoća je rezultat raspršenja svjetlosti (Slika 14.), tako da veličina i oblik stanice mogu pridonijeti rasipanju svjetlosti (59).



Slika 14. Raspršenje svjetlosti mutnog uzorka (60).

### 3.2.3.2. Brojanje stanica

Prebrojavanje stanica kvasaca radi se pomoću uređaja „LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter“ (Slika 15.), koji je brz i pristupačan aparat za brojanje stanica, a sadrži svijetlo polje i dvostruku fluorescentnu optiku koja automatski broji različite vrste stanica. Pomaže u mjerenju broja kao i održivosti stanica za analizu slike (61).





Slika 15. „LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter“ (61).

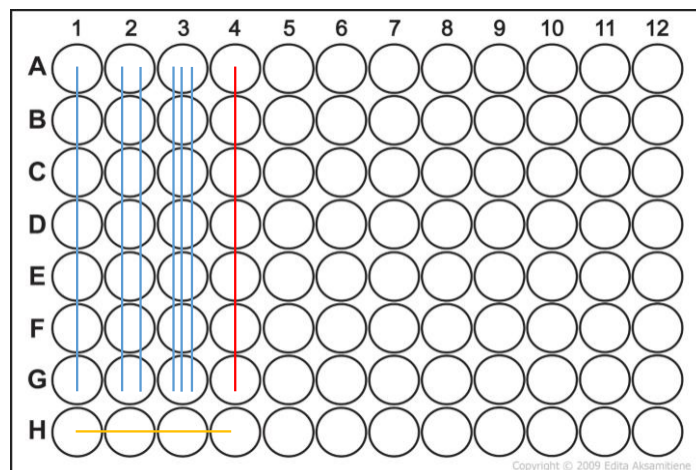
Uzorak koji je uzgajan u YPD mediju, prije brojanja potrebno je razrijediti 1:100 s puferom "Cell Dilution Buffer", Logos Biosystems. To je važan i nužan korak jer je u YPD mediju jaka aktivnost esteraze, te ona inhibira reagensa i oslabljuje fluorescentni signala (61). U komoricu za očitavanje broja stanica nanosi se 10  $\mu$ L pripremljenih otopina stanica.

Automatizirani brojači stanica razlikuju žive stanice od mrtvih korištenjem boja acridine orange (AO) i propidij jodid (PI). Acridine orange je boja koja prodire u žive i mrtve stanice, i obojat će sve stanice koje sadrže jezgru kako bi stvorila zelenu fluorescenciju. Propidij jodid ulazi samo u mrtve stanice s oštećenom membranom i obojat će mrtve stanice s jezgrom u crvenu fluorescenciju (62).

Prednost ovih uređaja je što su pristupačni s niskim troškovima rada, jednostavni su za korištenje (62).

### 3.2.3.3. Određivanje krivulje rasta

Krivulje rasta kvasaca na eksperimentalnim podlogama određuju se prema podacima dobivenim na čitaču mikrotitarskih pločica (Slika 16.). Priprema se mikrotitarska pločica s početnim brojem stanica u jažicama oko  $1 \times 10^5$ . Za svaki se eksperiment napravi protokol prema kojem će se, ovisno o tretmanu, popunjavati jažice. Kontrolu čine YPD hranjiva podloga s netretiranim stanicama kvasca, dok je slijepa proba samo YPD hranjiva podloga.



Slika 16. Shematski prikaz pripremanja mikrotitarske pločice. Plavo: stanice tretirane pripremljenim podlogama (1 – 3 dana, 2 – 7 dana, 3 – 14 dana); crveno: kontrola; žuto: slijepa proba.

### 3.2.4. Izolacija mitohondrija

Prva faza u izolaciji mitohondrija je priprema sferoplasta iz netretiranog (kontrolnog) uzorka kvasca i iz stanica tretiranih uzoraka.

U svrhu većine istraživanja stanica kvasaca, potrebno je ukloniti polisaharidnu stijenku kako ne bi ometala daljnje postupke; zato se kvasci bez polisaharidne stijenke nazivaju sferoplasti. Stanice kvasaca je potrebno prvo uzgojiti do Log faze (0,5 – 0,8 ODU/ml) zbog toga što stanice kvasaca u stacionarnom stanju imaju najdeblju polisaharidnu stijenku. Nakon inkubacije stanica, suspenzija kvasaca prelije se u izvagane staklene centrifugirke i centrifugira se na 3500 – 4000 rpm tijekom 5 min na 4 °C. Zatim se talog ispire s malo ledeno hladne redestilirane vode (sprječava djelovanje lipaze) i ponovno se centrifugira na 3500 – 4000 rpm tijekom 5 minuta na 4 °C. Supernatant se odbaci i odredi vlažna stanična biomasa (VSM).

VSM se rasprši u 2 ml pufera (0,1 Tris/SO<sub>4</sub>, pH 9,4 i 3 mg DTT/g VS,) i inkubira tijekom 10 minuta na 30 °C. Ponovno slijedi centrifugiranje na 3500-4000 tijekom 5 min na 4°C. Talog se ispire s malo 1,2 M sorbitola i centrifugira na 3500-4000 rpm tijekom 5 min na 4°C. Talog se otapa u tzv. "sferoplasting medium" (pufer), koji sadrži 1,2 M sorbitola, 10 mM Tris/Cl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5. Zbog usporedbe radi se nulta proba: u epruveticu se doda 2 ml H<sub>2</sub>O skupa sa suspenzijom. Dodaje se 2 mg zimolijaze/g VSM (razgrađuje staničnu stijenku kvasca) i inkubira na 30°C na vodenoj kupelji. Svakih 5 – 10 minuta prikuplja se 20 µL uzorka i testira na sferoplaste, dok se suspenzija ne izbistri. Ponovno se centrifugira na 3500-4000 rpm tijekom 5 min na 4°C. Takva stanična masa predstavlja uzorak za izolaciju mitohondrija.

Izolacija mitohondrija postala je temeljem brojnih istraživanja kako bi se zapravo otkrila njegova biološka funkcija. Nakon lize stanične stijenke kvasca zimoliazom, mitohondriji se izoliraju iz sferoplasta homogenizacijom. Za izolaciju je korišten kupovni kit ("Yeast Mitochondria Isolation Kit", Abcam), a tijekom izolacije bio je sljedeći:

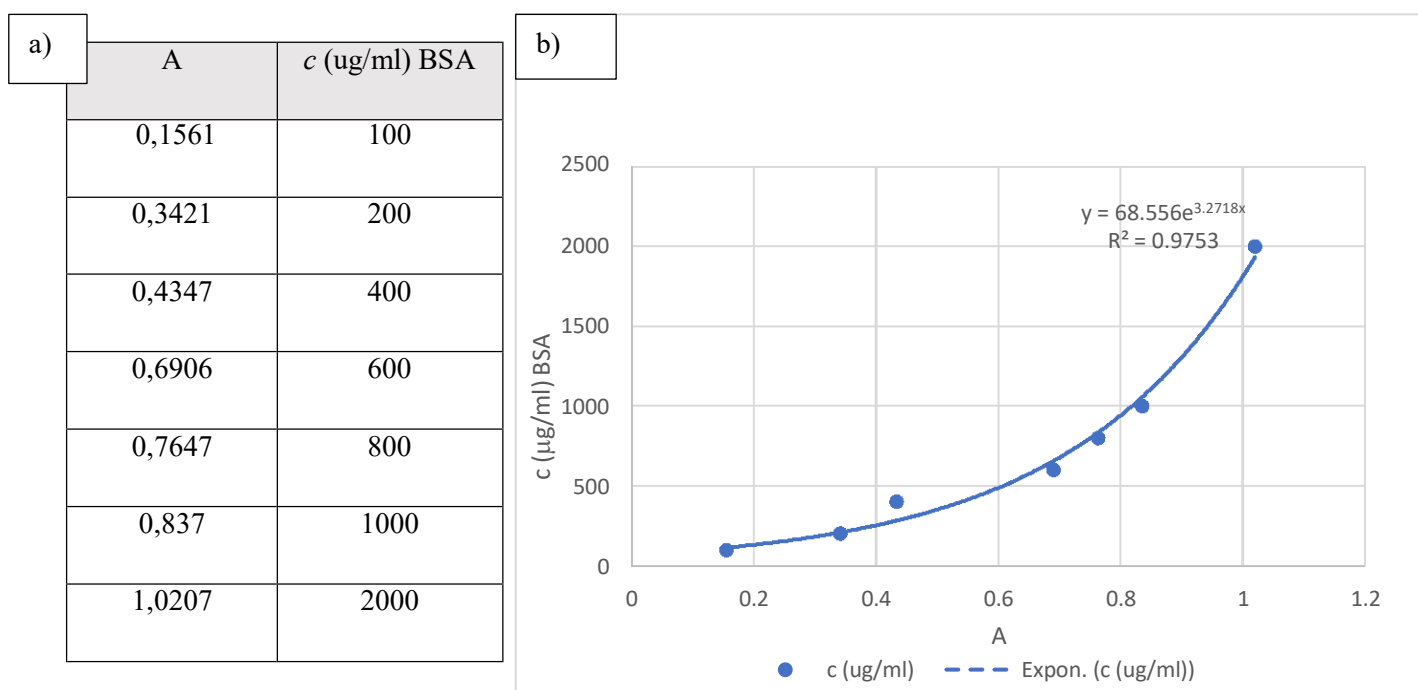
Nakon uzgoja stanica na posebno pripremljenim podlogama s eluiranim metalnim ionima te običnom, netretiranom podlogom kao kontrolom do rane stacionarne faze (16 – 20 h) na 30 °C i tresilici (150 – 200 rpm), stanicama je provjerena optička gustoća. U stacionarnoj fazi OD<sub>600</sub> ne smije prijeći 2, jer se on množi s ukupnim volumenom kulture (mL) kako bi se dobio ukupni OD koji je potreban za izračun količine. Stanice se nakon uzgoja centrifugiraju (3000 g, 5 min), a supernatant se uklanja. Zaostali se talog resuspendira se u dva volumena destilirane i deionizirane vode (ddH<sub>2</sub>O). Dobiveni talog se resuspendira u 1 mL pufera A (10 mM DTT-a) i inkubira na 30 °C (10 min). Centrifugira se na 1500 rpm (5 min) i uklanja se supernatant. Talog se ponovno resuspendira u 1 mL pufera B (mješavina enzima za lizu stanične stijenke) i inkubira se na 30 °C (1 sat). Prati se izbistravanje zbog sferoplasta – sferoplasti se centrifugiraju na 1500 rpm (5 min) i ponovno se uklanja supernatant. Od ovog se koraka sve radi na ledu. Dobiveni pelet se resuspendira u 1 mL pufera za homogenizaciju (koktel inhibitora proteaze). Suspenzija se prebacuje na Dounce-ov homogenizator i homogenizira se 10 – 15 puta, potom se centrifugira na 600 rpm (5 min) na 4 °C i skuplja se supernatant. Postupak se ponovi, potom se skupljeni supernatant centrifugira na 1200 rpm (10 min) na 4 °C, pažljivo se ukloni supernatant, a pelet je izoliran mitohondrij. Talozi se resuspendiraju u 50 µL pufera za pohranu i brzo se zamrznu u tekućem dušiku na –80 °C (63).

### 3.2.5. Izolacija proteina iz mitohondrija

Za analizu su korištene smjese izoliranih mitohondrija, pripremljenih na način da su se istovrsni uzorci (znači dobiveni nakon istovrsnih pokusa) spojili (za kontrolu šest uzoraka izoliranih mitohondrija, a za tretirane uzorke po tri). Takvi su skupljeni uzorci centrifugirani na 3000 o/min, na 0 °C. Na dobiveni talog svakog uzorka mitohondrija doda se smjesa trikloroacetene kiseline (TCA) u acetonu uz dodatak ditiotreitola DTT-a (10 % TCA u acetonu + 20 mM DTT) (2 mL), kako bi se ekstrahirali proteini. Ekstrakcija proteina odvija se preko noći na hladnom. Nakon toga uzorak se centrifugira 3000 o/min, na 0 °C, a dobiveni talog otopi u 50 µL pufera za liziranje te odredi količina proteina u svakom uzorku. Pufer za liziranje sastoji se od ureje, tioureje i detergenta Chaps-a.

### 3.2.6. Određivanje koncentracije proteina mitohondrija

Za mjerenje koncentracije proteina korišten je Bradfordov test – brza i osjetljiva metoda koja se temelji na pomaku maksimalne apsorbancije boje "Coomassie Brilliant BlueG-250" s 465 nm na 595 nm nakon vezanja na denaturirane proteine u otopini uzrokujući vidljivu promjenu boje na spektrofotometru. Što je prisutna veća koncentracija proteina, to će se vezati više "Comassie" boje (64). Prije određivanja koncentracije proteina, potrebno je izraditi baždarnu krivulju uz pomoć serije razrjeđenja standarda proteina. Proteini koji se najčešće koriste kao standardi su BSA (eng. *bovine serum albumin*) ili BGG (eng. *bovine  $\gamma$ -globulin*). Seriju razrjeđivanja standarda proteina BSA pripravljena je u rasponu koncentracija od 100 do 2000  $\mu\text{g/mL}$ . Pomoću Excell-a napravljena je baždarna krivulja i izmjerena koncentracija proteina u uzrocima. (Slika 17.)



