

SINERGISTIČKI UČINAK METALNIH IONA ELUIRANIH IZ ORTODONTSKIH NAPRAVA NA PROTEOM MITOHONDRIJA KVASCA

Radolović, Simone

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:184:895034>

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
SANITARNO INŽENJERSTVO

Simone Radolović

SINERGISTIČKI UČINAK METALNIH IONA ELUIRANIH IZ
ORTODONTSKIH NAPRAVA NA PROTEOM MITOHONDRIJA KVASCA

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNO INŽENJERSTVO

Simone Radolović

SINERGISTIČKI UČINAK METALNIH IONA ELUIRANIH IZ
ORTODONTSKIH NAPRAVA NA PROTEOM MITOHONDRIJA KVASCA

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

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

Diplomski rad obranjen je dana 12. srpnja 2024. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Božena Čurko-Cofek, dr. med.
2. prof. dr. sc. Dalibor Broznić, dipl. sanit. ing.
3. prof. dr. sc. Gordana Čanadi Jurešić, dipl. ing.

Rad ima 64 stranice, 21 sliku, 5 tablica i 48 literaturnih navoda.

Zahvala

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Gordani Čanadi Jurešić dipl. ing. na pruženom znanju i podršci, na predanosti te izdvojenom vremenu i trudu. Cijenim to što je uvijek bila dostupna i pristupačna te pružala mi pomoć kad god je trebalo.

Najveće hvala mojoj obitelji, mojim roditeljima, sestri i dečku koji su mi na ovom putu bili najveća podrška. Veliku zahvalu dugujem i svojoj baki Ani koja me uvijek savjetuje te je uvijek uz mene. Hvala mojim najbližim prijateljicama koje su me uvijek bodrile i gurale naprijed.

Rad je izrađen uz financijsku potporu Sveučilišta u Rijeci, projekti iskusnih znanstvenika: Utvrdivanje štetnih učinaka metalnih iona eluiranih iz ortodontskih materijala.

Sažetak

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* kao modelni organizam često se koristi u nizu temeljnih bioloških istraživanja, prvenstveno zbog jednostavne manipulacije. U ovom je istraživanju korišten soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 u svrhu proučavanja toksičnosti metalnih iona koji su dobiveni eluiranjem dijelova ortodontske naprave u hranjivu podlogu kao medij. Upotrijebljena je cijela ortodontska naprava koju sačinjavaju dva žičana luka, dvadeset bravica, četiri prstena te dvadeset ligatura, a vrijeme eluiranja bilo je 14 dana. Broj poraslih stanica mjerio se pomoću LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter uređaja, gdje se osim vitalnosti, može pratiti i način rasta stanica. Vijabilnost kvasca određena je AO/PI bojom. U eluatima, ispitan je sadržaj i sastav metalnih iona metodom masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom. Izolacija mitohondrija, a naposljetku proteina iz mitohondrija korak je koji slijedi nakon uzgoja kvasca na podlogama s eluiranim metalnim ionima. Dobiveni proteini ispitivani su te identificirani vezanim sustavom spektrometra masa visoke rezolucije sa tekućinskom kromatografijom. Metalni ioni koji prevladavaju u podlozi jesu ioni željeza, nikla, bakra, kroma, aluminijska te u manjim količinama kobalta, mangana, molibdena te titanija. Ovim istraživanjem analizirano je ukupno 284 proteina, od kojih je 199 proteina pokazalo povećanu ekspresiju u odnosu na netretirani uzorak, dok su 4 proteina pokazala smanjenu ekspresiju. Identificiran je 31 protein koji je eksprimiran samo u tretmanu od 14 dana, dok je 50 proteina koji su eksprimirani samo u kontroli. U ovom radu nismo uspjeli povezati dobivene rezultate proteina promijenjenog izričaja s količinom i vrstama eluiranih metalnih iona u podlogu na kojoj je kvasac uzgajan.

Ključne riječi: *Saccharomyces cerevisiae* W303, ortodontske naprave, metalni ioni, mitohondriji, proteom

Summary

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is frequently used as a model organism in a range of basic biological research, mainly because it is easy to manipulate. In this study, the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* W303 was used to investigate the toxicity of metal ions obtained by elution of parts of the orthodontic appliance into the culture medium. The entire orthodontic appliance was used, consisting of two wire arches, twenty brackets, four bands and twenty ligatures, and the elution time was 14 days. The number of proliferated cells was measured using the LUNA-FLTM dual fluorescence cell counter, which can be used to monitor the type of cell growth in addition to viability. The vitality of the yeast was determined using AO/PI staining. The content and composition of the metal ions in the eluates was analysed using mass spectrometry with inductively coupled plasma. The isolation of the mitochondria and finally the proteins from the mitochondria is the next step after the growth of the yeast on substrates with eluted metal ions. The proteins obtained were analysed and identified using a high-resolution mass spectrometer in conjunction with liquid chromatography. The predominant metal ions in the substrate are iron, nickel, copper, chromium, aluminium and, in smaller quantities, cobalt, manganese, molybdenum and titanium. A total of 284 proteins were identified in this study, of which 199 proteins showed increased expression compared to the untreated sample, while 4 proteins showed decreased expression. 31 proteins were identified that were only expressed in the eluate of the 14-day treatment, while 50 proteins were only expressed in the control sample. In this work, the results of the metal ions eluted into the yeast medium could not be correlated with the identified and modified mitochondrial proteins isolated after treatment with such a medium.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae* W303, orthodontic appliances, metal ions, mitochondria, proteome

Sadržaj

1. Uvod.....	8
1.1. Ortodonticija	8
1.2. Ortodontske naprave.....	11
1.3. Metalni ioni i njihov učinak.....	12
1.3.1. Nikal.....	12
1.3.1.1. Toksičnost nikla.....	13
1.3.1.2. Legure nikla.....	14
1.3.2. Željezo.....	15
1.3.3. Titanij	16
1.3.4. Krom	18
1.4. Kvasac kao organizam.....	20
1.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
1.6. Mitohondrij kvasca	24
1.7. Proteom mitohondrija	25
2. Cilj istraživanja	26
3. Materijali i metode	27
3.1. Materijali	27
3.1.1. Radni mikroorganizam	27
3.1.2. Uređaji, laboratorijski pribor, kemikalije	27
3.2. Metode	28
3.2.1. Priprema hranjive podloge.....	28
3.2.2. Priprema ortodontskih materijala za pripremu iscrpina	28
3.2.3. Uzgoj kvasca.....	28
3.2.4. Određivanje vitalnosti kvasca.....	28
3.2.4.1. Brojanje stanica na LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter.....	28
3.2.4.2. Bojanje kvasca fluorescentnom bojom	30

3.2.4.2.1 AO/PI	30
3.2.4.2.2. Priprema trajnog preparata obojanog kvasca.....	31
3.2.5. Izolacija mitohondrija.....	32
3.2.6. Izolacija proteina i određivanje količine proteina u mitohondrijskoj frakciji	33
3.2.7. Analiza i identifikacija proteina mitohondrija LC/MS metodom.....	33
3.2.8. Utvrđivanje interakcija među proteinima pomoću baze String	35
3.2.9. ICP-MS.....	36
4. Rezultati	37
4.1. Određivanje vitalnosti kvasca Luna brojačem stanica	37
4.2. Određivanje vitalnosti AO/PI bojanjem	40
4.3. Proteini mitohondrija.....	42
4.4. ICP-MS analiza iscrpina metalnih iona u YPD podlogu.....	50
5. Rasprava	51
6. Zaključak.....	56
7. Literatura	57
7.1. Popis slika.....	62
8. Životopis.....	64

1. Uvod

1.1. Ortodoncija

Ortodoncija je specijalistička disciplina dentalne medicine čiji naziv potiče od grčkih riječi *orthos* što znači pravilan i *odous* što znači zub. Ispravljanje položaja zubiju mehaničkom terapijom glavni je cilj ortodontske terapije. Ona je često nazivana i dentofacijalnom ortopedijom, upravo zbog toga što ortodont jednim dijelom može utjecati na položaj i odnos kostiju donje trećine lica. (1)

Čimbenici koji utječu na određivanje idealne pozicije zuba za svakog pojedinca su profil samog lica, ravnoteža lica te estetski problemi. Kako bi se postigla idealna pozicija zuba nastoji se poboljšati odnos između zuba gornje i donje čeljusti. Okluzija je naziv za biološku i funkcionalnu koordinaciju zuba, a tijekom godina postigao se dogovor o tome što se smatra idealnom, odnosno normalnom okluzijom. Morfološkim razlikama u oblicima i veličini zubiju te sagitalnim položajima maksile i mandibule stvara se mnoštvo okluzija koje svaki pojedinac može prikazati. (2)

Ortodoncija ima širok raspon primjene što uključuje dijagnostiku malokluzija, sprječavanje njihova nastanka, dizajniranje naprava za korekciju malokluzija te proučavanje njihova biološkog i biomehaničkog učinka. Individualni sklad okluzije, orofacijalne funkcije, estetike osmijeha i lica te psihosocijalna kvaliteta života pacijenata cilj je kojega se teži postići u ortodontskoj terapiji. (1)

Dentalna malokluzija nije stanje opasno po život. (3) To nije bolest već niz prirodnih dentofacijalnih varijacija (Slika 1.), koje u većoj ili manjoj mjeri utječu na oralno zdravlje i kvalitetu života ljudi. Skoro da i ne postoji osoba sa idealno postavljenim zubima u zubnim lukovima te ona sa idealnom okluzijom i artikulacijom. (1) Malokluzija može uzrokovati probleme s govorom, poteškoće s jelom, promjene u strukturi lica te griženje jezika i obraza. Naime, samo je 8% slučajeva malokluzije s poznatim uzrokom, dok je preostalih 92% nepoznate etiologije gdje veliku ulogu imaju okolišni, ali i neizostavni genetski čimbenici. Naslijeđene karakteristike poput nesrazmjera između veličine zuba i čeljusti mogu uzrokovati gužvu ili razmak, disproporcija u veličini ili obliku maksile i mandibule također mogu uzrokovati nepravilnu okluziju. Okolišni čimbenici također imaju ulogu u nastanku malokluzije što je najčešće vidljivo kod djece koja sišu palčeve. Pritišćući nepce palcem, donji sjekutići i maksilarni kutnjaci se guraju lingvalno, a gornji sjekutići labijalno. Nadalje, čeljust je

postavljena prema dolje, što omogućuje izbijanje stražnjih zuba, što rezultira odvajanjem sjekutića. (2)