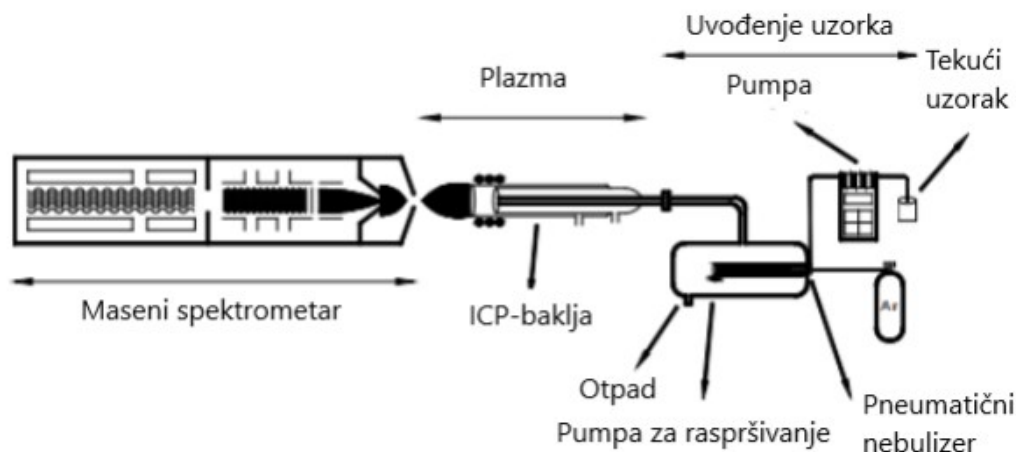
Slika 17. a) Tablični prikaz izmjerene apsorbancije pri različitim koncentracijama BSA; b) Baždarna krivulja ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA (plave točke su stvarne eksperimentalne vrijednosti, a isprekidana linija predstavlja teorijsku krivulju)

### 3.2.7. Određivanje koncentracije metalnih iona ICP-MS metodom

U pripremljenim iscrpinama ortodontskih aparatića, koje su u podlozi stajale 3, 7 ili 14 dana, metalni ioni određeni su ICP-MS metodom.

ICP-MS sastoji se od dvije komponente: induktivno spregnute plazme (ICP) i masene spektrometrije (MS). Metoda ICP-MS danas je isplativa tehnika određivanja elemenata u tragovima zbog brze provedbe, granice detekcije i izotopske sposobnosti (zastupljenošću) (65). Uzorak je najčešće u tekućem stanju i uvodi se u pneumatski raspršivač gdje se stvara aerosol. Male kapljice aerosola (čine 1 – 2 % uzorka) odvajaju se od većih kapljica u komori za raspršivanje. Male kapljice aerosola izlaze iz komore za raspršivanje i uvode se u plazmu. Aerosol putuje kroz različite temperaturne zone u plazmi, uzorak prolazi stadije desolvatacije, isparavanja, atomizacije i ionizacije. U ovoj fazi, uzorak iz tekućeg aerosola prelazi u čvrste čestice, a potom u plin. Pozitivno nabijeni ioni iz uzorka aerosola formiraju se pomoću plazme. (65)

Sučelje (međusklop) sastoji se od dva metalna konusa s vrlo malim otvorima, koji su u vakuumu. U sučelju se odvija prijenos nastalih iona iz plazme pri atmosferskom tlaku u masenom analizatoru. Između konusa sučelja i masenog spektrometra nalaze se ionske leće čija je uloga da usmjere i prenesu ione u maseni spektrofotometar, i zaustaviti neutralne čestice i fotone do masenog analizatora i detektora (65). (Slika 18.)



Slika 18. Osnovne komponente ICP-MS-a. (66)

Potom, ioni se na temelju omjera mase i naboja razdvajaju pomoću ionskih leća u vakuumu analizatora. Najčešće korišten maseni analizator je kvadrupolni maseni analizator, a najčešći detektor multiplikator elektrona. Detektor računa i pohranjuje ukupni signal (za svaki omjer mase i naboja) stvarajući maseni spektar (65).

ICP-MS 2030 sustav (Shimadzu, Kyoto, Japan) korišten je za određivanje 15 elemenata u tragovima: As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, V, Zn.. Helij (6 mL/min) i argon (8 mL/min) (Air products, Toruń, Poljska) djeluju kao sudarne čestice i plazmeni plinovi. Radiofrekvencijska snaga postavljena je na 1,2 kW, a sudarne čestice postavljene na -21 V. Za validaciju su korišteni: granica detekcije (engl. *limit od detection*, LOD) i granica kvantifikacije (engl. *limit od quantitation*, LOQ) (izražena kao  $3 \times$  i  $10 \times$  standardna devijacija), a točnost svakog mjerenja (izražena kao preostala standardna devijacija RSD) procijenjena je u smislu ponovljivosti ( $n = 3$ ). Kalibracijske krivulje dobivene su razrjeđivanjem anorganskog standarda kontrole kvalitete (IQC-019, Ultra Scientific, North Kingstown, RI, SAD) u 1 % HNO<sub>3</sub> (aq).

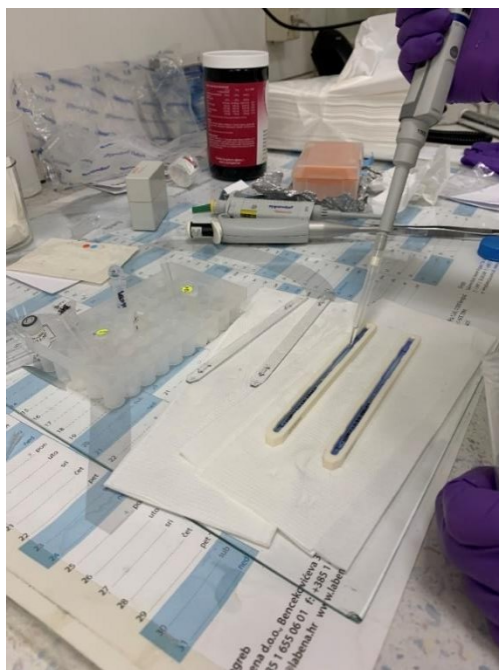
### 3.2.8. Dvodimenzionalna elektroforeza

#### 3.2.8.1. Prva dimenzija – izoelektrično fokusiranje

Uzorci otopljeni u puferu za liziranje, nakon određivanja koncentracije proteina nanose se na stripove tj. prvu dimenziju 2D-elektroforeze.

Korišteni su gel-stripovi Immobiline DryStrip, tvrtke "GE Healthcare", raspona pH 3 do 11 i veličine 13 cm.

Stripovi se polažu s gelom prema dolje u svježe pripremljen rehidracijski pufer u posebne keramičke kadice kao nosače (Slika 19.) Pufer za rehidraciju sadrži ureu i detergent Chaps (5,4 g + 0,4 g/10 mL deionizirane vode), a neposredno pred nanošenje, u uzorak doda se DTT (0 1 %) i IPG amfoliti, pH 3 – 11 (2 %). Chaps se koristi za solubilizaciju membranskih proteina i održavanje aktivnosti proteina kao nenedaturirajući deterdžent u izoelektričnom fokusiranju (67). Takva se otopina ravnomjerno nanese na nosač za strip.

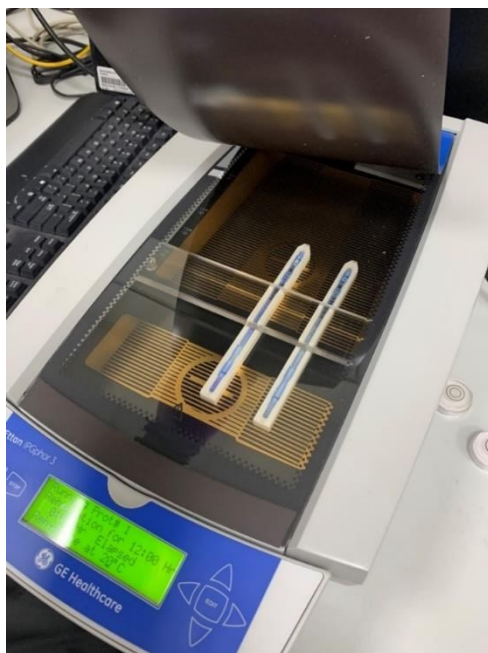


Slika 19. Nanošenje otopine za rehidraciju u nosač za strip. (izvor: *privatna arhiva*)

Otkloni se plastična folija sa stripa i provuče kroz suspenziju na nosaču, sa stranom gela okrenutom na donju stranu. Pozitivan kraj stripa postavljen je na pozitivan kraj nosača, a negativan na negativan kraj nosača. Sve se nadsloji s posebnim mineralnim uljem. Tako pripremljeni uzorci podvrgnuti su izoelektričnom fokusiranju (Slika 20.) u uređaju prema "GE Healthcare" protokolu (Tablica 1.).

Tablica 1. Program izoelektričnog fokusiranja

<b>korak</b>	<b>napon / V</b>	<b>vrijeme / h</b>	<b>način postizanja razlike potencijala</b>
<b>1</b>	50	1:00	Izokratno
<b>2</b>	200	1:00	Izokratno
<b>3</b>	500	1:00	Izokratno
<b>4</b>	1000	1:00	Gradijetno
<b>5</b>	8000	2:30	Gradijetno
<b>6</b>	8000	0:30	Održavanje
<b>7</b>	200	10:00	/



Slika 20. Postavljanje nosača za stripove tako da su u električnom kontaktu s elektrodama, postavljeni na program prema protokolu navedenom u Tablici 1. (izvor: *privatna arhiva*)

Nakon završenog izoelektričnog fokusiranja stripove je potrebno „uravnotežiti“ u posebnom puferu koji se sastoji od:

- Urea (6M) – 10,8 g
- Glicerol (30%) – 9 mL
- Tris/HCl pufer pH 8.8 (50 mM) – 1 mL
- SDS (2%) – 0,6 g
- ddH<sub>2</sub>O – 30 mL

Nakon što su stripovi izvađeni iz ekvilibracijskog pufera dodaje se DTT koji reducira disulfidne mostove. Stripovi se otapaju u Petrijevoj zdjelici u otopini s DDT-om tijekom 15 minuta. Nakon toga, dodajemo stripove u drugoj Petrijevoj zdjelici u otopini s IAA kako bi spriječili ponovni nastanak disulfidnih mostova.

### 3.2.8.2. Druga dimenzija – SDS-PAGE elektroforeza

Kao prvi korak druge dimenzije je priprema poliakrilamidnog gela 12 %-tne koncentracije za elektroforezu. (Tablica 2.)



Tablica 2. Prikaz volumena reagensa za pripremu poliakrilamidnog gela 12 %-tne koncentracije.

REAGENSI	KOLIČINA
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	51,17 ml
<b>AA/bis</b>	35,7 ml
<b>Tris/HCl</b>	29,75 ml
<b>10 % SDS</b>	1,19 ml
<b>10 % APS</b>	1,19 ml*
<b>TEMED</b>	47,6 μl*

\*dodaju se zadnji zbog polimerizacije

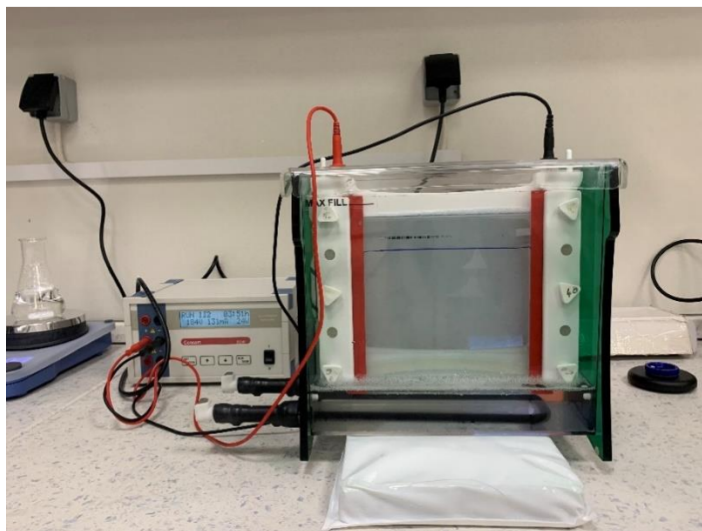
Gel se ulijeva u pripremljen kalup između dvije staklene ploče (dim. 16 x 16 cm), odvojene razmaknicama debljine 1 mm do gornjeg ruba stakla. Gornja površina gela prekriva se izopropanolom kako bi ostala ravna i zaglađena, i pusti se preko noći da se stisne.

Pripremljena otopina podijeli se na dva dijela. U prvi dio stavlja se DTT (1 %), a u drugi jodoacetamid (2,5 %). Nakon završetka izoelektričnog fokusiranja, trake se isperu super čistom vodom, potom se inkubiraju 15 minuta na miješalici u otopini s DTT-om, nakon toga ponovi se postupak s jodoacetamidom.

Prije nego što se nanose trake na gel, potrebno je pripremiti 10x SDS pufer i 0,5 % agarozu u SDS puferu čiji se sastav sastoji od:

- 10x SDS pufer:
  - Tris – 30 g
  - Glicin - 144 g
  - SDS – 10 g
  - dd H<sub>2</sub>O – do 1 L
  
- 0,5% agaroznu otopinu:
  - Agaroz – 0,25 g
  - 10x SDS pufer – 0,5 ml
  - 0,4 % bromfenol plavo – 4 kapi
  - ddH<sub>2</sub>O – do 50 ml

Iz 10x SDS pufera, priprema se 1x SDS pufer koji se koristi kao osnovni pufer za elektroforezu te 2x pufer koji se ulijeva između stakalaca dvaju gela tijekom elektroforeze. Trake se pažljivo pincetom postavljaju na jedan kraj gela, dok se na drugi kraj postavlja standard sa smjesom proteina poznate molekulske mase. Trake se dodatno na kraju učvrstne s 0,5 %-tnom agaroznom otopinom, nosači se prebace u kadnicu, a u prostor između gelova ulije se 2x SDS pufer. Kadica se poklopi s poklopcem i spoji na izvor električne struje. (Slika 21.) Elektroforeza se provodi u dvije faze. Prva faza traje 20 minuta – proteini se potiskuju sa stripa na gel, na jakosti struje od 20 mA i snazi od 1 W/gelu. Druga faza se provodi pri jakosti struje od 60 mA i snazi od 12 W/gelu. Postupak traje dok plava fonta od bromfenolnog modrila ne dospije do donjeg ruba gela. Kad postupak elektroforeze završi, nosač se izvadi iz kadice i gelovi se odvoje od stakla.