Prisutnost same malokluzije ne podrazumijeva potrebu za ortodontskom terapijom. Ortodont izrađuje individualni plan terapije za svakog pacijenta, a to ovisi ponajviše o stupnju malokluzije, narušenoj funkciji, estetici ali i psihosocijalnoj kvaliteti života. (1)



Slika 1. Oblici malokluzija (1)

Normokluzija ili eugnatija karakteriziraju normalno stanje okluzije i normalan odnos čeljusti, dok malokluzija i disgnatija karakteriziraju odstupanje od normalne. Malokluzije su oduvijek prisutne, no ipak se njihov broj povećava ponajviše zbog promijenjenog načina prehrane što posljedično uzrokuje smanjenje veličine čeljusti i broja zubi u čovjeka. Evolucijom se brže smanjuje veličina čeljusti nego broj zubi zbog toga što se zub kao razvijeno tkivo teže mijenja od čeljusti što posljedično dovodi do dentoalveolarnog nesrazmjera i zbijenosti zubi. Ispravljanje narušenih funkcija poput mastikacije, gutanja, govora i disanja, prevencija karijesa, trauma, parodontalnih bolesti, postizanje estetike osmijeha i lica razlozi su korekcije malokluzija. (1) Malokluzija prikazuje jedan kraj spektra normalnih varijacija te se zapravo nikakvo liječenje ne bi trebalo započinjati osim ako je očigledna korist za pacijenta izvediva. Također, potencijalne prednosti treba usporediti s mogućim rizicima i nuspojavama, te mogućnošću nepostizanja samih ciljeva liječenja. (4)

Kao i svaka druga grana medicine ili stomatologije, ortodontsko liječenje ima niz potencijalnih rizika. Primjerice, kao posljedica redoslijeda pomicanja zubi neizbježna je određena resorpcija korijena. Tijekom dvogodišnjeg tretmana fiksnim aparatićem u prosjeku će se izgubiti oko 1 mm duljine korijena. Važno je naglasiti da ova srednja vrijednost pokriva širok raspon individualnih varijacija, što znači da su pojedinci osjetljiviji i podvrgnuti izraženijoj resorpciji korijena. Nadalje, zbog smanjenog pristupa čišćenju zubi dolazi do povećanja upala gingive što se obično primijeti nakon postavljanja fiksnih aparatića. Uobičajeno je da se upala smanjuje ili nestaje nakon skidanja aparata, no određena apikalna migracija parodontalne vezanosti i

potpore alveolarne kosti moguća je tijekom dvogodišnjeg ortodontskog liječenja. I mobilni aparatići mogu biti povezani s upalom gingive, osobito nepčanog tkiva u kombinaciji s lošom oralnom higijenom. Kombinacija kariogenog plaka i prehrane bogate šećerom savršena su podloga za nastanak karijesa ili demineralizacije. Demineralizirane bijele lezije su rani, reverzibilni stadij u razvoju zubnog karijesa. Kako je čišćenje zuba oko dijelova aparatića otežano tako je nakupljanje plaka ubrzano. Demineralizacija tijekom liječenja fiksnim aparatićem predstavlja rizik s prevalencijom između 2 i 96%. Postoje razni dokazi koji ukazuju na povlačenje lezija nakon uklanjanja aparatića, no ipak postoji mogućnost trajnih „ožiljaka“ na caklini. Oštećenja zubne cakline mogu biti uzrokovana traumom ili istrošenim ortodontskim aparatima, postavljanjem ili skidanjem fiksnih aparata ili pak za vrijeme terapije. Primjerice, uklanjanje bravica može izazvati lom cakline, uklanjanje ljepila korištenjem svrdla za odvajanje od zuba također. Kao posljedica traume fiksnih ili mobilnih aparata pojavljuju se i ulceracije, demijelinizacije (Slika 2.) no lezije obično zacijele unutar nekoliko dana bez nekog trajnog učinka. (4)



Slika 2. Demijelinizacija na bukalnim površinama sjekutića i očnjaka tijekom liječenja fiksnim aparatom. (4)

Iako su rijetke, intraoralne alergijske reakcije na ortodontske komponente su prisutne i najčešće se povezuju s niklom, lateksom i akrilatom. S druge strane, kontaktni dermatitis prijavljen je u približno 1% populacije, a alergijske reakcije mogu se vidjeti na koži lica kao odgovor na komponente ortodontskih naprava koje obično sadrže nikal. Jedan od načina da se to spriječi bilo bi prekrivanje metalnih komponenti trakom kako bi se spriječio kontakt ili se pak mogu potražiti neke alternativne metode liječenja ovisno o ozbiljnosti situacije. (4)

1.2. Ortodontske naprave

Podjela ortodontskih naprava je raznovrsna. Ovisno o dizajnu dijele se na mobilne i fiksne, aktivne i pasivne, monomaksilarne, bimaksilarne, intraoralne, ekstraoralne te zubno, tkivno i koštano nošene. Fiksne naprave kao što i sam naziv kaže duži vremenski period fiksirane su za zube, dok mobilne pacijent sam unosi i vadi iz usta te time utječe i na njihov učinak, ali i na dužinu terapije. (1)

Kroz povijest, dizajniranje i terapija ortodontskim napravama razvijale su se istovremeno, mobilne naprave u Europi, a fiksne u Americi. Edgewise-naprava koja je naziv dobila po Edwardu Angle-u koji ju je i konstruirao, sastoji se od bravica i prstenova fiksiranih na zube i povezanih žičanim lukom, to je fiksna monomaksilarna aktivna intraoralna naprava. Ova naprava sačinjena je od metalnih bravica koje su postavljene na zube s horizontalno orijentiranim utorom u koji se postrance umeće žičani luk koji onda povezuje sve te bravice. S druge strane, Herbstov šarnir je fiksna, bimaksilarna i intraoralna naprava. (1) Tradicionalne metalne bravice su one koje su postavljene na zube koje je potrebno ispraviti i žice koja drži bravice zajedno. Kada se zategne, žica će vršiti pritisak na bravice, omogućujući poravnanje i ispravljanje zuba. (2)

Fiksne se naprave najčešće izrađuju od metala, ali mogu sadržavati i neke druge elemente kao što su akrilatni, silikonski ili gumeni, pa su na primjer Nanceov palatinalni luk i pendulum naprava za distalizaciju gornjih kutnjaka sačinjeni od metalnih osnova i nepčano položenog malog akrilatnog tijela. (1)

Raznolikost tehnologija i materijala koji se danas koriste u dentalnoj medicini nameću objektivni odabir njihove primjene, ovisno o individualnosti kliničkog slučaja kojem se teži, posebnostima pojedine situacije i estetskim zahtjevima. Upravo zbog raznolikosti tržišta, kvaliteta materijala i biokompatibilnost karakteristike su koje se ističu. Dvije klase materijala koje se najčešće koriste u oralnoj rehabilitaciji su metalni i nemetalni. Metalni su oni plemeniti, poluplemeniti i nehrđajući, a u nemetalnoj kategoriji to su samostvrdnjavajuće akrilne smole, smole koje stvrdnjavaju toplinom, fotopolimerizirajuće smole, elastične smole, kompozitne smole i keramika. Posljednjih godina, dentalne legure koje se koriste u fiksnim napravama postale su raznolike, no ipak dominiraju zlato, paladij, srebro, nikal, kobalt i titanij. Najvažnija

četiri fizikalna svojstva koja mora posjedovati protetska legura su: interval taljenja, gustoća, mehanička otpornost i tvrdoća. (5)

1.3. Metalni ioni i njihov učinak

Metali poput zlata, srebra, nikla, titanija i bakra nalaze se svuda oko nas, a uvelike se koriste u bižuteriji, kovanicama, mobitelima te ortodontskim materijalima. Ortodontski pacijenti izloženi su znatnim količinama nikla, kobalta, titanija te drugih metala koji potječu iz legura. Kombinacijom pH sline, unosom hrane, pića, tekućina za ispiranje usta te mikrobiološkim i vodenim oralnim okolišem olakšava se korozija koja dovodi do otpuštanja iona metala iz ortodontskih naprava u oralna tkiva i slinu pacijenata. Oslobođeni ioni iz ortodontskih naprava uzrokuju kontaktni dermatitis, preosjetljivost, citotoksičnost i oštećenje DNA. Nikal, među navedenim metalima, najčešći je uzrok alergije na metal. (6)

1.3.1. Nikal

Nikal (Ni) kemijski je element srebrnasto bijele boje, žilav te tvrdi od željeza. Feromagnetski je metal 10. skupine periodnog sustava elemenata. Glavna obilježja nikla su izrazita otpornost na oksidaciju i koroziju. Uvelike je poznat zahvaljujući svojoj upotrebi u kovanju novca, ali još važniju ulogu ima kao čisti metal ili u obliku legura u raznim kućanskim i industrijskim primjenama. Upravo zbog karakteristika poput žilavosti i čvrstoće nalik je željezu, no s druge strane, po otpornosti na koroziju i oksidaciju sličniji je bakru. Nikal karakterizira visoka električna i toplinska vodljivost. U većini slučajeva proizvedeni nikal koristi se u legurama sa željezom, a manji dio u legurama s bakrom otpornim na koroziju te legurama otpornima na toplinu s kromom. Isto tako, nikal se koristi i u elektro-otpornim, magnetskim te mnogim drugim vrstama legura, poput legura nikal-srebro. (7) Široko je rasprostranjen u okolišu, zraku vodi i tlu. (6)

Prirodni nikal sastoji se od pet stabilnih izotopa: nikal-58 (68,27%), nikal-60 (26,10%), nikal-61 (1,13%), nikal-62 (3,59%) i nikal-64 (0,91%). U svojim spojevima nikal pokazuje oksidacijska stanja -1, 0, +1, +2, +3 i +4, iako je +2 stanje daleko najčešće. Ni^{2+} tvori veliki broj kompleksnih spojeva. (7)

Nikal, kao uobičajena sastavnica mnogih ortodontskih materijala, u koji se ubrajaju i lukovi i bravice od nehrđajućeg čelika predstavlja približno 8% ukupnog sastava ortodontske naprave. U nikal-titanijevim žicama za lukove koncentracija legure može doseći 50% ili čak i više. (8) Alergija na nikal može se primijetiti kod ortodontskih pacijenata jer je nikal sastavni dio većine

ortodontskih legura. Alergijske reakcije su klinički uključene u izazivanje resorpcije korijena i hipodoncije. Pažljivo promatranje simptoma alergije nakon umetanja ortodontske žice koja sadrži nikal također može predvidjeti alergiju na nikal kod ortodontskih pacijenata. Nikal je otkriven kao biološki senzibilizator koji može izazvati kratkotrajne i dugotrajne reakcije osjetljivosti. (9)