Slika 21. Slika aparature SDS-PAGE-a (izvor: *privatna arhiva*)

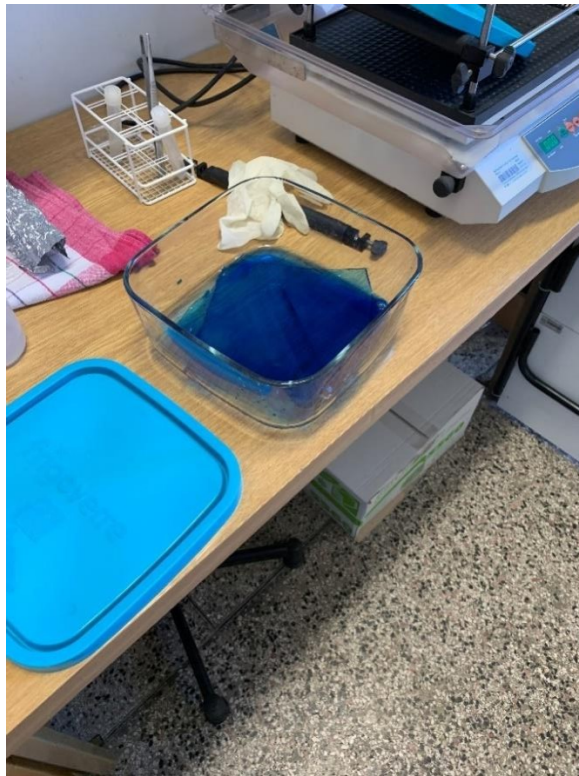
### 3.2.9. Obrada gelova

Nakon završetka elektroforeze, sustav se rastavlja, gelovi se pažljivo izvlače i različito se označe zarezivanjem vanjskih rubova. Gelovi se prenose u posudu u kojoj će se provesti bojanje Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 bojom.

Postupak bojanja je sljedeći:

- Fiksacija gela u 50 %-tnom etanolu i 3 %-tnoj fosfornoj kiselini (3 h/noć)
- Ispiranje s ddH<sub>2</sub>O (3x20 minuta)
- Predinkubacija u 34 %-tnom metanolu, 3 %-tnoj fosfornoj kiselini i 17 %-tnom amonijevom sulfatu (1 h)
- Doda se 0,35 g CBB R-250 na 1 L otopine i boja se 4-5 dana (Slika 22.)

- Ispiranje boje s ddH<sub>2</sub>O



Slika 22. Plavi gel nakon tresilice (izvor: *privatna arhiva*)

### 3.2.10. Analiza slika gelova

Nakon odbrojavanja, i skeniranja na Bio-6000 skeneru, dobiveni elektroferogrami obrađeni su i analizirani programom "Dymension 2" ("Syngene<sup>TM</sup> Dymension 2 Software"); koji je prikladan za analizu elektroforetski obojenih gelova. Glavne karakteristike su mu da ima sposobnost otkrivanja i usporedbe proteinskih mrlja između uzoraka koji sadrži više replika gela. Omogućuje usporedbu referentnog gela (proteini mitohondrija netretiranog kvasca) s ostalim gelovima od interesa. Dobiveni proteini s promijenjenim [povećanim ili smanjenim izričajem (ekspresijom)] dodatno se šalju na identifikaciju spektrometrom mase.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Određivanje vijabilnosti stanica Lunom

Utjecaj metalnih iona otpuštenih u kvašćevu podlogu kroz različit vremenski period (3, 7 i 14 dana) na stanice kvasca *S. cerevisiae* najprije je ispitivan preko vijabilnosti. Kvasac je uzgajan na tim podlogama, do rane stacionarne faze, a promjene i broju i načinu rasta stanica ispitane su čitačem stanica "LUNA".

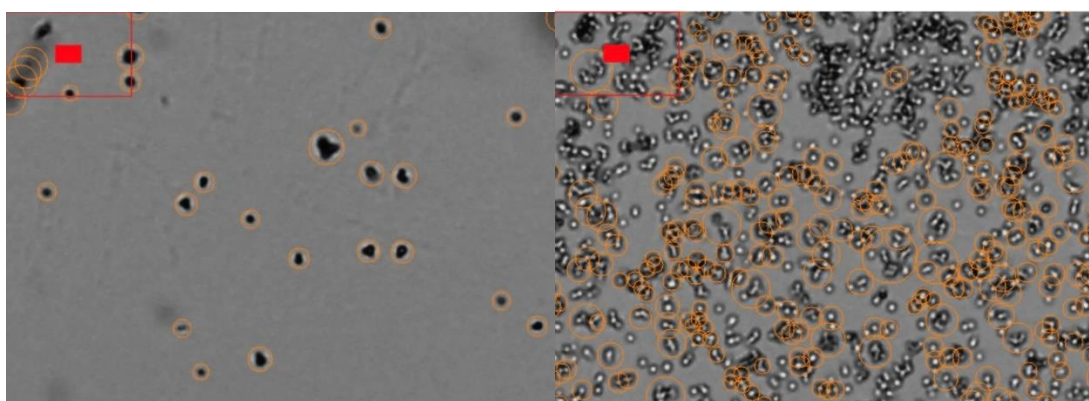
U Tablici 3. su prikazane početne i krajnje vrijednosti (nakon završenog rasta) stanica u svakom eksperimentu, dok su u Tablici 4. prikazane krajnje vrijednosti, nakon završenog rasta.

Tablica 3. Ishodna kultura kvasca korištena u pripremi daljnjih pokusa

Broj nakupina stanica (%)	Početak uzgoja	Kraj uzgoja
1	92,6	91,6
2	5,2	6,4
3	1,5	1,7
4	0,4	0,3
5	0,0	0,1
6	0,0	0
7	0,0	0
>7	0,4	0
Ukupna koncentracija (cells/ml)	$5,72 \times 10^5$	$5,28 \times 10^7$
Prosječna veličina ( $\mu\text{m}$ )	12,3	8,5
Ukupan broj	266	8189

Tablica 4. Podaci o broju nakupina stanica na kraju uzgoja u kontrolnom uzorku te u tretiranim uzorcima

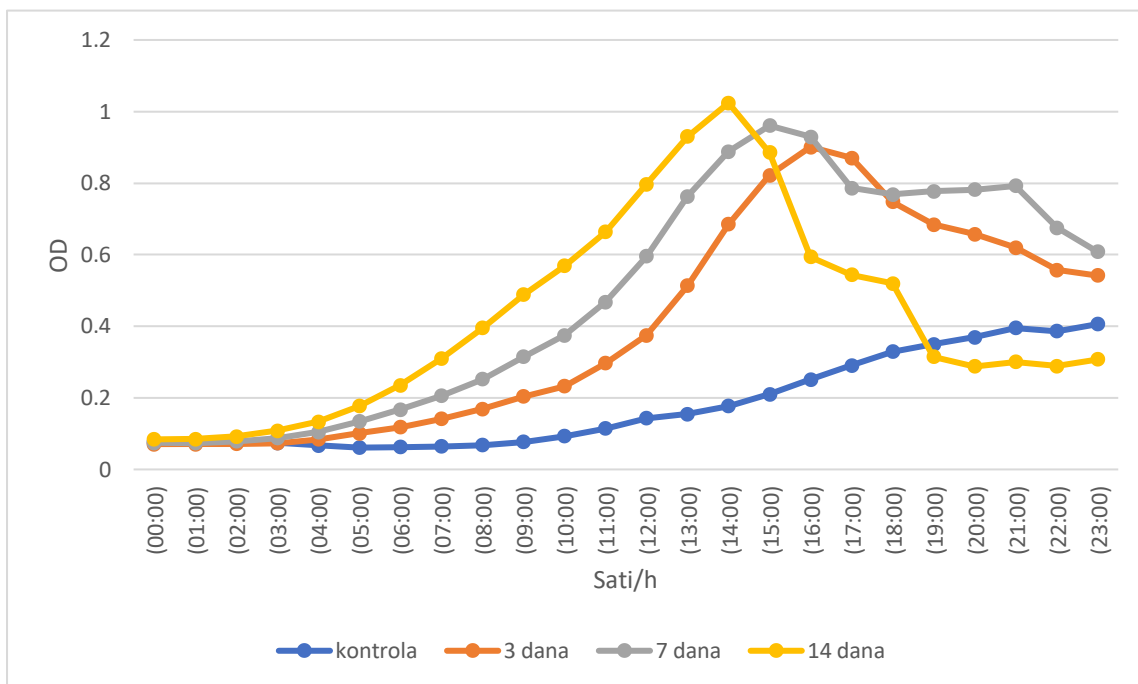
Broj stanica u nakupinama (%)	3 dana	7 dana	14 dana	kontrola
1	53,9	49,5	56,1	62,7
2	14,9	14,9	19,0	17,5
3	8,8	7,3	10,8	8,3
4	4,2	4,0	4,9	4,0
5	3,3	3,8	3,4	2,7
6	2,2	3	1,8	1,6
7	1,8	2,1	1,2	0,9
>7	11,0	15,4	2,8	2,3
Ukupna koncentracija (cells/ml)	$1,69 \times 10^7$	$1,22 \times 10^7$	$1,25 \times 10^7$	$1,67 \times 10^7$
Prosječna veličina ( $\mu\text{m}$ )	8,5	8,2	10,8	8,7
Ukupan broj	7873	5658	5821	7767



Slika 23. Slika lijevo prikazuje vidno polje na čitaču "LUNA" sa stanicama kvasca na početku uzgoja (broj stanica oko  $1 \times 10^6$ ), a slika desno je kraj uzgoja (broj stanica oko  $1 \times 10^7$ ). Sličan obrazac primjećuje se i u kontroli i u svim tretiranim uzorcima.

#### 4.2. Ispitivanje utjecaja otpuštenih metalnih iona na stanice kvasca krivuljama rasta

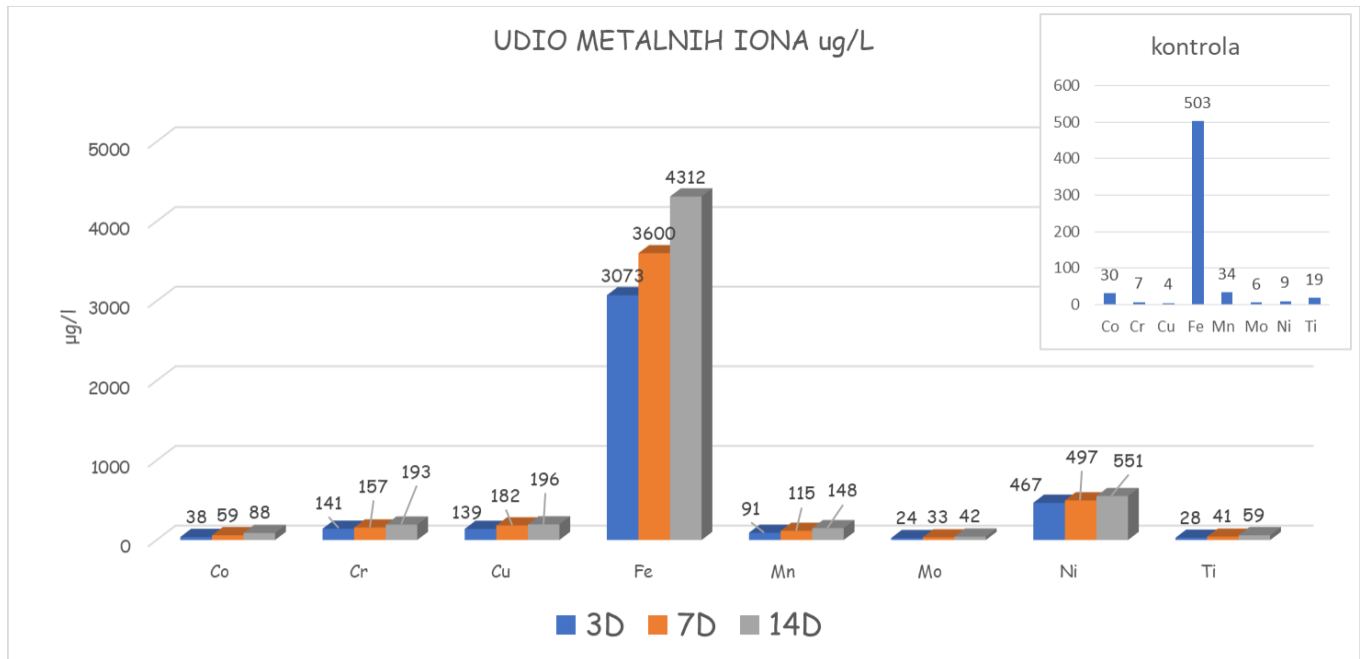
Utjecaj različitih metalnih iona otpuštenih u podlogu kroz 3, 7 ili 14 dana na stanice kvasca, praćen je optičkim čitačem kojim se mjerila gustoća stanica naraslih u eksperimentalnim podlogama na 620 nm ( $OD_{620}$ ) svakih sat vremena, tijekom 24 sata. Iz dobivenih su podataka rezultati sumirani i prikazani grafički tzv. krivuljama rasta. Slika 24. prikazuje krivulje rasta stanica tijekom 24 sata na pripremljenim podlogama (s eluiranim metalnim ionima, kroz 3, 7 i 14 dana), uz običnu YPD podlogu kao kontrolu.



Slika 24. Krivulja rasta kvasca *S. Cerevisiae* W303 nakon tretmana ionima kroz period od 3, 7 i 14 dana.

#### 4.3. Određivanje sadržaja i sastava metalnih iona otpuštenih u eksperimentalne podloge

Sadržaj i sastav metalnih iona koji su se otpustili u kvašćevu podlogu tijekom 3, 7 i 14 dana, određen ICP-MS metodom, prikazan je Slikom 25. „Obična“ netretirana kvašćeva podloga korištena je kao kontrola.