Poznate alergene, mutagene i karcinogene, odnosno komplekse arsena i sulfida tvore nikal i njegovi spojevi. Ioni mogu prodrijeti kroz sluznicu i aktivirati epitelne stanice koje proizvode različite citokine ili kemokine. Dolazi do pokretanja imunološkog odgovora te se za to vrijeme aktiviraju antigen i limfociti T. Neki citokini aktiviraju stanice koje prezentiraju antigen kao što su Langerhansonove stanice ili pak dendritične stanice. Zatim slijedi migracija aktiviranih antigena u limfne čvorove gdje oni otpuštaju alergene u limfocite T. Opetovano izlaganje istom alergenu izaziva aktivaciju specifičnih limfocita T koje onda ulaze u krvotok te nakon 48 do 72 sata uzrokuju vidljive znakove preosjetljivosti. Ipak, točni molekularni mehanizmi koji posreduju u interakcijama između epitelnih i imunoloških stanica kod alergije na nikal su još uvijek nepoznati. (10)

1.3.1.1. Toksičnost nikla

Fibroza pluća, bubrežne i kardiovaskularne bolesti te rak respiratornog trakta neki su od štetnih učinaka za zdravlje ljudi prouzročeni kroničnom izloženošću spojevima nikla te nakupljanju nikla u organizmu. Iako mehanizmi neurotoksičnosti izazvani niklom još uvijek nisu jasni, veliku ulogu imaju oksidativni stres i mitohondrijske disfunkcije. Nikal može prouzrokovati oštećenje mitohondrija zbog oštećenja potencijala mitohondrijske membrane, smanjenja koncentracije mitohondrijskog ATP-a i razaranja mitohondrijske DNA. Oštećenje mitohondrijskih funkcija ometa transportni lanac mitohondrija, pojačava reaktivne kisikove spojeve i pogoršava oksidativni stres. Također, reproduktivna toksičnost povezuje se s nanočesticama nikla. Može se reći da su toksični i kancerogeni učinci nikla povezani s načinom unosa u organizam. Fizikalno-kemijska svojstva poput količine, trajanja kontakta te načina izlaganja čimbenici su o kojima ovisi potencijalna toksičnost nikla i njegovih spojeva. Ovaj metal ima mogućnost ulaska u organizam udisanjem, gutanjem s hranom te dermalnom apsorpcijom, no put kojim on ulazi u stanice zapravo je određen njegovim kemijskim oblikom. Ipak, najrizičniji način izlaganja samom niklu je udisanje. Određena hrana, slina i proizvodi za oralnu higijenu koji sadrže fluorid potencijalno korodiraju i otapaju nikal u legurama, oslobađajući ione nikla na oralnu sluznicu. Snažne učinke karcinogenosti i teratogenosti

spojeva nikla dokazali su Leonard i suradnici u svojim eksperimentalnim istraživanjima. Uvidjeli su da dolazi do povećanja broja prenatalne i natalne smrtnosti, ali isto tako nikal može uzrokovati različite vrste malformacija embrija. (6)

Dijagnoza same alergijske reakcije na nikal u oralnoj sluznici može varirati te je teža za dijagnosticiranje od one na koži. Neki oralni znakovi i simptomi koji su povezani s ispuštanjem nikla iz ortodontskih naprava mogu uključivati gingivitis u nedostatku plaka, hiperplaziju gingive, deskvamaciju usana, osjećaj peckanja u ustima, metalni okus, osjećaj utrnulosti ili bockanja te labijalno oticanje. Prije postavljanja dijagnoze alergije na nikal, treba eliminirati i druge lezije, odnosno iritacije i alergije na druge materijale, uključujući akril. Ukoliko je i dalje u pitanju alergija na nikal, dijagnoza se može potvrditi upućivanjem pacijenta dermatologu na test osjetljivosti kože pomoću 5% nikal sulfata u supstratu vazelina. (8)

1.3.1.2. Legure nikla

Najčešće korištene legure u ortodontici su one koje sadrže nikal i titanij. Udio nikla koji se može naći u ortodontskim legurama seže od 8% u nehrđajućem čeliku pa sve do 50% u leguri nikal-titanij. Općenito, preosjetljivost je pretjerana, neuobičajena reakcija imunološkog sustava na inače bezopasni antigen. Oštećenje tkiva, ozbiljna stanja i bolesti mogu biti izazvane reakcijama preosjetljivosti. Prvo izlaganje ne dovodi do simptomatskih reakcija, već ponovno izlaganje uzročnom antigenu. Kontaktna alergijska reakcija najčešći je oblik alergijskih reakcija na dentalne biomaterijale u usnoj šupljini. Nikal je esencijalni nutrijent, metal koji je raširen posvuda u okolišu, ali je u većini slučajeva kontaktni alergen. Općenito je poznato da se alergija na nikal javlja češće nego alergije na druge metale. Alergije na nikal ne mogu se smatrati niskim potencijalnim rizikom jer je procijenjena prevalencija do 28,5% opće populacije. (11)

Još 1970-ih godina nikal-titanij legure započele su sa svojom primjenom u ortodontici. Nikal-titanij lukovi uvelike su upotrebljavani u ortodontskim tretmanima u fazi poravnavanja i izravnivanja zubi. Prvi sastav ovih legura bio je sačinjen od 50% nikla i 50% titanija. Ipak, prisutni su problemi u korištenju nikal-titanij legura u ortodontskim tretmanima, a to su korozija i trenje. Zbog korozije i trenja dolazi do oslobađanja nikla i mehaničkog slabljenja. Kako bi se to izbjeglo primjenjuju se površinske izmjene, a jedan od glavnih parametara za promatranje učinaka površinskih modifikacija je upravo površinska hrapavost. 50% ili više gubitaka zbog trenja može se primijetiti preko žice luka. (12)

U proizvodnji nehrđajućih čelika najčešće se koristi feronikal, odnosno legura željeza sa dodatkom nikla koji varira od 24 do 48%. Gotovo polovina svjetske proizvodnje nikla troši se za potrebe proizvodnje nehrđajućih i drugih čelika s visokim sadržajem nikla. Redovito se u feronikal dodaje i 16 do 26% kroma. Također se priređuje i legura nikla samo s kromom koja sačinjava 80% nikla i 20% kroma i naziva se Nikrom legura. Legure nikla s aluminijem nazivaju se Duranikal. Još neke legure u kojima sudjeluje nikal su Monel legure od nikla, bakra i željeza te razne magnetske legure poput Permalloy-a, Hipernika, Perminvara i Al-Ni-Co legure. (13)

1.3.2. Željezo

Željezo je kemijski element 8. skupine periodnog sustava i najkorišteniji je metal. (14) Sjajan je, rastezljiv, kovak, srebrno-siv metal koji hrđa na vlažnom zraku, ali ne i na suhom. Karakterizira ga niska cijena i visoka čvrstoća. (15) Čini 5% Zemljine kore i po zastupljenosti drugi je iza aluminija među metalima, a četvrti po zastupljenosti iza kisika, silicija i aluminija među elementima. Željezo, kao glavni sastojak Zemljine jezgre najzastupljeniji je element na Zemlji kao cjelini s oko 35%. U zemljinoj kori slobodni metal je rijedak te se pojavljuje kao zemaljsko željezo legirano s 2 do 3% nikla i kao meteorsko željezo s niskim udjelom nikla (5 do 7%), kamacit. Nikal-željezo, samородna legura pojavljuje se u kopnenim naslagama, gdje željezo čini od 21 do 64%, a nikal od 77 do 34% i u meteoritima kao taenit u kome ima 62 do 75% željeza te 37 do 24% nikla. (14) Vjeruje se da se Zemljina jezgra uglavnom sastoji od metalne legure željeza i nikla. (15) Također, željezo se nalazi i u kombinaciji s drugim elementima u stotinama minerala. Kao željezne rude najveću važnost imaju hematit, magnetit, limonit i siderit. Magmatske stijene prosječno sadrže oko 5 posto željeza. Metal se dobiva taljenjem ugljika (koksa) i vapnenca. (14)

Čisto željezo vrlo je reaktivno. U jako fino usitnjenom stanju metalno se željezo spontano pali. Snažno se spaja s klorom pri blagom zagrijavanju, ali i s nizom drugih nemetala, uključujući sve halogene, sumpor, fosfor, bor, ugljik i silicij. Metalno željezo se lako otapa u razrijeđenim mineralnim kiselinama. Prirodno željezo mješavina je četiri stabilna izotopa: željezo-56, željezo-54, željezo-57 i željezo-58, a najvažnija oksidacijska stanja željeza su +2 i +3, iako su poznata brojna +4 i +6 stanja. (14) Željezo tvori dva glavna niza kemijskih spojeva, spojeve dvovalentnog željeza (fero) i trovalentnog željeza (feri). (15)

Ljudsko tijelo sadržava određenu količinu željeza, njegova prosječna količina je otprilike 4,5 grama što je oko 0,004%, od čega je 65% u obliku hemoglobina koji prenosi molekularni kisik iz pluća kroz tijelo. (14) Željezo može uzrokovati konjunktivitis, horioiditis i retinitis ako dođe

u kontakt i ostane u tkivima. Kronično udisanje prekomjernih koncentracija para ili prašine željeznog oksida može rezultirati razvojem benigne pneumokonioze, odnosno sideroze, koja se može uočiti kao promjena na rendgenskim zrakama. (15)

Materijal koji se sastoji od dviju ili više komponenti od kojih je barem jedna metal naziva se legura. Vlastita specifična svojstva legura mogu se uvelike razlikovati od svojstava njenih komponenti, primjerice legura željeza i ugljika. Loša mehanička svojstva, mekoća te praktički bezvrijednost kao tehnički materijal, karakteristike su željeza kao elementa. No, ukoliko se u malim količinama željezu doda ugljik, nastaje legura nazvana čelikom. Svojim mehaničkim svojstvima predstavlja najrašireniji konstrukcijski materijal. (16) Čelik je najpoznatija legura željeza, a neki od oblika koje željezo poprima su: sirovo željezo, lijevano željezo, ugljični čelik, kovano željezo, legirani čelici, željezni oksidi. (15) Općenito, željezo čini bazu nekoliko vrsta legura na bazi metala, no ipak u većini slučajeva udio željeza u legurama je malen. Željezo se odlično nadopunjuje s niklom pa tako zajedno poboljšavaju mogućnost obrade legure u hladnom stanju. U ortodontici, legure čelika nalaze se u žicama i bravicama, čak najčešće u prstenovima, no oni se ne koriste uvijek. (16)

Primjena legura u dentalnoj medicini vrlo je uobičajena. Dugi niz godina, nehrđajući čelici, legure željeza, ugljika, kroma te nikla bili su nezamjenjiv materijal u izradi instrumenata, uređaja te implantata. (16)

1.3.3. Titanij

Titanij je element koji uvelike svoju primjenu pronalazi korištenjem u zubnim, ortopedskim i srčanim implantatima zbog svoje sposobnosti vezanja za živo tkivo i kosti. (17)

Srebrno sivi metal titanij je kemijski element koji pripada 4. skupini periodnog sustava elemenata. Lagan je konstrukcijski metal visoke čvrstoće s malom korozijom te se koristi u obliku legure za određene dijelove u brzim zrakoplovima. Čisti titanij karakterizira duktilnost, upola veća gustoća od željeza te manje od dva puta veća gustoća od aluminija. Obilježja metala su vrlo niska električna i toplinska vodljivost te paramagnetičnost. Važan je kao sredstvo za legiranje većine metala i određenih nemetala. Neke od tih legura imaju mnogo veću vlačnu čvrstoću od samog titanija. Zbog stvaranja pasivnog oksidnog površinskog filma titanij pokazuje odličnu otpornost na koroziju. Titanij je nalik drugim prijelaznim metalima poput željeza i nikla jer je tvrd i vatrostalan. Kombinacija visoke čvrstoće i male gustoće te izvrsna otpornost na koroziju čine ga korisnim za mnoge dijelove zrakoplova, projektila i brodova. (18)

Pri visokim temperaturama, elementarni titanij dobiva se vrlo teško jer je tada vrlo reaktivan te se lako spaja s ugljikom, kisikom i dušikom. Titanij sadrži smjesu od 5 stabilnih izotopa, a to su titanij-46, titanij-47, titanij-48, titanij-49 i titanij-50, no poznato je još deset radioaktivnih izotopa. U svojim spojevima titanij pokazuje oksidacijske brojeve +2, +3 i +4. Spojevi dvovalentnog i trovalentnog titanija su paramagnetični te su dobra redukcijska sredstva, dok su ipak najstabilniji spojevi u kojima ima oksidacijski broj +4. (19)

U posljednjih 30 godina primjena titanija u stomatologiji je porasla. Legure titanija imaju široku uporabu u zubnim implantatima, pacemaker-ima, stentovima te ortodontskim nosačima. Nosači od titanija uvedeni su kako bi se prevladali nedostaci u globalu, ali i nedostaci nosača od nehrđajućeg čelika. Općenito je poznato da elementi nikla i kroma u nosačima od nehrđajućeg čelika izazivaju alergije, ali imaju i toksične i kancerogene učinke. Korištenje titanijskih bravica ima prednost u ortodontskom liječenju pacijenata alergičnih na nikel. Glavna vrlina titanijskih bravica je u poboljšanim legurama povećane tvrdoće i otpornosti na koroziju, a titanij je odnedavno uveden kao alternativni materijal za proizvodnju metalnih bravica. Odgovor na pitanje zašto baš titanij, leži u njegovoj dokazanoj biokompatibilnosti, nedostatku alergenosti te povećanoj otpornosti na koroziju. (20) Usprkos tome što su titanij i njegove legure pokazali veliku otpornost na koroziju, to ne znači da se ona ne može dogoditi uslijed bioloških i elektrokemijskih procesa u usnoj šupljini. (17)

S druge strane, smatralo se da titanij nema alergijski potencijal upravo zbog svoje biokompatibilnosti, ipak neki autori izvješćuju da može biti erozivan ako koegzistira s drugim vrstama metala ili pak kada je izložen ionima fluorida u kiselom okruženju. To nagovješćuje da tijekom ortodontskog liječenja koje uključuje prisutnost nekoliko vrsta metalnih legura u medijima usne šupljine može doći do takvih reakcija. U dosadašnjim istraživanjima simptomi povezani s alergijskom preosjetljivošću na nikel ili titanij podrazumijevaju slab osjet mirisa i/ili okusa, otekline jezika ili lica i suzne oči. Prema prethodnim podacima, simptomi oralne kontaktne alergije mogu biti oštećenje okusa, senzorne disfunkcije, oticanje usana i lica, pa čak i jezika. (11)

Uspoređujući površinsku strukturu i boju titanijskih i čeličnih nosača, razlika je vidljiva. Sama površina valjanih krila titanijskih bravica je vrlo hrapava, a biokompatibilnost titanija podržava prijanjanje plaka. Zbog toga dolazi do znatno većeg nakupljanja plaka i izraženije promjene boje kod titanijskih bravica. Također, kombinirana uporaba titanijskih bravica u kombinaciji s

upotrebom paste za zube s kiselim fluorom i fluorirane hrane potpuno je bezopasna za bravicu i ne uzrokuje koroziju. (20)

1.3.4. Krom

Krom je kemijski element koji pripada 6. skupini periodnog sustava elemenata, prepoznatljiv kao tvrd, čelično sivi metal koji se visoko polira te koristi u legurama za povećanje čvrstoće i otpornosti na koroziju. Relativno je zastupljen element Zemljine kore. Kao slobodni metal, krom se nikada ne nalazi u prirodi. Može se reći da je glavna upotreba kroma u željeznim legurama za koje nije potreban čisti metal. Željezu i niklu, u obliku ferokroma, dodaje se krom namijenjen proizvodnji legura karakteriziranih visokom otpornošću na koroziju i oksidaciju. Korišten u malim količinama, krom ima sposobnost stvrdnjavanja čelika. Nehrđajući čelici su legure kroma i željeza u kojima sadržaj kroma varira od 10 do 26%. Karakterizira ga izuzetna otpornost na obične korozivne reagense, ovaj metal je bijel, tvrd, sjajan i lomljiv. Krom se može spojiti izravno s halogenima ili sa sumporom, silicijem, borom, dušikom, ugljikom ili pak s kisikom, ukoliko uslijede povišene temperature. Četiri stabilna izotopa karakteristična su za prirodni krom, a to su krom-52, krom-53, krom-50 i krom-54. Krom je paramagnetičan, slabo ga privlači magnet. Postepeno otapanje u klorovodičnoj i razrijeđenoj sumpornoj kiselini tipično je za krom, ali pri sobnoj temperaturi. Određena oksidirajuća sredstva imaju tendenciju stvaranja tankog nereaktivnog oksidnog sloja na metalu, čineći ga time pasivnim i za razrijeđene mineralne kiseline, poput sumporne ili dušične. Na uobičajenim temperaturama nema reagiranja metala na morsku vodu, vlažan ili suh zrak. Iako su najčešća oksidacijska stanja kroma +6, +3 i +2, poznato je i nekoliko stabilnih spojeva stanja +5, +4 i +1. (21)

Općenito, otpornost na koroziju važan je uvjet za ortodontske naprave. Kao i nikal, i krom se može osloboditi iz ortodontskih žica te uzrokovati alergijske reakcije. U oralnom okruženju sve metalne komponente podliježu koroziji zbog raznih kemijskih, mehaničkih, toplinskih, mikrobioloških i enzimskih promjena koje dovode do oslobađanja iona. Samo otpuštanje iona može uzrokovati promjene boje susjednih mekih tkiva, alergijske reakcije ili bol. Također, oslobođeni ioni mogu imati toksične i biološke nuspojave. Zabilježene su alergijske reakcije na krom koji se oslobađa iz ortodontskih materijala. (22)

U deset provedenih studija, ortodontski tretman praćen je povećanjem razine iona nikla i kroma, što bi moglo biti posljedica korozije na površini bravica, metalnih žica za lukove i ligatura. Nikal je katoda koja uzrokuje koroziju na površini legura nehrđajućeg čelika već tijekom prvih dana započinjanja ortodontskog tretmana, nakon čega se te kemijske reakcije smanjuju. Sloj

kromova oksida stvara se na metalnim dijelovima, a krom se pod utjecajem fizikalnih i kemijskih čimbenika može otpustiti u usnu šupljinu. (10)

Rezultati *in vitro* istraživanja pokazuju raznoliku dinamiku otpuštanja metalnih iona iz dijelova naprava zasebno uronjenih u umjetnu slinu, i to iz NiTi lukova, odnosno čeličnih prstenova, ligatura i bravica. Moguće je stvaranje zaštitnog sloja, često se on i stvara, neovisno od kojeg je materijala izrađena legura, ali je dinamika stvaranja tog sloja, kao i količina otpuštenih metalnih iona raznolika i često nepredvidljiva. (23)

U jednom istraživanju Urbutyté i suradnika mjerena je količina iona nikla i kroma u slini prije stavljanja ortodontskih naprava te nakon određenog razdoblja nošenja istog. Dokazano je kako postoji povećanje razine iona nikla i kroma u slini tijekom ortodontske terapije. Naime, postoji značajan porast navedenih iona nakon postavljanja ortodontskih naprava koji svoj vrhunac dosežu nakon tri do šest mjeseci, ali ne doseže toksične razine. Raznim istraživanjima dalo se zaključiti da fiksni ortodontski aparati oslobađaju ione nikla i kroma u slinu elektrokemijskom razgradnjom, što posljedično dovodi do stvaranja slobodnih radikala te kemijskih promjena na bazi DNA. (10)

1.4. Kvasac kao organizam

Kvasci, kao i plijesni i mesnate gljive, pripadaju carstvu gljiva (*Fungi*) te se razmnožavaju pupanjem. Često se nazivaju i jednostaničnim gljivama. Gljive ne sadrže klorofil, stoga energiju i CO₂ ne mogu stvarati procesom fotosinteze pa se zbog toga svrstavaju u kemoheterotrofne organizme. (24) Poznato je da su kvasci jednostanični eukariotski organizmi vrlo jednostavni za uzgoj, iako odražavaju složenu građu viših eukariota. (25)