Slika 25. Sadržaj i sastav 8 najvažnijih metala otpuštenih u kvašćevu podlogu tijekom 3, 7 i 14 dana eluiranja u YPD podlogu

#### 4.4. Određivanje koncentracije proteina u mitohondrijima kvasaca tretiranih pripremljenim eksperimentalnim podlogama s otpuštenim metalnim ionima

U Tablici 5. su prikazani rezultati koncentracija proteina dobivenih iz izoliranih mitohondrija tretiranih kvasaca. Kao kontrola koristio se netretirani uzorak.

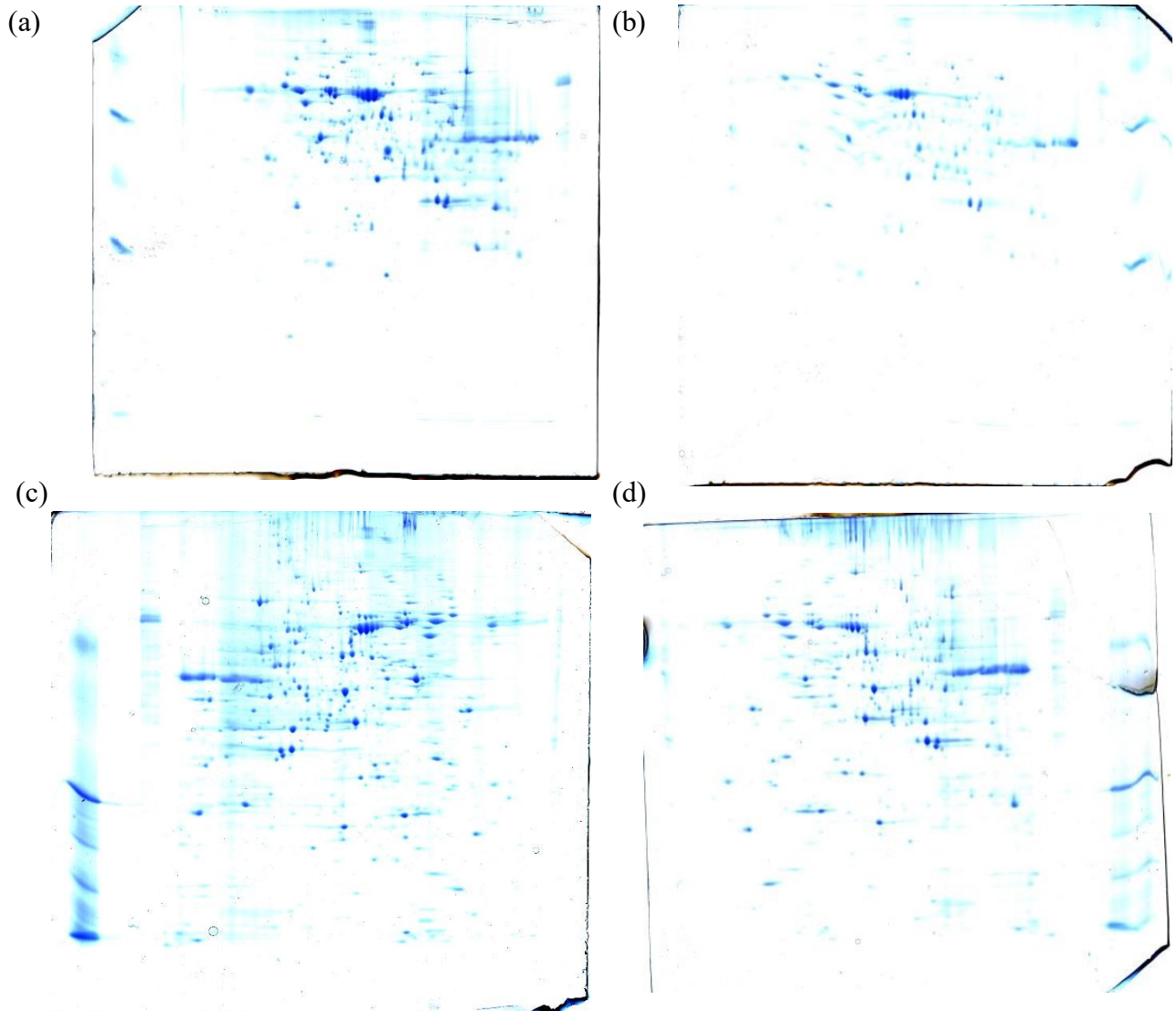
Tablica 5. Koncentracije proteina u izoliranim frakcijama mitohondrija.

OZNAKA UZORKA	<i>c</i> (μg/μl)
<b>P3D</b>	2,56
<b>P7D</b>	4,12
<b>P14D</b>	4,43
<b>KONTROLA</b>	2,78



#### 4.5. Analiza proteoma mitohondrija kvasca

Nakon završene 2D-elektroforeze i obrade gelova skenerom Bio-4000 dobiveni su elektroferogrami prikazani Slikom 26.



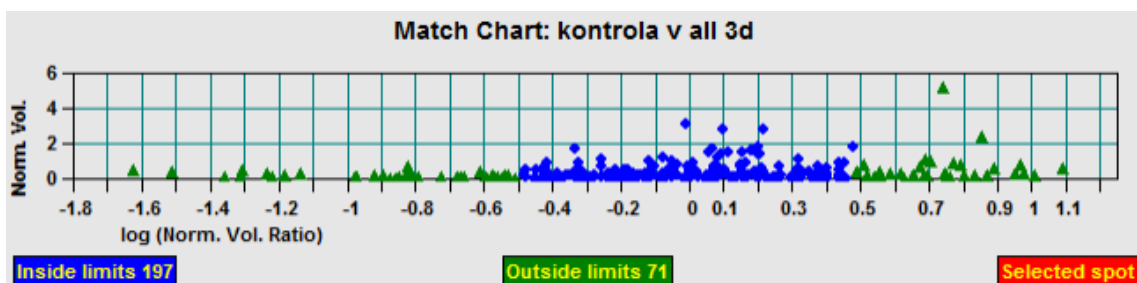
Slika 26. Elektroferogrami uzoraka mitohondrija kvasca. (a) Uzorak kontrole; (b) uzorak tretiran iscrpinom od 3 dana; (c) uzorak tretiran iscrpinom od 7 dana; (d) uzorak tretiran iscrpinom od 14 dana.

Nakon obrade gelova s programom "Dymension" dobiveni su podatci o ukupnom broju proteina u svakom uzorku mitohondrija i podatci o promjeni izričaja proteina kroz promjenu volumena određenog proteina. Promjena se iskazuje kao smanjenje, odnosno povećanje ekspresije u odnosu na kontrolu (prikazano grafovima 1., 2. i 3.) i rezimirano Veenovim dijagramom (slika 27). Promjene u ekspresiji tretiranih i međusobno uspoređenih uzoraka prikazani grafovima 4., 5. i 6., odnosno rezimirano Veenovim dijagramom (slika 28).

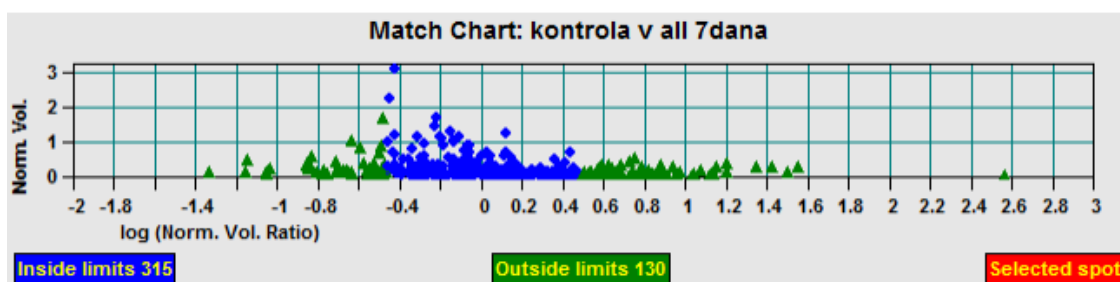
Plave točke u grafovima (*inside limits*) prikazuju proteine unutar raspona od -0,5 i 0,5 koji ne pokazuju značajnu razliku u ekspresiji. Zelene točke, mogu imati negativne vrijednosti (raspon od -0,5 do -3) i označuju smanjenu ekspresiju o odnosu na kontrolu (lijevo na grafu), dok pozitivne vrijednosti (raspon od 0,5 do 3, desno na grafu) označuju povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu.

Tablica 6. Ukupni broj proteina određen u mitohondrijima izoliranim iz netretiranih kvasaca (kontrola) te kvasaca tretiranih iscrpinama ortodontskih naprava eluiranih 3, 7 i 14 dana

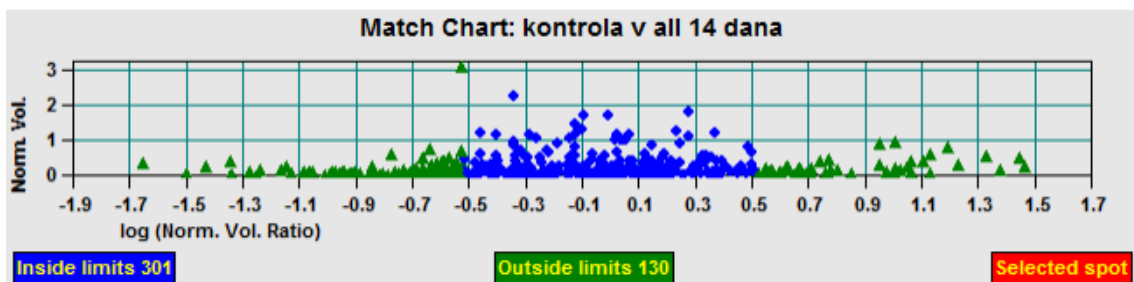
Netretirani uzorak	3 dana	7 dana	14 dana
747	355	944	876



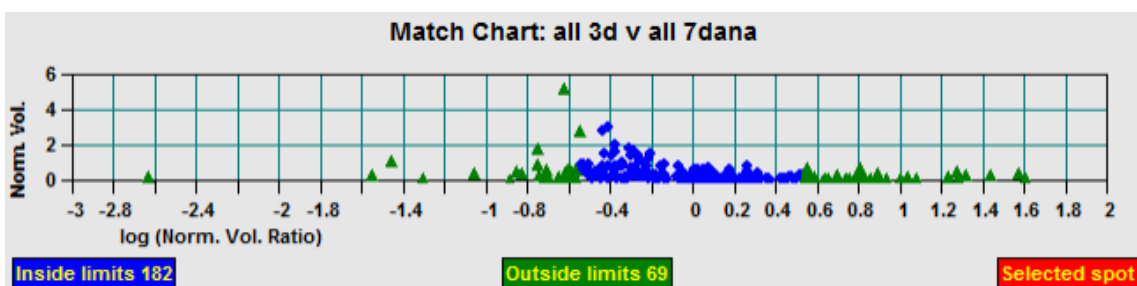
Graf 1. Rezultati preklapanja proteina netretiranog kvasca (kontrola) i kvasca tretiranog iscrpinama nakon 3 dana eluiranja



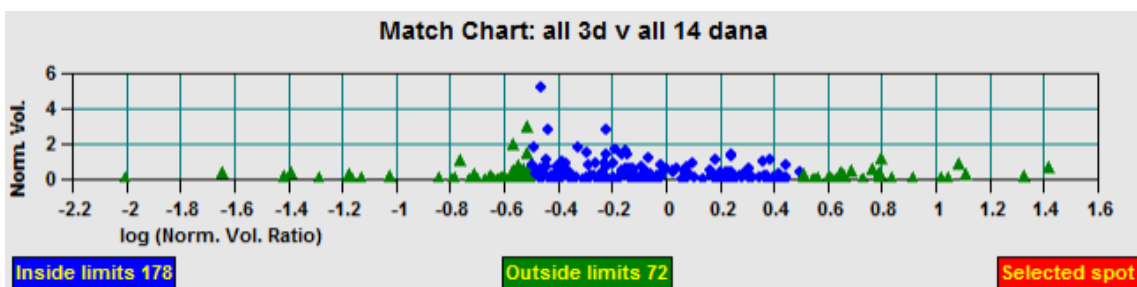
Graf 2. Rezultati preklapanja proteina netretiranog kvasca (kontrola) i kvasca tretiranog iscrpinama nakon 7 dana eluiranja



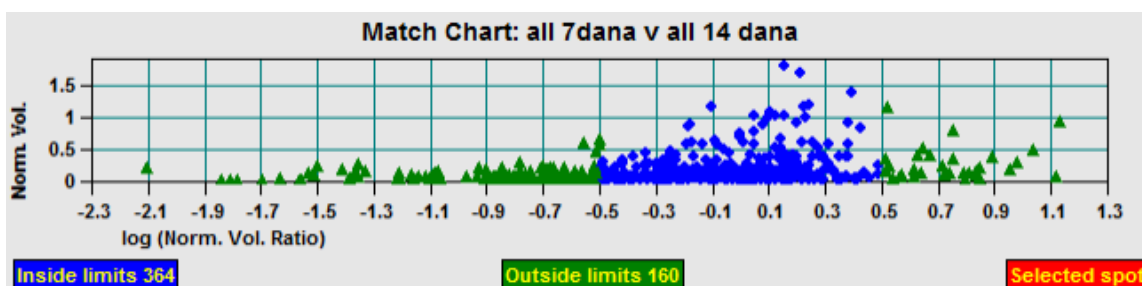
Graf 3. Rezultati preklapanja proteina netretiranog kvasca (kontrola) i kvasca tretiranog iscrpinama nakon 14 dana eluiranja