Blastokonidija je stanica kvasca te ona može biti izduženog ili ovalnog oblika, a njen promjer može varirati. Njeni osnovni dijelovi, vidljivi pod elektronskim mikroskopom jesu višeslojna stanična stijenka, periplazmatski prostor, citoplazmatska membrana, mitohondriji, jezgra, ribosomi, glikogenska zrnca, lipidne čestice, endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat, peroksisomi i vakuole. Višeslojnom staničnom stijenkom obavijena je stanica kvasca, a ispod nje smještena je citoplazmatska membrana, dok su razne organele uočljive u citoplazmi blastokonidije. Stanična stijenka kvasca većinski je građena od polisaharida. Od velike je važnosti za preživljavanje, rast i razmnožavanje blastokonidije. (25) Upravo ona kvascu daje oblik i čvrstoću te štiti protoplast od mehaničkog oštećenja i osmolize stanica. (24) Odlikuje se izuzetnom čvrstoćom i rigidnošću koja podnosi visoke osmotske tlakove, ali istovremeno posjeduje i fleksibilnost potrebnu za dinamičke promjene tijekom rasta stanica, parenja te sporulacije. Ovakvi fiziološki zahtjevi doveli su do evolucije složene strukture sastavljene od β-glukana i manoproteina s malom, ali bitnom količinom hitina. (26) Citoplazmatska membrana kvasca građena je od fosfolipidnog dvosloja u kojem se nalaze steroli, sfingolipidi te proteini. Ergosterol je glavni sterol u kvascima, koji uz kolesterol ima važnu ulogu u regulaciji čvrstoće, propusnosti i fluidnosti membrane. Membrane stanice kvasca sadrže manji udio lipida, a oni imaju važnu ulogu u funkcioniranju membrana mitohondrija. (25)

Općenito, stanice kvasca sadrže jednu jezgru promjera približno 1 μm. U jezgri se nalazi genetski materijal stanice koji je vezan dvostrukom membranom, jezgrinim omotačem. Jezgrina ovojnica sadrži mnoštvo kompleksa nuklearnih pora kojima se omogućava prolaz malih otopljenih tvari, proteina i RNA molekula kroz jezgrinu ovojnicu. (27)

U morfogenezi, polaritetu stanice te unutarstaničnom transportu, primjerice staničnih organela, važnu ulogu ima citoskelet kvasca. Sastavljeni od proteina, aktinski i tubulinski filamenti dvije su glavne komponente citoskeleta. Aktinski su filamenti nerazgranati polimeri globularnih aktinskih podjedinica koje tvore dvolančane spiralne strukture, a karakterizira ih fleksibilnost. Mikrotubuli su pak šuplja, nerazgranata vlakna formirana od podjedinica tubulina. Obilježja

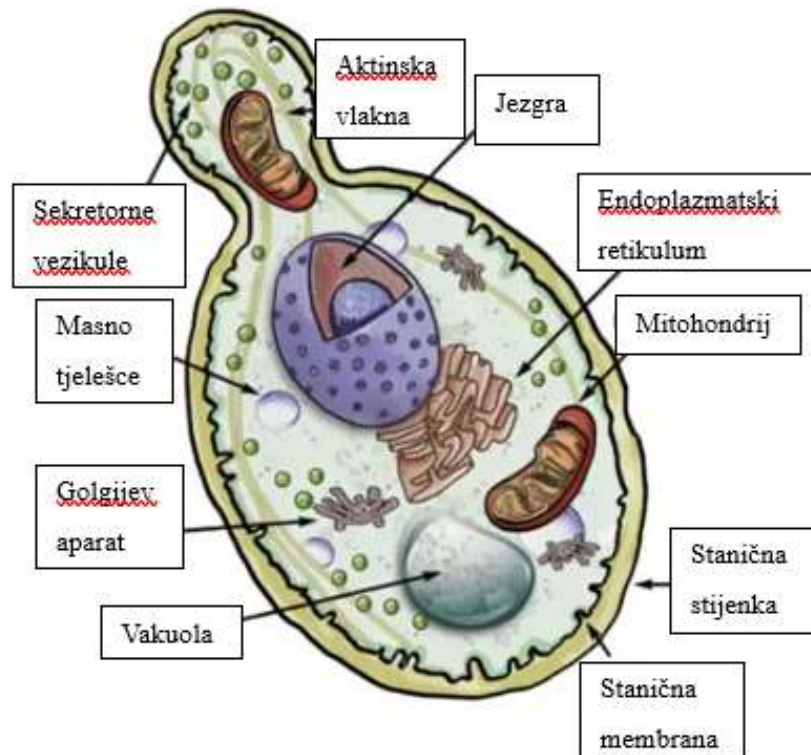
ovih vrsta filamenata su dinamičnost te kontinuirana formacija i odvajanje kao odgovor na funkcionalne potrebe. Velik je broj onih proteina koji stupaju u interakciju s vlaknima aktina i tubulina te također, onih koji vežu aktin, koji moduliraju njihovu funkciju. (27)

Kao i lizosomi u stanicama sisavaca, tako i vakuola igra važnu ulogu u razgradnji staničnog sadržaja putem autofagije. Vakuola pomaže u pH i osmoregulaciji te u skladištenju aminokiselina, iona i polifosfata. Valja napomenuti kako je veličina i broj vakuola po stanici vrlo varijabilan. Vakuola kvasca sastoji se od lumena okruženog jednom membranom, a on je kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kiseo s pH približno 6,0, a enzimi hidrolaze koji u njemu djeluju imaju nizak optimalni pH. Međutim, citosol je neutralan pa postoji pH gradijent preko vakuolarne membrane, a ona sadrži ATP-azu koja prenosi proton. (27)

Uspjeh u korištenju kvasca kao modelnog organizma posljedica je visokog stupnja očuvanja mnogih važnih staničnih procesa između kvasca i ljudskih stanica, primjerice autofagija, translokacija i izlučivanje proteina, razgradnja proteina povezana s endoplazmatskim retikulumom, toplinski šok i savijanje proteina. (27)

1.5. *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *S. cerevisiae* (Slika 3.) već se mnogo godina koristi u proizvodnji kruha i piva. Također, njegova lakoća manipulacije, dobro označeni genom te snažno očuvanje osnovne eukariotske biologije čine ga glavnim modelom za biologiju i genetiku eukariotskih stanica. *S. cerevisiae*, poznatiji kao pivski ili pekarski kvasac veličine je oko 5 μm , jednostanični je eukariot te stoga sadrži jezgru i druge organele vezane za membranu. Stanice kvasca daju se relativno lako kultivirati u laboratorijskim uvjetima jer im nije potreban složen medij za rast. (28)



Slika 3. Građa stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

Jednostanična je gljiva koja posjeduje nuklearnu genomsku DNA od 12068 kilobaza organiziranih u 16 kromosoma. 1996. godine njegov su genom potpuno sekvencionirali Goffeau i suradnici te je utvrđeno da sadrži približno 6000 gena, od kojih se pretpostavlja da će 5570 biti onih koji kodiraju proteine. Raznim bioinformatičkim analizama dokazano je da je niz gena koji kodiraju proteine stranog podrijetla, odnosno rezultat lateralnog prijenosa gena, kako je taj pojam definirao i sam Doolittle 1999. godine. (29) Međutim, *S. cerevisiae* može postojati u haploidnom i diploidnom obliku. Naime, sojevi *S. cerevisiae* koji se pojavljuju u prirodi često su genetski različiti i složeniji, s visokim stupnjem heterozigotnosti i često pokazuju aneuploidiju i poliploidiju u svojim genomima. (28)

Soj *S. cerevisiae* W303 široko je korišten modelni organizam. Međutim, malo se zna o njegovom genetskom podrijetlu, budući da je nastao 1970-ih križanjem sojeva kvasca nejasne genealogije. (30) W303 laboratorijski je soj koji je usko povezan s potpuno sekvencioniranim sojem kvasca S288C. W303 naziva se potomkom S288C te je odabran da zadrži njegove poželjne karakteristike, tj. da dobro sporulira i da se transformira s visokom učinkovitošću. Od svog nastanka, W303 se široko koristi za genetske analize popravka DNK i drugih bioloških mehanizama. (31)

Razlike u laboratorijskim sojevima dobro su dokumentirane. Primjerice analize proteoma nekoliko laboratorijskih sojeva otkrivaju različito izražene proteine u različitim laboratorijskim sojevima. Dodatno, određeni aleli SWI-SNF globalnog aktivatorskog kompleksa transkripcije doprinose sporom rastu u pozadini W303, ali su pak smrtonosni u S288C. Uzevši u obzir ove razlike, razumijevanje preciznih varijacija na razini nukleotida između sojeva važan je korak u razjašnjavanju temeljnih uzroka fenotipskih razlika. (31)

1.6. Mitohondrij kvasca

Mitohondriji, organeli koji se većinski nalaze u svim eukariotskim organizmima, često su nazivani elektranama stanice zbog njihove glavne uloge u stvaranju stanične energije u obliku adenozin trifosfata kroz ciklus trikarboksilne kiseline i oksidativne fosforilacije. Međutim, mitohondriji su također uključeni u druge metaboličke procese, kao što su metabolizam aminokiselina te lipida, ali i sintezu klastera željezo-sumpor i hema. (32)

Mitohondriji se sastoje od dvije membrane, unutarnje i vanjske mitohondrijske membrane koje okružuju dva odjeljka, a to su međumembranski prostor i mitohondrijski matriks. Organizirani su kao cjevaste mreže čijom morfologijom upravljaju suprotni procesi fisije i fuzije te time omogućuju prilagodbu morfologije mitohondrija metaboličkim zahtjevima stanice. Međusobno povezani mitohondriji rezultiraju fuzijom, dok je rezultat nastanka brojnih filamenata mitohondrija pomicanje prema fiziji. Međusobno povezani mitohondriji korisni su u respiratornim aktivnim stanicama gdje dopuštaju učinkovito miješanje enzima, metabolita i mitohondrijskih genskih produkata u cjelokupnoj mitohondrijskoj mreži. (32)

Genom mitohondrija raznolik je među različitim eukariotima i kad se govori o veličini, ali i sadržaju genoma. Kompletan mitohondrijski genom kvasca *S. cerevisiae* prvi je puta sekvencioniran 1998. godine. Mitohondrijska DNA kvasca predstavlja otprilike 15% ukupnog sadržaja stanične DNA. U njoj su prisutne male količine kružne DNK, no uglavnom se sastoji od linearnih molekula različite duljine u rasponu od otprilike 75 do 150 kilobaza. U kvascu *S. cerevisiae*, mtDNA kodira osam proteina, od kojih je sedam podjedinica transportnog lanca elektrona i oksidativne fosforilacije, a jedan je ribosomalni protein male podjedinice. Sastoji se od tri aktivna izvora replikacije, ori2, ori3 i ori5 te pet elemenata sličnih izvoru replikacije. Osim toga, također sadrži gene za kompletan set tRNA potrebnih za mitohondrijsko prevođenje, te 15S i 21S rRNA. (32)

Održavajući vlastiti genom u stanicama koje aerobno dišu, evolucijski podsjećaju na drevne intracelularne simbiote kojima pripadaju α -proteobakterije. Budući su mitohondriji jedan od glavnih izvora reaktivnog kisika, za koji se zna da je nusproizvod disanja i otrovan za stanicu, smatra se da je mitohondrijska DNA osjetljivija na oksidativno oštećenje od nuklearne DNA. Nuklearna je DNA čvrsto naborana i zaštićena u uređenim struktura nukleosoma povezivanjem s histonima. No, mitohondriji ne sadrže histone, a za mitohondrijsku DNA se dugo smatralo da nema zaštitnih proteina i da je gola. (33)

1.7. Proteom mitohondrija

Kako bi se unaprijedila sistemska biološka analiza mitohondrija, važno je identificirati njihov potpuni proteom. U posljednjem desetljeću, napredak u metodama masene spektrometrije omogućio je poboljšanu karakterizaciju mitohondrijskog proteoma. Prema Cherry i suradnicima, od rujna 2017. godine, ukupan broj gena u bazi podataka genoma *Saccharomyces* označenih mitohondrijima je 1205. Zanimljivo je da je samo 15% mitohondrijskih proteina uključeno u energetske metabolizam, a oko 20% proteina je nepoznate funkcije. (32)

Već je uvelike poznato da osnovne mitohondrijske funkcije uključuju oksidativnu fosforilaciju, metabolizam aminokiselina, oksidaciju masnih kiselina i ionsku homeostazu. Uz ove dobro poznate funkcije, mnoga ključna svojstva u staničnoj signalizaciji, staničnoj diferencijaciji i staničnoj smrti tek se sada razjašnjavaju, a s njima i uključeni proteini. (34)

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati sinergistički učinak metalnih iona eluiranih iz ortodontske naprave (koja se sastoji od 2 luka, 20 bravica, 20 ligatura i 4 prstena) u kvašćevu podlogu kao medij, nakon perioda od 14 dana na kvasac *Saccharomyces cerevisiae* W303. Analizirat će se vitalnost i vijabilnost te sadržaj i sastav proteina mitohondrija kvasca. Metalni ioni u iscrpini određivat će se ICP-MS tehnikom, vitalnost kvasca AOPI bojom, a proteom mitohondrija kvasca analiziran je LC-MS tehnikom.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizam

Soj W303 kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (auksotrofni mutant MATa {his3-11,15 leu 2-3, 112 ura3-1, trp1-1, ade2-1}) korišten je u ovom istraživanju. Ovaj soj kvasca auksotrofan je za histidin te je osjetljiv na prisutnost metalnih iona u podlozi, tj. on može rasti na podlogama s metalnim ionima, ali za svaki metal do određenih koncentracija i uz određenu pH vrijednost. Općenito, inhibicija rasta kvasca *S. cerevisiae* metalnim ionima ovisi o pH. Stoga je u svrhu ovog istraživanja određen pH 5.5 kao optimalan. (35)

3.1.2. Uređaji, laboratorijski pribor, kemikalije

Stakleno posuđe (tikvice od 250 mL, 500 mL, 1000 mL; čaše, epruvete)

Automatske pipete različitih volumena, Eppendorf, Njemačka

pH-metar MP 220, Mettler Toledo, EU

Tehnička vaga PCB 1000-2, Kern-Sohn, Njemačka

Magnetska miješalica MR Hei Standard, Heidolph, Njemačka

Autoklav za sterilizaciju, CertoClav, Austrija

Tresilica Unimax 1000, Heidolph, Njemačka

Vorteks, Technokartell TK3S, Australija

Koncentrirana otopina klorovodične kiseline (HCl), Merck, Njemačka

Glukoza, Biolife, Italija

Pepton, Liofilchem, Italija

Kvašćev ekstrakt, Biolife, Italija

LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter, Logos Biosystems, Južna Koreja

Fluorescence microscope Olympus BX51 (Olympus, Japan)

AO – Acridine orange hydrochloride hydrate; Akridin narančasto hipoklorid hidrat (C.I. 46005), 1g, Carl Roth, Njemačka

PI – Propidiumiodid $\geq 95\%$, p.a.; Propidij jodid, Carl Roth, Njemačka

3.2. Metode

3.2.1. Priprema hranjive podloge

Hranjiva podloga za uzgoj kvasca je potpuna podloga (YPD) sačinjena od peptonske vode, glukoze i kvašćevog ekstrakta. Dodaje se 20g/L peptonske vode (YPD), 20 g/L glukoze (YPD) te 10 g/L kvašćevog ekstrakta (YPD). Nakon što se ovi sastojci izvažu, dodaje im se određena količina destilirane vode. Zatim slijedi miješanje na magnetskoj miješalici dok otopina ne postane bistra. Kako bi se pripremila optimalna podloga za rast kvasca potrebno je namjestiti pH vrijednost na 5,5 uz dodatak koncentrirane klorovodične kiseline. (36)

3.2.2. Priprema ortodontskih materijala za pripremu iscrpina

Jedan ortodontski aparatić sačinjavaju 2 žice, 20 bravica (equilibrium, REF 722-301-10), 4 prstena (dentaform, Zahn 16, Große 22/Roth 22; REF 882-322-22), te 20 ligatura (remanium, REF 751-000-00). YPD medij korišten je za pripremu podloga s iscrpinama metalnih iona. U svaku od 4 tikvice dodaju se navedeni ortodontski materijali, a zatim se u te iste tikvice izlije 28 mL pripremljene podloge prema važećoj ISO normi (ISO 10993-5:2009) te se svaka tikvica začepi. Nadalje, slijedi sterilizacija u trajanju od 15 minuta na 121°C, onda se uzorci ohlade te se tikvice stavljaju na rotacijsku tresilicu (37 °C, 100 okr/min) gdje se kontinuirano miješaju određeni vremenski period, 3, 7, 14 i 28 dana kako bi se naposljetku dobile iscrpine metalnih iona. Iako se pripremalo više različitih iscrpina, u ovom se istraživanju koristila iscrpina od 14 dana.

3.2.3. Uzgoj kvasca

Sterilnom bakterijskom ušicom prenese se dio biomase kvasca s krute hranjive podloge u epruvetu sa 10 mL YPD hranjive podloge. Epruveta se lagano miješa sa svrhom raspršenja biomase po hranjivom mediju. Zatim se uzgoj nastavlja na tresilici (200 okr/min) kroz 24 sata, a porast kvasca vidljiv je zamućenjem podloge.

3.2.4. Određivanje vitalnosti kvasca

3.2.4.1. Brojanje stanica na LUNA-FL™ Dual fluorescence cell counter

Luna-FL™ fluorescence cell counter (Slika 4.) brz je i pristupačan uređaj za prebrojavanje stanica temeljen na slikama, koji sadrži svijetlo polje i dvostruku fluorescentnu optiku, koji automatski prebrojava različite vrste stanica. Osim što pomaže u mjerenju ukupnog broja stanica i njihove koncentracije, pomaže i u detekciji živih i mrtvih stanica, prikazuje postotak živih stanica prema ukupnim stanicama te histogram raspodjele veličine stanica. Mjerenja se

moгу provesti za stanice u koncentracijama u rasponu 1×10^4 do 1×10^7 , poželjno bi bilo od 5×10^4 do 1×10^7 stanica/ml te za stanice unutar promjera raspona 1 do 90 μm , a poželjno je od 5 do 60 μm . (37)

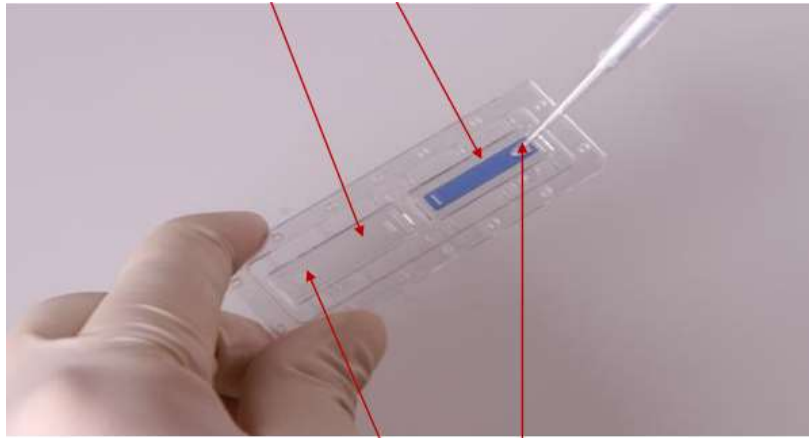


Slika 4. LUNA-FL TM dual fluorescence cell counter. (37)

PhotonSlide™ (Slika 5.) je jednokratan i posebno dizajniran za Luna-FL™. Svako stakalce za brojanje ima dvije komore, označene A i B, jedno stakalce se može koristiti za isto očitavanje uzorka u duplikatu ili se može koristiti za dva različita uzorka. (37)

Za što točnije očitavanje vrijednosti na optičkom čitaču, uzorke je u većini slučajeva potrebno razrijediti. Stoga se ispipetira 900 μL vode i 100 μL suspenzije kvasca u Eppendorf tubicu da se uzorak razrijedi 10x. Zatim se sadržaj promiješa te se iz tubice ispipetira po 13 μL i nanese na komoricu za očitavanje broja stanica.

Komora za punjenje uzorka (označena kao A i B)



Otvor za ispuštanje uzorka

Slika 5. Nanošenje uzorka u PhotonSlide™ (37)

U ovom istraživanju, svjetlosnom se metodom mjerilo na aparatu LUNA. Nakon nanošenja uzorka u komoricu te njegovog umetanja u aparat, slijedi prebrojavanje stanica. Unutar nekoliko sekundi, ovisno o koncentraciji stanica, na zaslonu se prikaže slika uzorka stanica te svi podaci, tj. rezultati koji uključuju ukupnu koncentraciju, žive i mrtve stanice, vitalnost, prosječnu veličinu stanica te stvarni broj ukupnih, živih te mrtvih stanica. Kvalitetu brojanja stanica može se provjeriti „tagiranjem“, odnosno označavanjem, gdje se na zaslonu može vidjeti koliko je stanica aparat prebrojio, odnosno zaokružio kao prebrojane. (37)

3.2.4.2. Bojanje kvasaca fluorescentnom bojom

3.2.4.2.1 AO/PI

AO/PI fluorescentna boja (eng. *Acridine Orange/Propidium Iodide*) dobar je alat kojim se može odrediti vijabilnost kvasaca. Kako je AO boja propusna za stanice, onda sve stanice s jezgrom razvijaju zeleno obojenje budući da se AO veže za DNA i živih i mrtvih stanica. PI pak ulazi isključivo u stanice s oštećenom membranom, stoga se umiruće stanice, mrtve ili nekrotične stanice s jezgrom obojene PI, bojaju crveno. Ponekad se oštećene stanice bojaju s obje boje, pa su vidljive kao narančasto-crvene. Kada su stanice obojene s AO i PI bojama, onda žive stanice s jezgrom fluoresciraju samo zeleno, a mrtve stanice s jezgrom samo crveno.