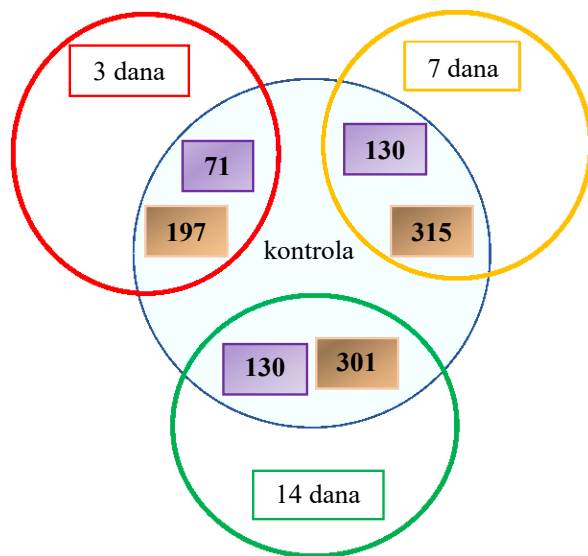
Graf 4. Rezultati preklapanja proteina kvasca tretiranog nakon 3 dana i kvasca tretiranog iscrpinama nakon 7 dana eluiranja



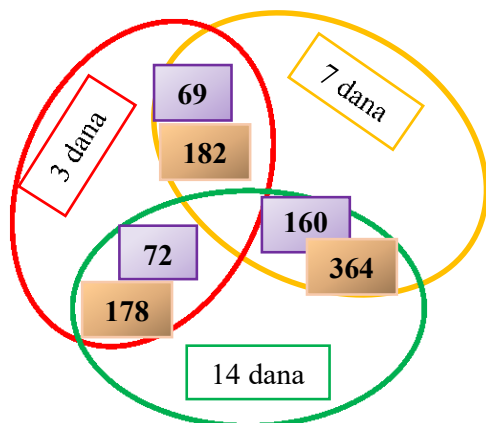
Graf 5. Rezultati preklapanja proteina kvasca tretiranog nakon 3 dana i kvasca tretiranog iscrpinama nakon 14 dana eluiranja



Graf 6. Rezultati preklapanja proteina kvasca tretiranog nakon 7 dana i kvasca tretiranog iscrpinama nakon 14 dana eluiranja

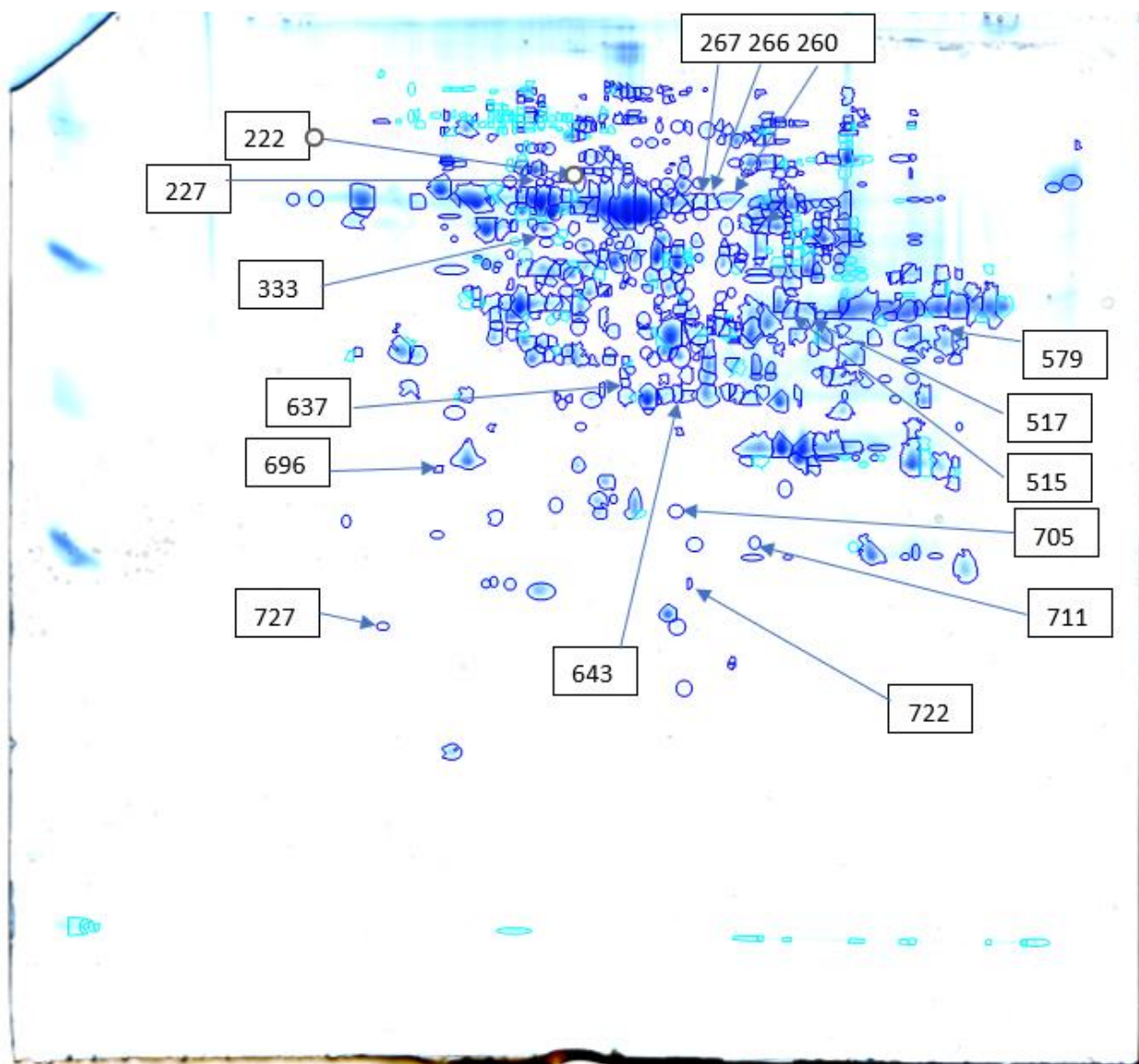


Slika 27. Veenov dijagram preklapajućih proteina tretiranih uzoraka (3, 7 i 14 dana) s kontrolom. Narančastim je označen broj ukupnih preklapajućih proteina, a ljubičastim broj značajno različitih.



Slika 28. Veenov dijagram preklapajućih proteina svih tretiranih uzoraka (3, 7 i 14 dana) međusobno. Narančastim je označen broj ukupnih proteina, a ljubičastim broj značajno različitih.

Preklapanjem i usporedbom svih elektroferograma, Slika 29. prikazuje rezimirane rezultate na kojoj su istaknuti najizraženije promijenjeni proteini (bilo s najmanje ili najviše promijenjenom ekspresijom). Vrijednosti (volumen) pojedine promjene prikazan je u Tablici 7.



Slika 29. Elektroferogram s istaknutim proteinima mitohondrija koji pokazuju najizraženiju promjenu u ekspresiji tijekom tretmana kvasca eluatima ortodontskih aparatića.

Tablica 7. Prikaz najizraženijih promijenjenih ekspresija proteinskih profila tretiranog kvasca u određenom vremenskom razdoblju u odnosu na kontrolu.

Broj proteinske točke	Volumen proteinske točke			
	Kontrola	3 dana	7 dana	14 dana
222	1	/	-2,211	-44,676
227	1	-1,035	26,335	10,055
260	1	-1,723	-1,724	-44,676
266	1	2,519	-14,243	-2,035
267	1	-1,088	-21,815	-14,553
333	1	1,686	-7,015	-27,077
515	1	-17,195	-3,04	-4,268
517	1	-32,88	-3,757	-3,954
579	1	-42,411	-1,133	-1,996
637	1	2,037	7,621	1,026
643	1	1,209	-1,338	10,1
696	1	0,045	35,455	29,123
705	1	/	3,704	1,026
722	1	4,266	6,28	7,13
727	1	/	16,065	21,411
729	1	/	31,685	23,624

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Određivanje vijabilnosti stanica Lunom

Na početku uzgoja kvasaca ukupna koncentracija iznosila je  $5,72 \times 10^5$  cells/ml (stanica/ml), dok je na kraju iznosila je  $5,28 \times 10^7$  cells/ml (Tablica 3.). Prosječna veličina na početku uzgoja iznosila je 12,3  $\mu\text{m}$ , dok je na kraju veličina stanica bila nešto manja, zbog ubrzanе diobe stanica i iznosila je 8,5  $\mu\text{m}$ . Takav se vitalan kvasac koristio za nacjepljivanje eksperimentalnih podloga s eluiranim metalnim ionima i u svim je eksperimentima primijenjen isti princip, da početan broj stanica bude oko  $1 \times 10^6$  stanica. Iz podataka prikazanih u Tablici 4. možemo vidjeti broj stanica kvasaca nakon oko 24 sata rasta na takvim eksperimentalnim podlogama (do rane stacionarne faze). Po dobivenim se vrijednostima može primijetiti smanjenje broja stanica kvasca na podlogama nakon 7 i 14 dana eluiranja. Još se veći utjecaj može primijetiti na način rasta stanica jer se primjećuje povećano stvaranje nakupina.

Prema novijim istraživanjima *S. cerevisiae* je organizam koji je sposoban preživjeti toksičnost metala i različite oblike toksičnog stresa – zato se smatra idealnim modelom za istraživanje odgovora na stres na molekularnoj i staničnoj razini (48, 68). U optimalnim uvjetima koncentracija stanica kvasaca povećava se nekoliko desetaka puta, dok će rast biti smanjen ukoliko se dodaju metali (poput  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$ ) u prekomjernoј količini (68). Dodatak metalnih iona rezultira manjom koncentracijom stanica, zbog odgovora kvasca na stres i aktivacije niza mehanizama obrane (68).

### 5.2. Ispitivanje utjecaja otpuštenih metalnih iona na stanice kvasca krivuljama rasta

Rast stanice kvasca na YPD podlogama s eluiranim metalnim ionima 3, 7 i 14 dana i na netretiranoј YPD podlozi kao kontroli, praćen je optičkim čitačem tijekom 24 sata na 600 nm. Dobiveni rezultati na Slici 24. pokazuju sličnu fazu prilagodbe, u prvih 4 sata na svim eksperimentalnim podlogama. Nakon sljedećih 10 sati stanice kvasca su na svim eluiranim podlogama u eksponencijalnoj fazi rasta, s najbržim rastom na podlozi s najvećom količinom metalnih iona (nakon 14 dana eluiranja), dok je na kontrolnom uzorku (bez eluiranih iona) rast najsporiji. Taj je rezultat donekle iznenađujući, jer se čini da metalni ioni prisutni u podlogama pogoduju rastu kvasca, te da je rast brži i da korelira s količinom metalnih iona. Osim toga, kvasac koji se koristi u pokusu je auksotrofni mutant na His te zbog toga osjetljivi na prisustvo metalnih iona u podlozi (84).

Metalni ioni iz podloge doprinose bržem rastu, ali upravo na uzorku s najvećom količinom

metalnih iona (eluiranom 14 dana) primjećuje se najbrže i jako naglo odumiranje, gotovo bez stacionarne faze. Poznato je da tijekom stacionarne faze, stanica troši energiju za održavanje metaboličkih funkcija, da se u toj fazi doseže maksimalna gustoća stanica i broj stanica je konstantan. Kad stanice odumiru, rast novih stanica moguć je jedino na račun starih/mrtvih stanica. U fazi ugibanja, odnosno završnoj fazi rasta stanice, razlog prestanka rasta može biti iscrpljenje hranjivih tvari ili akumulacija toksina (metalni ioni). Ako se toksin nakupi u mediju, brzina rasta će usporiti i u ovisnosti o razini koncentracije inhibitora rast stanica će se zaustaviti (80). Unatoč njihovoj nutritivnoj važnosti, metalni ioni u većim količinama djeluju toksično (68). Kada je visoka razina koncentracije iona u stanica, metal se može natjecati s drugim enzimima za aktivna mjesta i stvoriti reaktivne vrste kisika koja oštećuju strukture same stanice (81).

### 5.3. Određivanje sadržaja i sastava metalnih iona otpuštenih u eksperimentalne podloge

Na Slici 25. prikazan je sadržaj i sastav osam najvažnijih metala otpuštenih u kvašćevu podlogu tijekom 3, 7 i 14 dana eluiranja u YPD podlogu.

Na Slici 25. se može vidjeti da se u svim vremenskim periodima eluiranja otpušta najviše iona željeza (3073 – 4312  $\mu\text{g/L}$ ), kojeg čak i netretiranoj kvašćevoj podlozi ima u količini od oko 500  $\mu\text{g/L}$ . Ta količina željeza u kontrolnoj podlozi ne iznenađuje, jer se radi o „punoj“, nutritivno bogatoj podlozi za rast kvasaca, ali iznenađuje količina eluiranih iona željeza iz ortodontskih aparatića (od gotovo 4  $\text{mg/L}$ ). U radu Čanadi Jurešić i sur. (68) pokazano je djelovanje povećanih količina iona željeza na rast i metabolizam stanica kvasca – uz smanjenje rasta, smanjuje se metabolička aktivnost i unutarstanična oksidacija. Znači, da su u podlozi prisutni samo ioni željeza, već bi se mogli očekivati negativni učinci na vitalnost i vijabilnost stanica kvasca. U ovakvim uvjetima, s više različitih otpuštenih iona, očekuje se sinergistički učinak, koji je potvrđen i dokazan u nekoliko istraživanja (48, 76). Sljedeći po otpuštenoj koncentraciji je nikal kojeg u kontrolnoj podlozi gotovo da i nema, a u eluatima je koncentracija u rasponu 467  $\mu\text{g/L}$  nakon 3 dana eluiranja, 497  $\mu\text{g/L}$  nakon 7 dana do 551  $\mu\text{g/L}$  nakon 14 dana. U literaturi ima sličnih istraživanja, ali se uglavnom radi o eluatima u umjetnu slinu, a ne u podlogu, kao u ovom radu. Prema sličnoj studiji Mikulewicza i sur. (2012.) (77), gdje je praćeno eluiranje iz sličnog ortodontskog aparatića, ali u umjetnu slinu kao medij, zabilježena je količina iona nikla od 573  $\mu\text{g/L}$  nakon 30 dana eluiranja. U tom je radu utvrđena količina iona kroma od 100,7  $\mu\text{g/L}$ , što je niže nego u ovom istraživanju, gdje je nakon 3 dana eluiranja (kad je zabilježena najniža vrijednost) ona iznosila 141  $\mu\text{g/L}$ , s tendencijom porasta s dužinom



eluiranja pa je nakon 14 dana eluiranja količina iona kroma iznosila 193 µg/L.