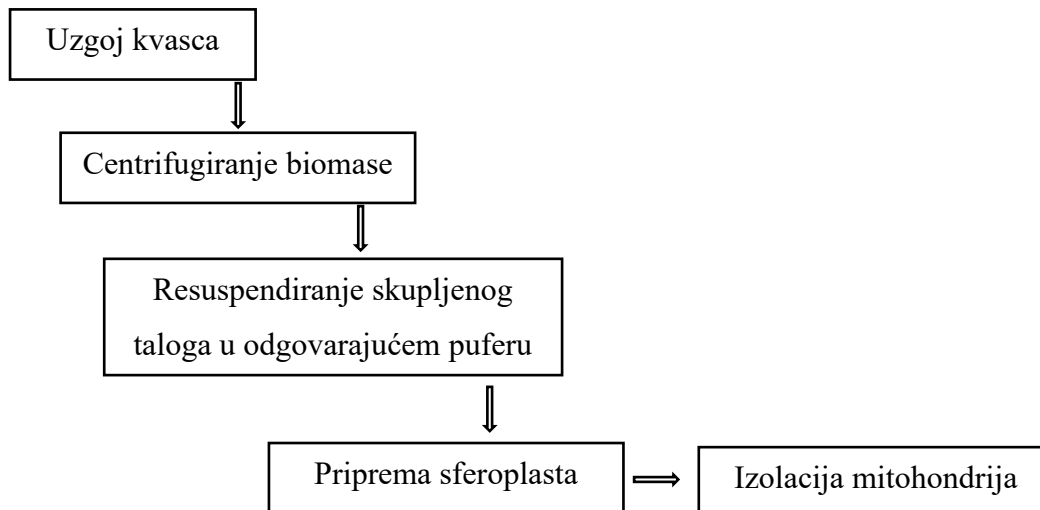
Postupak je jednostavan, AO/PI boja i uzorak stanice kvasca se pomiješaju (jedan kontrolni i jedan tretirani, primjerice 14 dana) i to 2 μL uzorka i 18 μL pripravka AO/PI boje.

3.2.4.2.2. Priprema trajnog preparata obojanog kvasca

Tehnika fiksiranja odvija se u nekoliko koraka. Važno je naglasiti da se priprema trajnog preparata obojanog kvasca odvija u mraku. Prvi korak je centrifugiranje stanične suspenzije nakon bojanja s fluorescentnom bojom, u Eppendorf tubici na 3000 okr/min 5 minuta te uklanjanje supernatanta. Zatim se dodaje 100 μL paraformaldehida. Miješa se na vorteksu, a nakon toga inkubira na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nakon centrifugiranja na 3000 okr/min, 5 minuta, ukloni se supernatant. Talog se ispere jednom (s 0,5-1 mL) u fosfatnom puferu uz dodatak sorbitola (1M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 5.5, 2M sorbitol) te resuspendira u malom volumenu tog istog pufera. Tako pripremljene stanice mogu se pohraniti u hladnjaku do mjesec dana. Za pripremu mikroskopskog preparata korišteno je do 6 μL takvih obojanih stanica.

3.2.5. Izolacija mitohondrija

Slijedeći protokol proizvođača (Abcam) provodi se izolacija mitohondrija, a ona ukratko uključuje slijedeće korake:



Sferoplasti su stanice bez stanične stijenke te se upravo iz njih izoliraju mitohondriji. (38)

Komponente kupovnog kita za izolaciju mitohondrija sačinjavaju pufer A (50 mL), pufer B (50 mL), 1M DTT (1 mL), homogenizacijski pufer (50 mL), mješavina enzima za lizu (200 μ L), pufer za pohranu (10 mL) te koktel inhibitora proteaza – liofiliziran (1 bočica). Komplet je nužno čuvati na -20°C te ga zaštititi od svjetlosti. Važno je naglasiti da je potrebno izbjegavati ponavljane cikluse odmrzavanja/zamrzavanja. (38)

Sam postupak izolacije mitohondrija započinje sa stanicama kvasca koje se uzgajaju na odgovarajućoj podlozi, potpunoj kvaščevoj podlozi (YPD) preko noći na 30°C , na tresilici pri 200 okr/min. Kada stanice dospiju u kasnu log fazu određuje se OD (od *engl. Optical Density*, optička gustoća) kulture na 600 nm te se dobivena vrijednost množi s ukupnim volumenom kulture u mL kako bi se izračunala ukupna optička gustoća. Količina reagensa prilagođava se ukupnom OD-u. Kada su se stanice kvasca uzgojile, slijedi centrifugiranje kulture kvasca na 3000 okr/min u trajanju od 5 minuta. Supernatant se odbacuje, a stanični se talog ispire resuspendiranjem u dva volumena ultračiste vode. Zatim se talog resuspendira u 1 mL pufera A koji sadrži 10 mM svježeg DTT-a, inkubira se deset minuta na temperaturi od 30°C uz lagano mućkanje, a onda centrifugira na 1500 okr/min pet minuta i supernatant se odbaci. Dobiveni talog se ponovno suspendira u 1 mL pufera B koji sadrži mješavinu enzima za razgradnju stanične stijenke, te se inkubira oko sat vremena na 30°C . Povremeno se provjerava stvaranje sferoplasta praćenjem prozirnosti otopine. Kada se sferoplasti učinkovito formiraju, centrifugiraju se pri 1500 okr/min pet minuta, a supernatant se odbacuje. Od tog trenutka,

eprovete za centrifugiranje i sav pribor drže se na ledu. Dobiveni pelet se ponovno suspendira u 1 mL pufera za homogenizaciju s koktelom inhibitora proteaza. Suspenzija se prenese u Dounce homogenizator i homogenizira 10-15 puta. Zatim se centrifugira pri 600 okr/min pet minuta na 4 °C, nakon čega se supernatant, koji sadrži mitohondrije, sakupi. Supernatant se ponovno centrifugira pri 600 okr/min pet minuta na 4 °C i supernatant se sakupi. Postupak se ponovi još jednom. Skupljeni supernatant se centrifugira pri 12000 okr/min deset minuta na 4 °C, a supernatant se pažljivo odbacuje bez dodirivanja peleta. Dobiveni talog se ponovno suspendira u 50 µL pufera za pohranu. U toj otopini se određuje koncentracija proteina i prilagođava na željenu vrijednost pomoću pufera za pohranu. Uvjeti skladištenja izoliranih mitohondrija variraju ovisno o namjeni uzoraka. Mitohondriji se resuspendiraju u puferu za pohranu, brzo zamrznu u tekućem dušiku, a zatim čuvaju na -80°C. (38)

3.2.6. Izolacija proteina i određivanje količine proteina u mitohondrijskoj frakciji

Kako bi se ekstrahirali proteini, na dobiveni talog izoliranog mitohondrija potrebno je dodati 2 mL acetona. Postupak ekstrakcije proteina odvija se preko noći na hladnom. Zatim slijedi centrifugiranje uzorka na 3000 okr/min te otapanje dobivenog taloga u 25 µL otopine sačinjene od 5M uree u 50 mM amonijevom bikarbonatu. U uzorcima je određena količina proteina, metodom po Bradfordu te se u LC/MS analizi uvijek koristi ista količina proteina po svakom analiziranom uzorku kako bi oni bili međusobno usporedivi. Nakon toga, takav uzorak spreman je za LC/MS analizu.

3.2.7. Analiza i identifikacija proteina mitohondrija LC/MS metodom

Tekućinska kromatografija svoju namjenu pronalazi u razdvajanju širokog raspona molekula poput polimera, malih molekula farmaceutika ili njihovih metabolita, ali i peptida i proteina. Spektrometrija masa ima niz raznih primjena bez kojih su istraživanja na području proteina nezamisliva. Sama proteomika se danas najvećim dijelom zasniva ili na samoj spektrometriji masa ili pak na vezanim sustavima tekućinskog kromatografa i spektrometra masa. (39)

Analiza uzoraka sproveda se na institutu „Ruđer Bošković“ u Zagrebu pomoću spektrometra masa visoke rezolucije ESI-Q-TOF Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA, SAD) koji je vezan s tekućinskim kromatografom nanoACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, SAD). Primjenom software-a MassLynx verzije 4.1. SCN902 (Waters, Milford, MA, SAD) podešeni su instrumentalni parametri. Analitičkom kolonom nanoAcquity UPLC 1,7 µm BEH130 C18, 100 µm × 100 mm (Waters, Milford, MA, SAD) uz upotrebu pretkolone UPLC 2G-V/M Trap 5 µm

Symmetry C18, 180 μm \times 20 mm (Waters, Milford, MA, SAD) odvojeni su peptidi. Injektirano je 1 μL uzorka (razrijeđenog da sadrži istu početnu količinu proteina). Svaki je uzorak injektiran tri puta (u tri neovisna mjerenja). Gradijentno eluiranje korišteno je za optimalno razdvajanje triptičkih peptida kromatografijom obrnutih faza.

Ionizacija elektroraspršenjem (ESI) može biti pozitivna i negativna ovisno o naponu na kapilari i kolektorskoj elektrodi (38). U ovom slučaju, bila je pozitivna, a napon kapilare iznosio je 4,3 kV, dok je napon elektrode u koju ulazi ionizirani uzorak bio 40 V. Temperatura izvora iznosila je 80 °C, a tlak dušika 1,4 bara. Spektri peptidnih uzoraka prikupljeni su korištenjem MSE pristupa pri niskoj i visokoj energiji. Kod konstantne kolizijske energije od 4 eV prikupljeni su podaci, u uvjetima niske energije, dok je pak u uvjetima visoke energije kolizijska energija linearno podizana od 20 do 45 eV. Svake su sekunde, u području masa od 50 do 3200 Da, sakupljeni podaci. Konstantan protok leucin-enkefalina (1 ng/ μL , protok 0,4 $\mu\text{L}/\text{min}$, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 556,2771$ Da) korišten je za vrijeme analize uzoraka s ciljem korigiranja točnosti masa..

LC/MS analizama obično se dobije velika količina podataka koju je potrebno sistematično obraditi. Za obradu prikupljenih podataka uz postojeći software MassLynx verzije 4.1., korišteni su i Perseus (Perseus_Tutorial (hanruizhang.github.io)) i String baza podataka (STRING: functional protein association networks (string-db.org)).