I za ione bakra i mangana (u ovom istraživanju) primijećen je isti trend porasta koncentracije s dužinom eluiranja. Najveće zabilježene doze su za ione bakra 196 µg/L i mangana 148 µg/L.

Izmjerene koncentracije u podlozi i za ione željeza, nikla, kroma, mangana i bakra premašuju maksimalno dozvoljene doze u vodi za piće, koje iznose redom 200 µg/L, 20 µg/L, 25 µg/L, 50 µg/L i 20 µg/L i te bi količine, da su prisutne u pitkoj vodi bile neprihvatljive i štetne za ljudsko zdravlje (78). Razlog ovakvom neočekivanom otpuštanju metalnih iona iz dentalnih materijala može se tražiti u proizvodnom procesu korištenih (Ni-Ti i čeličnih) legura te nastaloj i vrlo vjerojatno uznapredovanoj galvanskoj koroziji (79).

U svom radu Kovač i sur. (2020.) (48) objašnjavaju da metalni ioni koji se oslobađaju iz fiksnih ortodontskih aparata u usnu šupljinu, zbog svojstva korozije i biorazgradnje, u visokim koncentracijama izazivaju oksidativni stres, osobito kod pacijenta sa slabim antioksidativnim obrambenim sustavom. Kontaminacija teškim metalima uzrokuje niz štetnih učinaka na tijelo ljudi i životinja. Tijekom oksidativnog stresa uzrokovanog teškim metalima dolazi do vezanja iona metala na DNK što uzrokuje oštećenje DNK stanice. Ako se ne prepoznaju simptomi kontaminacije kao što su poremećaj središnjeg živčanog sustava, bolesti bubrega, jetre, nesаница, depresija i poremećaj vida, koji su prvi pokazatelji i ne pristupi odgovarajućem liječenju, dolazi do povećane stope morbiditeta i mortaliteta (69).

ROS oštećuju makromolekule u stanicama, i dolazi do oksidacije proteina, peroksidacije lipida i oštećenja DNA. Do oštećenja dolazi kad su metali prisutni u većim količinama. U svakoj stanici potrebne su određene, optimalne količine metalnih iona, koji u organizmu služe kao katalizatori ili za održavanje strukture stanice. Isto tako, postoje mehanizmi tolerancije koji reguliraju dostupnost esencijalnih metala i ograničavaju učinke toksičnosti (69). Avery (2001.) (71) u svom radu objašnjava učinak metala na stvaranje ROS u biološkim sustavima. Stvaranje ROS-a pomoću metala događa se putem Fentonove ili Haber-Weissove reakcije, katalizirane redoks aktivnim metalima (Cu, Fe, Cr, V), pri čemu se stvaraju reaktivni hidroksilni OH• iz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i superoksidni radikali O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> (55,71). Bakar i željezo direktno induciraju oksidativno oštećenje – dolazi do peroksidacije lipida. Oštećenje membrane posredovano metalima ovisi o lipidnom sustavu organizma, posebno o sadržaju nezasićenih masnih kiselina. Do oksidacije masnih kiselina dolazi u mitohondriju, koji je ujedno i mjesto povećane proizvodnje ROS-a (70).

#### 5.4. Određivanje koncentracije proteina u mitohondrijima kvasaca tretiranih pripremljenim eksperimentalnim podlogama s otpuštenim metalnim ionima

U Tablici 5. prikazane su koncentracije proteina kvasca tretiranog iscrpinama metalnih iona i uspoređene s netretiranim uzorkom. Nakon prvotnog smanjenja (u uzorcima nakon 3 dana eluiranja) veće koncentracije proteina (4,12 i 4,43  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) izmjerene su u uzorcima nakon 7 i 14 dana eluiranja u odnosu na kontrolu (2,78  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Jedno od mogućih objašnjenja je da dolazi do oksidacije proteina nastalim ROS. Mnogi oksidirani proteini nisu aktivni, ali se tijekom vremena oni mogu akumulirati i doprinijeti oštećenju, starenje i smrti stanice. Osim toga uočena je povezanost između teških metala i poremećaja strukturiranja proteina. Zbog interakcija metalnih iona i proteina u delikatnoj fazi smatanja može doći do nakupljanja proteina i pogrešnog smatanja, što se upravo i dešava i karakteristično je za neurodegenerativne poremećaje poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (69, 75).

*S. cerevisiae* dobar je apsorbens za metalne ione zbog stanične stijenke koja veže metalne ione i povećava ekspresiju proteina na površini stanice (73). U kvascu postoje transkripcijski faktori koji moduliraju ekspresiju gena kako bi kodirali proteine uključene u apsorpciju metalnih iona. Veća koncentracija bakra u stanici rezultira inhibicijom ekspresije gena. Geni koji su aktivirani bakrenim ionima kodiraju proteine (Cup1 i Cr5 metalotioneini, Sod1 superoksidna dismutaza) koji imaju zaštitne uloge (72).

#### 5.5. Analiza proteoma mitohondrija kvasca

Potpuna sekvenca nukleotida dobivena je sekvenciranjem genoma za kvasac *S. cerevisiae* i druge mikrobne vrste. Iz sekvenci gena mogu se proučiti mnoge buduće biokemijske funkcije i regulacijski putevi stanice. Kako bi razumjeli funkciju gena potrebno je istražiti proteom. Tehnika, kao što je dvodimenzionalna elektroforeza (2DE) omogućuje velika, usporedna istraživanja staničnih proteina za određivanje sinteze i posttranslacijskih modifikacija. Za organizme s poznatim sekvencama genoma, 2DE može s drugim tehnikama brže i jednostavnije identificirati proteine (83).

Elektroferogram je grafički prikaz podataka elektroforetske separacije proteina na osnovu njihove veličine i električnog naboja, proteini migriraju različitom brzinom kroz gel (84).

U elektroferogramima prikazanima slikom 24. smanjenje ekspresije rezultira slabijim signalom za ciljani protein, ili protein čak nije vidljiv na gelu [nema njegovog „spotića“ (mrljice)]. Kada je povećana ekspresija proteina, signal za ciljani protein je jači na elektroferogramu.

U Tablici 6. navedeni su ukupni proteini određeni nakon obrade elektroferograma

programskom podrškom „Dymension“. U tretiranim uzorcima (osim u uzorku nakon 3 dana eluiranja) utvrđen je povećan broj proteina, u odnosu na kontrolu. Takvo povećanje broja proteina, vjerojatno kao posljedica povećanja ukupne transkripcije, dobiveno je i u prethodnom istraživanju za uzorke kvasca tretiranog ionima olova (68) i adaptacijski je odgovor stanica kvasca na oksidativni stres (85) odnosno rezultat povećane sinteze proteina, zbog povećane potrebe na antioksidacijskim enzimima i hvatačima slobodnih radikala (86). Na Grafovima 1. – 3. te Veenovom dijagramu na Slici 27., može se primjetiti da je u uzorku tretiranom iscrpinom nakon 7 dana eluiranja, kao i u onom od 14 dana eluiranja utvrđen podjednako velik broj zajedničkih proteina (njih 130). No, iako je broj jednak, u uzorku od 7 dana više je onih s povećanom ekspresijom (Graf 2.), dok je u uzorku nakon 14 dana eluiranja više zajedničkih proteina sa smanjenom ekspresijom. Od rezultata prikazanih Grafovima 4. – 6. i Veenovim dijagramom na Slici 28. valja istaknuti Graf 6. jer potvrđuje promjene upravo na uzorcima tretiranim eluatima od 7 i 14 dana – najviše je zajedničkih proteina, s izraženom promjenom ekspresije njih 160, od čega više proteina sa smanjenom ekspresijom.

U tablici 7. prikazani su volumeni najizraženije promijenjenih ekspresija proteinskih profila tretiranog kvasca s eluatima od 3, 7 i 14 dana, u odnosu na kontrolu. U uzorcima nakon 3 dana u odnosu na kontrolu 6 proteinskih točaka je povećalo (+), a 6 proteinskih točaka smanjilo (-) ekspresije proteina, dok 4 proteina točke nisu pronađena u uzorku od 3 dana. Za tretirani kvasac nakon 7 dana u odnosu na kontrolu, za 9 proteinskih točaka utvrđeno je smanjenje (-) promjene ekspresije proteina i za 7 proteinskih točaka povećanje (+) promjene ekspresije proteina. Za tretirani kvasac eluatom nakon 14 dana, 8 proteinskih točaka smanjenje (-) promjene ekspresije proteina i 8 povećanje (+) promjene ekspresije proteina.

Sudeći prema podacima iz dostupne literature (68), značajno smanjenje ekspresije dešava se u enzimima vezanima za energetske metabolizam te metabolizam ugljikohidrata. Često su manje ekspimirani i translokazni proteini, poput TOM40, koji je važan protein vanjske mitohondrijske membrane, i predstavlja „glavni ulaz“ za ulazak najvažnijih prekursorskih molekula u mitohondrije.

U radu Lisowskog i sur. (2018.) (74) zaključeno je da mitohondriji integriraju okolišne znakove i po njima formiraju stanične homeostatske odgovore. Mitohondriji s važnom ulogom u oblikovanju stanice kroz redoks ravnotežu, bioenergetiku i ravnotežu kalcija reguliraju puteve stanične smrti, koji su ključni za očuvanje funkcionalnosti potomstva. Takva istraživanja nas mogu navesti na razumijevanje patogenetskih mehanizama bolesti koji uključuju degradaciju mitohondrija.

## 6. ZAKLJUČAK

Na kraju ovog rada može se zaključiti:

- U pripremljenim eksperimentalnim podlogama s eluiranim metalnim ionima utvrđena je značajna količina otpuštenih metalnih iona. U svim podlogama prevladavaju ioni željeza. Osim iona željeza, u količinama većima od dozvoljenih, prisutni su i oni nikla, bakra, kroma i mangana. Količina otpuštenih iona proporcionalna je trajanju eluiranja (najveća je u uzorcima u kojima se ortodontski aparatić eluirao 14 dana).
- Rast kvasca *S. cerevisiae* na takvim eksperimentalnim podlogama s otpuštenim metalnim ionima je promijenjen, kako u broju stanica, tako i u načinu rasta.
- Utjecaj iona metala zabilježen je na proteinima mitohondrija, gdje se u tretiranim uzorcima primjećuje povećavanje kako ukupnog broja, tako i količine eksperimentalnih proteina, u usporedbi s kontrolnim uzorkom (rastao na podlozi bez eluiranih metalnih iona).
- Učinak na proteom mitohondrija proporcionalan je količini prisutnih metalnih iona u eksperimentalnim podlogama.

## 7. LITERATURA

1. Kavanagh K., Fungi: Biology and applications. West Sussex, England, John Wiley & Sons. [Internet]. 2005.: str. 3. [ažurirano: 20.9.2017., citirano: 23.4.2023.]. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/profile/Khaled-AbuElteen/publication/319613152\\_Antifungal\\_Agents\\_for\\_Use\\_in\\_Human\\_Therapy\\_Biology\\_and\\_Applications/links/59c2459a0f7e9b21a82a5295/Antifungal-Agents-for-Use-in-Human-Therapy-Biology-and-Applications.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Khaled-AbuElteen/publication/319613152_Antifungal_Agents_for_Use_in_Human_Therapy_Biology_and_Applications/links/59c2459a0f7e9b21a82a5295/Antifungal-Agents-for-Use-in-Human-Therapy-Biology-and-Applications.pdf)
2. Webster J., Weber R., Introduction to Fungi. 3rd edition. New York, Cambridge University Press. [Internet]. 2007. str. 2. [ažurirano: 5.3.2007., citirano: 23.4.2023.]. Dostupno na: <http://deskuervis.nic.in/pdf/WEBSTER30521807395.pdf>
3. Guilliermond A., The Yeasts. 1st edition. Norwood, USA, The Plimpton Press. [Internet]. 1920. str. 9-10 [citirano: 23.4.2023.]. Dostupno na: [https://www.forgottenbooks.com/en/download\\_pdf/The\\_Yeasts\\_1000843515.pdf](https://www.forgottenbooks.com/en/download_pdf/The_Yeasts_1000843515.pdf)
4. Walker GM. Yeasts, In Schaechter M, editor, Desk encyclopedia of microbiology. 2nd ed. London: Academic Press/Elsevier. [Internet]. 2009. p. 1174-1187. [ažurirano: 2009. citirano: 23.4.2023.]. Dostupno na: <https://rke.abertay.ac.uk/ws/portalfiles/portal/8488900/WalkerEncyclopedia2009-Yeasts.pdf>
5. Karimy M.F., Damayanti E., Suryani A.E, Prasetyo E., Nurhayati R., Anwar M., Anggraeni. A.S., A simple method for analysis of *Saccharomyces cerevisiae* morphology by applying a high vacuum mode of the scanning electron microscopy and without chemical fixatives. [Internet]. Research Division for Natural Product Technology, Indonesian Institute of Sciences (LIPI) Gunungkidul, Indonesia.. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 462, 012048. 2020. str.8. doi:10.1088/1755-1315/462/1/012048 [ažurirano: 23.7.2020., citirano: 23.4.2023.]. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/340741016\\_A\\_simple\\_method\\_for\\_analysis\\_of\\_Saccharomyces\\_cerevisiae\\_morphology\\_by\\_applying\\_a\\_high\\_vacuum\\_mode\\_of\\_the\\_scanning\\_electron\\_microscopy\\_and\\_without\\_chemical\\_fixatives](https://www.researchgate.net/publication/340741016_A_simple_method_for_analysis_of_Saccharomyces_cerevisiae_morphology_by_applying_a_high_vacuum_mode_of_the_scanning_electron_microscopy_and_without_chemical_fixatives)
6. Thpanorama. [Internet]. *Saccharomyces cerevisiae*: karakteristike, morfologija i životni ciklus. [citirano: 28.4.2023.]. Dostupno na: <https://hr.thpanorama.com/articles/biologa/saccharomyces-cerevisiae-charactersticasmorfologa-y-ciclo-de-vida.html>

7. B. Andričić, *Vježbe iz biotehnoških procesa (interna skripta)*, Kemijsko tehnološki fakultet, Split, 2006.
8. Olivares-Mari I. K., González-Hernández J. C., Regalado-Gonzalez, C., Madrigal-Perez L. A., Saccharomyces cerevisiae Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism. *Journal of Visualized Experiments*. [Internet]. 2018. doi:10.3791/58192 [ažurirano: 30.9.2018., citirano: 28.8.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30320748/>
9. Feldmann H., *Yeast: Molecular and Cell Biology*. 2nd edition., Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA. [Internet]. 2012. str. 5; 7-10; 14; 18; 22 [ažurirano: 12.7.2012. citirano: 23.4.2023.]. Dostupno na: [https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527332529\\_c02.pdf](https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527332529_c02.pdf)
10. Tofalo R., Suzzi G., *Yeasts*, *Encyclopedia of Food and Health*. [Internet]. Academic Press, 2016., str. 593., 9780123849533, doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00762-5. [ažurirano: 2016., citirano: 25.4.2023.] Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472007625>
11. Kehrein K., *Organization of mitochondrial gene expression in yeasts*. [Doctoral thesis], Biochemistry at Stockholm, University, Sweden [Internet]. 2014. str. 13. [ažurirano: 2014., citirano: 25.4.2023.]. Dostupno na: <http://diva-portal.org/smash/get/diva2:748903/FULLTEXT01.pdf>
12. Broach J. R., *Nutritional Control of Growth and Development in Yeast*. [Internet]. *Genetics*, 2012. 192(1), 73–105. doi:10.1534/genetics.111.135731. [ažurirano: 6.4.2012., citirano: 28.8.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22964838/>
13. Kamp R.M., Kyriakidis D., Choli-Papadopoulou Th., *Proteome and Protein Analysis*. [Internet]. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2000, str. 3-8. [ažurirano: 1.2020., citirano: 2.5.2023.]. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/321561191\\_Proteome\\_and\\_Protein\\_Analysis](https://www.researchgate.net/publication/321561191_Proteome_and_Protein_Analysis)
14. Berkelman T, Stenstedt T, *2-D Electrohoresis, Principles and Methods*. [Internet]. Amersham Biosciences. Str. 7-73. [citirano: 3.5.2023.]. Dostupno na: [https://www.bu.edu/picf/files/2010/10/2D-Principles-2nd\\_edition.pdf](https://www.bu.edu/picf/files/2010/10/2D-Principles-2nd_edition.pdf)
15. Creative Proteomics Blog. *TWO DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS (2-DE)*. . [ažurirano: 13.3.2018., citirano: 3.5.2023.]. Dostupno na: <https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/two-dimensional-gel-electrophoresis-2-de/>

16. Krsnik-Rasol M., Balen B., Maček B., Pavoković D., Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. [Internet]. Skripta za internu uporabu. PMF, Biološki odsjek. 2004./2005. str. 2-3;16. [citirano: 19.8.2023.]. Dostupno na: <https://molekularna.biol.pmf.unizg.hr/kolegiji/MIPSKRIPTA2005.pdf>
17. SDS Page Gel Electrophoresis. [Internet]. [ažurirano: 1.5.2001., citirano: 3.5.2023.]. Dostupno na: [https://williams.chemistry.gatech.edu/course\\_Information/4581/techniques/gel\\_elect/page\\_protein.html](https://williams.chemistry.gatech.edu/course_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html)
18. Genchi G., Carocci A., Lauria G., Sinicropi M. S., Catalano A., Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. [Internet]. International journal of environmental research and public health, 2020. 17(3), 679. doi:10.3390/ijerph17030679. [ažurirano: 21.1.2020., citirano: 20.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7037090/>
19. Xometry. [Internet]. Nickel Alloys: Definition, Composition, Types, Properties, and Applications. . [ažurirano: 6.5.2023., citirano: 20.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.xometry.com/resources/materials/what-is-nickel-alloy/>
20. Begum W., Rai S., Banerjee S., Bhattacharjee S., Mondal M. H., Bhattarai A., Saha, B. A comprehensive review on the sources, essentiality and toxicological profile of nickel. [Internet]. RSC advances, 2022. 12(15), 9139–9153. doi:10.1039/d2ra00378c. [ažurirano: 23.3.2022., citirano: 20.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8985085/>
21. Gates A., Jakubowski J.A., Regina A.C., Nickel Toxicology. [Internet]. In: StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls. 2023. [ažurirano: 20.5.2023., citirano: 20.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK592400/>
22. NICKLE ALLERGY IN ORTHODONTICS. BRITISH ORTHODONTIC SOCIETY. ADVICE SHEET. [Internet]. [ažurirano: 2019., citirano: 23.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.bos.org.uk/wp-content/uploads/2022/09/nickelallergyinorthodontics.pdf>
23. Pocket Dentistry. [Internet]. Material-related Adverse Reactions in Orthodontics. [ažurirano: 2.1.2015., citirano: 23.8.2023.]. Dostupno na: <https://pocketdentistry.com/10-material-related-adverse-reactions-in-orthodontics/>
24. Pechova A., Pavlata L., Chromium as an essential nutrient: a review. [Internet]. Veterinarni Medicina, 52. Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic. 2007., 1-18. doi:10.17221/2010-

- VETMED. [ažurirano: 2007., citirano: 25.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.agriculturejournals.cz/pdfs/vet/2007/01/01.pdf>
25. HealthScreenUK. [Internet]. The Ongoing Importance of Chromium (Chrome) Monitoring. [ažurirano: 26.10.2021., citirano: 25.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.healthscreenuk.co.uk/the-ongoing-importance-of-chromium-chrome-monitoring/>
26. Sueker J. K., Chromium. [Internet]. Environmental Forensics, 81–95. 1964. str. 81-95. doi:10.1016/b978-012507751-4/50027-6. [citirano: 25.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780125077514500276>
27. Mirhashemi A., Jahangiri S., Kharrazifard M., Release of nickel and chromium ions from orthodontic wires following the use of teeth whitening mouthwashes. [Internet]. Progress in Orthodontics, 2018., 19(1). doi:10.1186/s40510-018-0203-7 [ažurirano: 5.2.2018., citirano: 5.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5797726/>
28. Park H. Y., Shearer T. R., In vitro release of nickel and chromium from simulated orthodontic appliances. [Internet]. American Journal of Orthodontics, 1983., 84(2), 156–159. doi:10.1016/0002-9416(83)90180-x. [citirano: 26.8.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6576640/>
29. Mo-Molybdenum. [Internet]. [citirano: 27.8.2023.]. Dostupno na: <http://weppi.gtk.fi/publ/foregsatlas/text/Mo.pdf>
30. Molybdenum. Essential Elements. The Fertilizer Institute. [Internet]. [citirano: 27.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.tfi.org/sites/default/files/tfi-molybdenum.pdf>
31. Molybdenum in Drinking-water. [Internet]. WHO. /SDE/WSH/03.04/11/Rev/1. 2011. [citirano: 27.8.2023.]. Dostupno na: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/molybdenum.pdf?sfvrsn=d01920eb\\_4](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/molybdenum.pdf?sfvrsn=d01920eb_4)
32. Vyskočil A., Viau, C., Assessment of molybdenum toxicity in humans. [Internet]. Journal of Applied Toxicology, Département de médecine du travail et d'hygiène du milieu, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada, 19(3), 1999. 185–192. doi:10.1002/(sici)1099-1263(199905/06)19:3<185::aid-jat555>3.0.co;2-z. [ažurirano: 23.4.1999., citirano: 27.8.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10362269/>
33. Titanium. [Internet]. Periodic Table. [citirano: 19.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.rsc.org/periodic-table/element/22/titanium>



34. Woodruff L., and Bedinger G., Titanium—Light, strong, and white. [Internet]. U.S. Geological Survey Fact Sheet 2013. 3059. [ažurirano: 10.10.2013., citirano: 19.8.2023.]. Dostupno na: <https://pubs.usgs.gov/fs/2013/3059/>
35. El Khalloufi M., Drevelle O., Soucy G., Titanium: An Overview of Resources and Production Methods. [Internet]. Minerals. 11, 1425. 2011. doi:10.3390/min11121425. [ažurirano: 16.12.2021., citirano: 22.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2075-163X/11/12/1425>
36. Bharathi S., Naveneethan, Titanium brackets used in dentistry. Saveetha Institute of Medical and Technical Sciences, Chennai, India. 2020. 2455-2631. [ažurirano 2.2020., citirano 12.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.ijedr.org/papers/IJEDR2002005.pdf>
37. Motyka M., Kubiak K., Sieniawsk J., Ziaja W., Phase Transformations and Characterization of  $\alpha + \beta$  Titanium Alloys. [Internet]. Comprehensive Materials Processing, 2014., 7–36. doi:10.1016/b978-0-08-096532-1.00202-8. [ažurirano: 5.2014., citirano: 22.8.2023.]. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/264547273\\_Phase\\_Transformations\\_and\\_Characterization\\_of\\_a\\_b\\_Titanium\\_Alloys](https://www.researchgate.net/publication/264547273_Phase_Transformations_and_Characterization_of_a_b_Titanium_Alloys)
38. Madhavan S., Venugopal V., Johny J., Toxicity of titanium in dental implants- Implications on patient health and clinical practice. [Internet]. The Journal of Dental Research. 2023.;5(1):21-2 doi:10.18231/j.jdp.2023.005 [ažurirano: 8.4.2023., citirano: 27.8.2023.]. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/370047844\\_Toxicity\\_of\\_titanium\\_in\\_dental\\_implants- Implications\\_on\\_patient\\_health\\_and\\_clinical\\_practice](https://www.researchgate.net/publication/370047844_Toxicity_of_titanium_in_dental_implants- Implications_on_patient_health_and_clinical_practice)
39. Dežulović L, Čanadi Jurešić G. Potencijalna toksičnost titanija. [Internet]. Medicina Fluminensis. 2021. 57(4):341-355. doi:10.21860/medflum2021\_264888 [ažurirano: 2021., citirano: 12.9.2023.]. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/264888>
40. Prestat M, Thierry D. Corrosion of titanium under simulated inflammation conditions: clinical context and in vitro investigations. [Internet]. Acta Biomater. 2021. 136:72-87. doi:10.1016/j.actbio.2021.10.002. [ažurirano: 7.10.2021., citirano: 3.9.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34626820/>
41. Berglund F., Carlmark B., Titanium, Sinusitis, and the Yellow Nail Syndrome. [Internet]. Biological Trace Element Research, 143(1), 2010., 1–7. doi:10.1007/s12011-010-8828-5. [ažurirano: 1.9.2010., citirano: 3.9.2023.]. Dostupno na: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3176400/pdf/12011\\_2010\\_Article\\_8828.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3176400/pdf/12011_2010_Article_8828.pdf)

42. Zigante M., Peternel S., Muhvic Urek M., Rincic Mlinaric M., Pop AcevD., Spalj S., Smell and taste in titanium and nickel allergic sensitization in orthodontic patients. [Internet]. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 2020. 23(4), 517–522. doi:10.1111/ocr.12379. [ažurirano: 10.4.2020., citirano: 27.8.2023.]. Dostupno na:
43. Iron. Periodic Table. [Internet]. [citirano: 27.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.rsc.org/periodic-table/element/26/iron>
44. The toxicity of iron, an essential element. [Internet]. *Toxicology Brief. Veterinary Medicine*, Illinois. 2006. [citirano: 27.8.2023.]. Dostupno na: [https://www.aspcapro.org/sites/default/files/zn-vetm0206\\_082-090\\_0.pdf](https://www.aspcapro.org/sites/default/files/zn-vetm0206_082-090_0.pdf)
45. Yuen H. W., Becker W., Iron Toxicity. [Internet]. StatPearls Treasure Island (FL). 2023. [ažurirano 26.6.2023., citirano 27.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459224/>
46. Castro S. M., Ponces M. J., Lopes J. D., Vasconcelos M., Pollmann M. C. F., Orthodontic wires and its corrosion—The specific case of stainless steel and beta-titanium. [Internet]. *Journal of Dental Sciences*, 10(1), 2015., 1–7. doi:10.1016/j.jds.2014.07.002. [ažurirano 12.7.2014., citirano 27.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1991790214000816>
47. Arango S., Peláez-Vargas A., García, C., Coating and Surface Treatments on Orthodontic Metallic Materials. [Internet]. *Coatings*. 3, 2013. 1-15. doi:10.3390/coatings3010001. [ažurirano 27.12.2012., citirano 27.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2079-6412/3/1/1>
48. 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? [Internet]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. 21(21), 7993. doi:10.3390/ijms21217993. [ažurirano 27.10.2020., citirano 27.8.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33121155/>
49. MOJA MEDICINA. [Internet]. Fiksni ortodontski aparat. . [ažurirano 15.3.2021., citirano 27.8.2023.]. Dostupno na: <https://mojamedicina.com/fiksni-ortodontski-aparat/>
50. Poljak-Guberina R., Knezović-Zlatarić D., Katunarić M., Zavod za stomatološku protetiku. [Internet]. *Stomatološki fakultet*. 2002. 441-445. [ažurirano 30.1.2002., citirano 27.8.2023.]. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/file/15910>
51. Mystkowska J., Niemirowicz-Laskowska K., Łysik D., Tokajuk G., Dąbrowski J., Bucki R., The Role of Oral Cavity Biofilm on Metallic Biomaterial Surface Destruction—Corrosion and Friction Aspects. [Internet]. *International Journal of Molecular Sciences*,