3.2.8. Utvrđivanje interakcija među proteinima pomoću baze String

String (*engl. Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*), mrežna je biološka baza podataka te dobar alat kojim se utvrđuje povezanost i međudjelovanje identificiranih proteina. Poznavanje i shvaćanje interakcija među proteinima glavna je značajka u sistemskom razumijevanju staničnih procesa.

Opseg protein–proteinskih veza u Stringu je funkcionalna asocijacija. Postojanje dokaza koji upućuju na razvijen, specifičan funkcionalni odnos između njih, čine proteine povezanimi. To uključuje proteine koji su fizički povezani jedni s drugima u kompleksu proteina ili su samo u prolaznoj interakciji, ali isto tako i one proteine koji su neizravno povezani, odnosno one koji primjerice mogu raditi prema zajedničkom cilju u metaboličkom ili signalnom putu, mogu regulirati jedni druge preko posrednika ili pak kolektivno doprinosti zajedničkoj staničnoj strukturi. (40)

Strukturalna, funkcionalna i evolucijska svojstva proteina objedinjena su u ovoj bazi podataka. Integracija Stringa s raznim bazama podataka pruža mnoge prednosti, dok je međusobno djelovanje proteina vidljivo na nivou dokaznosti, pouzdanosti i molekularnim interakcijama.

Proteini su identificirani metodom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa. Uz pomoć Stringa proteini se sistematiziraju prema obavljanju određene funkcije u organizmu. Pristupanjem ovoj bazi podataka, u tražilici se odabere opcija za unos većeg broja proteina, odabere se organizam, u ovom istraživanju kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, te se pretražuje. Tada se prvo pojavi naziv i opis pojedinog proteina, a onda i shema koja prikazuje povezanost ovih proteina, dok sama boja linije prikazuje djelovanje jednog proteina na drugi, bilo da je riječ o aktivaciji, inhibiciji ili pak katalizi. Također, String pruža mogućnost odabira modelnog organizma za analizu proteinskih interakcija, što povećava koherentnost i vjerodostojnost dobivenih podataka.

3.2.9. ICP-MS

U iscrpini metalnih iona iz ortodontskog aparatića (kojeg čini 4 prstena, 2 luka, 20 ligatura i 20 bravica) u kvašćevu podlogu određen je sadržaj i sastav metalnih iona. Sama kvašćeva podloga služila je kao kontrolni uzorak.

1 mL svakog eluata pomiješan je s 1 mL koncentrirane HNO₃ (Suprapure, Merck KGaA, Njemačka) i zagrijan na 80°C (15 min). Zatim se razrijedi do 10 mL destiliranom vodom. ICP-MS sustavom 2030 (Shimadzu, Japan) analizirani su pripremljeni uzorci na 15 elemenata (As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, V, Zn). Poliatomske smetnje su minimizirane načinom sudara. Helij (6 mL/min) i argon (8 mL/min) (Air Products, Toruń, Poljska) poslužili su kao kolizijska ćelija odnosno plazma plin. Snaga radiofrekvencije postavljena je na 1,2 kW, a napon kolizijske ćelije na -21 V. Granicom detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) (izražena kao $3 \times$ i $10 \times$ standardna devijacija) i drugim validacijskim parametrima ocjenjena je analitička metoda. Kalibracijski pravci pripremljeni su od razrijeđenog anorganskog standarda za kontrolu kvalitete (IQC-019, Ultra Scientific, North Kingstown, RI, SAD) u 1% HNO₃ (Suprapure, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka). Otopina platine od 10 ppb korištena je kao interni standard. I otopine za razrjeđivanje i interni standard korišteni su za korekciju učinaka matrice i pomaka signala. Koeficijenti korelacije za sve kalibracijske pravce bili su iznad 0,998, a LOQ-ovi bili su vrlo niski, ali pozadinske ekvivalentne koncentracije (BEC) za kadmij, bakar, olovo i cink nameću radni raspon veći od nekoliko µg/L (zbog laboratorijskih uvjeta).

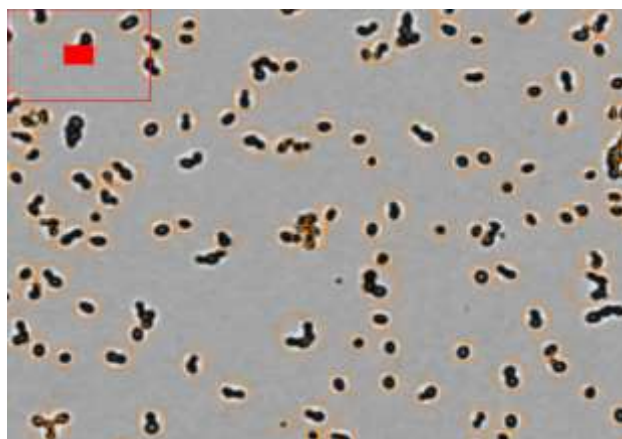
4. Rezultati

4.1. Određivanje vitalnosti kvasca Luna brojačem stanica

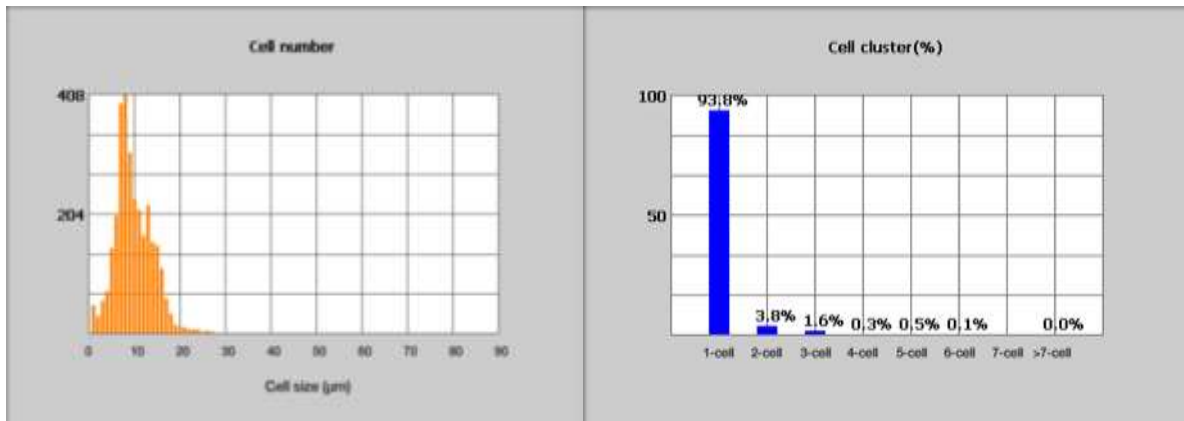
Luna brojačem stanica mjeren je broj i veličina stanica na početku i na kraju pokusa u kontrolnom i tretiranom uzorku (tretmanu od 14 dana). Početak pokusa postavljen je na otprilike 6×10^6 stanica/mL. Tablicom 1 prikazan je broj i veličina stanica na početku pokusa, dok su u Tablici 2 ti podaci na kraju pokusa. Slikama 6, 8 i 10 vizualno je popraćen broj stanica, dok su histogramima 7, 9 i 11 opisani veličina i način rasta stanica (pojedinačno ili u nakupinama), za podatke prikazane u Tablici 1 i 2.

Tablica 1. Broj stanica kvasca u kontroli i uzorku tretman 14 dana na početku pokusa.

Početak pokusa:	KONTROLA	14 DANA
Broj stanica	$5,59 \times 10^6$ stanica/mL	$6,52 \times 10^6$ stanica/mL
Veličina stanica (μm)	11,4	10,4



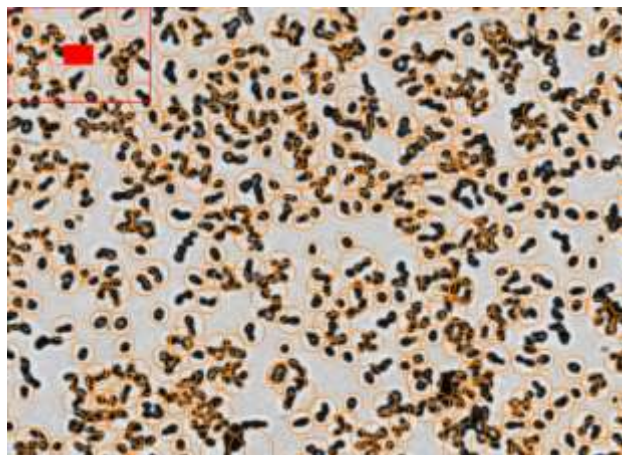
Slika 6. Prebrojane stanice vidljive na uređaju LUNA u kontroli na početku pokusa.



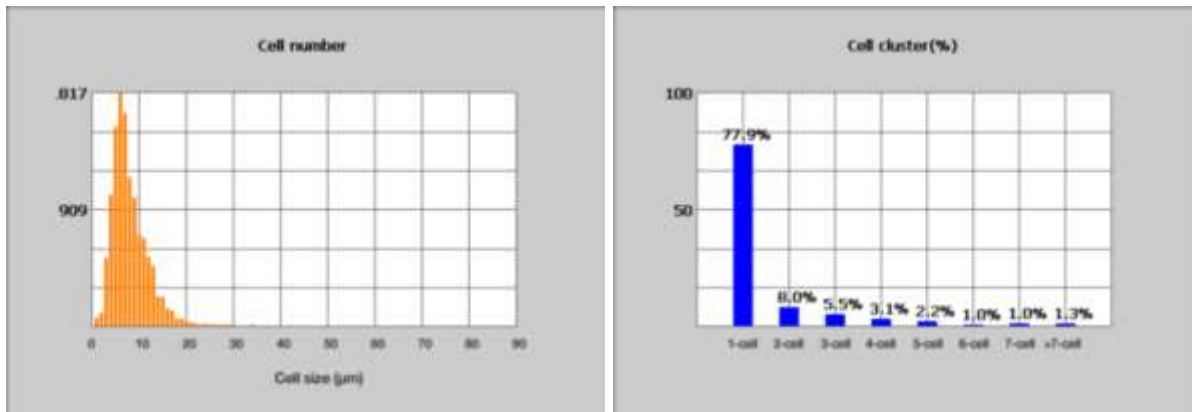
Slika 7. Histogram veličine stanica (lijevo) te zastupljenost stanica kvasca koje rastu pojedinačno, kao dvostruke, trostruke, četverostruke, peterostruke te kao šesterostruke stanice na početku uzgoja (desno).

Tablica 2. Broj stanica kvasca u kontroli i uzorku tretman 14 dana na kraju pokusa.