- 2018., 19(3), 743. doi:10.3390/ijms19030743. [ažurirano 30.3.2018, citirano 4.9.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29509686/>
52. Panov V., Markova M., Corrosion potential in oral cavity. [Internet]. Department of Conservative Dentistry and Oral pathology, Faculty of Dental Medicine, Medical University of Varna; 2018. doi: 0.18044/Medinform.201742.750 [ažurirano 5.2018, citirano 3.9.2023.]. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/328259621\\_Corrosion\\_potential\\_in\\_oral\\_cavity](https://www.researchgate.net/publication/328259621_Corrosion_potential_in_oral_cavity)
53. Procházková J., Podzimek S., Tomka M., Metal alloys in the oral cavity as a cause of oral discomfort in sensitive patients. [Internet]. Neuro Endocrinol Lett. 2006; 27, 1:53-58. [ažurirano 28.10.2007., citirano 4.9.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16804514/>
54. Farrugia G., Balzan R., Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast. [Internet]. Frontiers in Oncology, 2. 2012. doi:10.3389/fonc.2012.00064. [ažurirano 21.6.2012., citirano 2.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2012.00064/full>
55. Dzibula T., Butterfield D.A., OXIDATIVE STRESS AND BIOMATERIALS. [Internet]. Elsevier Inc., UK. 2016. str. 37-40; 70-73. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/317165248\\_Oxidative\\_Stress\\_and\\_Biomaterials](https://www.researchgate.net/publication/317165248_Oxidative_Stress_and_Biomaterials)
56. Ayers M. C., Sherman Z. N., Gallagher J. E. G., Oxidative Stress Responses and Nutrient Starvation in MCHM Treated *Saccharomyces cerevisiae*. [Internet]. Genes|Genomes|Genetics, 2020. G3&#58. g3.401661.2020. doi:10.1534/g3.120.401661. [ažurirano 12.2020., citirano 4.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7718757/>
57. Strain: W303. [Internet]. *Saccharomyces* GENOME DATABASE. [citirano: 25.7.2023.]. Dostupno na: [https://www.yeastgenome.org/strain/w303#genome\\_sequence](https://www.yeastgenome.org/strain/w303#genome_sequence)
58. Ruta L. L., Kissen R., Nicolau I., Neagoe A. D., Petresc A. J., Bones A. M., Farcasanu I. C., Heavy metal accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* cells armed with metal binding hexapeptides targeted to the inner face of the plasma membrane. [Internet]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017., 101(14), 5749–5763. doi:10.1007/s00253-017-8335-0. [ažurirano 6.5.2017., citirano 17.5.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28577027/>

59. Fukuda N., Apparent diameter and cell density of yeast strains with different ploidy. [Internet]. Sci Rep. 13(1):1513.2013. doi:10.1038/s41598-023-28800-z. . [ažurirano 27.1.2023., citirano 17.5.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36707648/>
60. IMPLLEN. [Internet]. OD600 (Cell Density, Bacterial Growth, Yeast Growth). [citirano 17.5.2023.]. Dostupno na: <https://www.implen.de/od600-diluphotometer/od600/>
61. Logos Biosystems. LUNA-FL™ Automated Fluorescence Cell Counter User Manual. [Internet]. [citirano: 25.5.2023.]. Dostupno na: [https://www.biocat.com/logos/manuals/LUNA-FL\\_User\\_Manual\\_VL1712-01.pdf](https://www.biocat.com/logos/manuals/LUNA-FL_User_Manual_VL1712-01.pdf)
62. Westburg LIFE SCIENCES. Acridine Orange (AO) & Propidium Iodide (PI) Cell Viability Kits. [Internet]. [citirano: 30.5.2023.]. Dostupno na: <https://www.westburg.eu/products/cell-biology/cell-counting/acridine-orange-propidium-iodide-cell-viability>
63. AssayGenie. Yeasts Mitochondria Isolation Kit. [Internet]. [citirano: 1.6.2023.]. Dostupno na: <https://www.assaygenie.com/content/BN%20Technical%20Manuals/BN00527.pdf>
64. BIO-RAD. Bradford Protein Assay. [Internet]. [citirano: 15.6.2023.]. Dostupno na: <https://www.bio-rad.com/en-hr/feature/bradford-protein-assay.html>
65. Thomas R., Practical Guide to ICP-MS. [Internet]. New York, Marcel Dekker. 2004. str. 1-5. [citirano: 20.6.2023.]. Dostupno na: [file:///C:/Users/Downloads/Practical%20guide%20to%20ICP-MS%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Downloads/Practical%20guide%20to%20ICP-MS%20(1).pdf)
66. Kashani A., Mostaghimi J., Aerosol characterization of concentric pneumatic nebulizer used in inductively coupled plasma-mass spectrometry(ICP-MS). [Internet]. Department of Mechanical and Industrial Engineering, University of Toronto, Toronto, Ontario, M5S 3G8, Canada. 2010. str.2. doi: 10.1615/AtomizSpr.v20.i5.40. [ažurirano 1.2010., citirano 20.6.2023.]. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/255785750\\_Aerosol\\_characterization\\_of\\_concentric\\_pneumatic\\_nebulizer\\_used\\_in\\_inductively\\_coupled\\_plasma-mass\\_spectrometryICP-MS](https://www.researchgate.net/publication/255785750_Aerosol_characterization_of_concentric_pneumatic_nebulizer_used_in_inductively_coupled_plasma-mass_spectrometryICP-MS)
67. ThermoFischer. [Internet]. SCIENTIFIC. CHAPS Detergent (3-((--cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate). [citirano: 20.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/28299>
68. Čanadi Jurešić G., Ćurko-Cofek B., Barbarić M., Mumiši N., Blagović B., Jamnik P. Response of *Saccharomyces cerevisiae* W303 to Iron and Lead Toxicity in Overloaded

- Conditions. [Internet]. *Current Microbiology*, 2021., 78(4), 1188–1201. doi:10.1007/s00284-021-02390-3. [ažurirano 23.2.2021., citirano 29.8.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33624192/>
69. Jan A.T., Azam M., Siddiqui K., Ali A., Choi I., Haq Q.M.R., Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. [Internet]. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 29592-29630. doi:10.3390/ijms161226183. [ažurirano 10.12.2015., citirano 5.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/12/26183>
70. Wysocki R., Tamás M. J., How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. [Internet]. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 925–951. 2010. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00217.x . [ažurirano 27.12.2012., citirano 27.8.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20374295/>
71. Avery S.V. Molecular targets of oxidative stress. [Internet]. *Biochem J.* 2011;434(2):201-210. doi:10.1042/BJ20101695. [ažurirano 1.3.2011., citirano 30.8.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21309749/>
72. Winge. R., Jensen L. T., Srinivasan C., Metal-ion regulation of gene expression in yeast. [Internet]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2(2), 1998. 216–221. doi:10.1016/s1367-5931(98)80063-x. [ažurirano 4.1998., citirano 14.9.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9667925/>
73. Farcasanu I.C., Ruta L.L., Metallothioneins, *Saccharomyces cerevisiae*, and Heavy Metals: A Biotechnology Triad? [Internet]. *Old Yeasts - New Questions*. InTech. 2017. doi:10.5772/intechopen.70340. [ažurirano 13.12.2017., citirano 31.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/chapters/56597>
74. Lisowski P., Kannan P., Mlody B., Prigione A., Mitochondria and the dynamic control of stem cell homeostasis. [Internet]. *EMBO Reports*, 2018. 19(5), e45432. doi:10.15252/embr.20174543. [ažurirano 16.4.2018., citirano 31.8.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29661859/>
75. Song J., Herrmann J. M., Becker T., Quality control of the mitochondrial proteome. [Internet]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020. 22, 54–70. doi:10.1038/s41580-020-00300-2. [ažurirano 22.10.2020., citirano 31.8.2023.]. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41580-020-00300-2>
76. Durgo K., Orešić S., Rinčić Mlinarić M., Fiket Ž., Jurešić G.Č., Toxicity of Metal Ions Released from a Fixed Orthodontic Appliance to Gastrointestinal Tract Cell Lines. [Internet]. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 9940. doi:10.3390/ijms24129940.

- [ažurirano 9.7.2023., citirano 12.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/12/9940>
77. Mikulewicz M., Chojnacka K., Woźniak B., Downarowicz P., Release of metal ions from orthodontic appliances: an in vitro study. [Internet]. Biol Trace Elem Res. 2012. 146(2):272-280. doi:10.1007/s12011-011-9233-4. [ažurirano 20.10.2020., citirano 12.9.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22011837/>
78. DIREKTIVA (EU) 2020/2184 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 16. prosinca 2020. o kvaliteti vode namijenjene za ljudsku potrošnju (preinaka). [Internet]. [ažurirano 23.12.2020., citirano 12.9.2023.]. Dostupno na: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020L2184&qid=1694512198552>
79. Petković Didović M., Jelovica Badovinac I., Fiket Ž.; Žigon J., Rinčić Mlinarić M., Čanadi Jurešić G., Cytotoxicity of Metal Ions Released from NiTi and Stainless Steel Orthodontic Appliances, Part 1: Surface Morphology and Ion Release Variations. [Internet]. Materials. 2023, 16, 4156. doi:10.3390/ma16114156. [ažurirano 2.7.2023., citirano 12.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/1996-1944/16/11/4156>
80. Liu S., How Cells Grow. [Internet]. Bioprocess Engineering, 2017. 629–697. doi:10.1016/b978-0-444-63783-3.00011-3 [ažurirano 1.2017., citirano 12.9.2023.]. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/311996071\\_How\\_Cells\\_Grow](https://www.researchgate.net/publication/311996071_How_Cells_Grow)
81. Eide D. J., THE MOLECULAR BIOLOGY OF METAL ION TRANSPORT IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE. [Internet]. Annual Review of Nutrition, 1998. 18(1), 441–469. doi:10.1146/annurev.nutr.18.1.441 . [ažurirano 7.1998., citirano 12.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.nutr.18.1.441>
82. Pearce D.A., Sherman F., Toxicity of copper, cobalt, and nickel salts is dependent on histidine metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. [Internet]. J Bacteriol. 1999. 181(16):4774-4779. doi:10.1128/JB.181.16.4774-4779.1999. [ažurirano 8.1999., citirano 14.9.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10438744/>
83. Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M. C., Cherry, J. M., The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now. [Internet]. Genes|Genomes|Genetics, 2013. 4(3), 389–398. doi:10.1534/g3.113.008995. [ažurirano 27.12.2013., citirano 14.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3962479/>

84. Ishikawa J., Maeshima A., Mellinger, A., Durand A., Bourbon M. L., Higo D., Colyer C. L., Shibukawa M., Ouchane S., Saito S. Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Metalloprotein Analysis Based on Differential Chemical Structure Recognition. [Internet]. CBB Dye. Scientific reports, 2019. 9(1), 10566. doi:10.1038/s41598-019-46955-6. [ažurirano 22.7.2019, citirano 14.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6646366/>
85. Shenton D., Smirnova J.B., Selley J.N., Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. [Internet]. J Biol Chem. 2006;281(39):29011-29021. doi:10.1074/jbc.M601545200. [ažurirano 29.7.2006., citirano 14.9.2023.]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16849329/>
86. Temple M. D., Perrone G. G., Dawes I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. Trends in Cell Biology, 2005. 15(6), 319–326. doi:10.1016/j.tcb.2005.04.003. [ažurirano 29.7.2005., citirano 14.9.2023.]. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/7788363\\_Temple\\_MD\\_Perrone\\_GG\\_Dawes\\_IW\\_Complex\\_cellular\\_responses\\_to\\_reactive\\_oxygen\\_species\\_Trends\\_Cell\\_Biol\\_15\\_319-326](https://www.researchgate.net/publication/7788363_Temple_MD_Perrone_GG_Dawes_IW_Complex_cellular_responses_to_reactive_oxygen_species_Trends_Cell_Biol_15_319-326)

## 8. ŽIVOTOPIS

### OSOBNE INFORMACIJE

- Ime i prezime: Irinea Pedisic
- Datum rođenja: 19.11.1998. (Zadar)
- Adresa: Kralja Petra Svačića 20c, 23210 Biograd na Moru
- e-mail: pedisici@hotmail.com

### RADNO ISKUSTVO

- lipanj 2016. - kolovoz 2016. – booking rezervacije u agenciji Agena Marin, Sveti Filip i Jakov
- lipanj 2017.- rujan 2017. – konobar u Autocamp Filko, Sveti Petar na Moru
- svibanj 2018. - rujan 2018. – konobar u Fast Food Luiggi, Biograd na Moru
- srpanj 2019. – rujan 2019. – konobar u Hotelu Maestral, Dubrovnik
- srpanj 2020. – rujan 2020. – konobar u Hotelu Maestral, Dubrovnik
- srpanj 2021. - rujan 2021. – šanker u Caffè Bar Obala, Biograd na Moru
- srpanj 2022. - rujan 2022. – konobar u Taproom Jaz, Biograd na Moru
- svibanj 2023. - rujan 2023. – konobar u Coffee bar Tonči, Biograd na moru

### OBRAZOVANJE

- rujan 2013.- svibnja 2017. – Prirodoslovno grafička škola Zadar, kemijski tehničar
- rujan 2018. - rujan 2021. – Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci – preddiplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo
- listopad 2021. – do danas - Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci – sveučilišni diplomski studij Sanitarno inženjerstvo

### STUDENTSKE AKTIVNOSTI

- 3. Studentski kongres zaštite zdravlja – Sanitas 2020. – Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka
- 4. Studentski kongres zaštite zdravlja – Sanitas 2021. – Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka
- 5. Studentski kongres zaštite zdravlja – Sanitas 2022. – Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka
- Sudionica u projektu "Nevidljivi život" - 2022.-2023. - Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka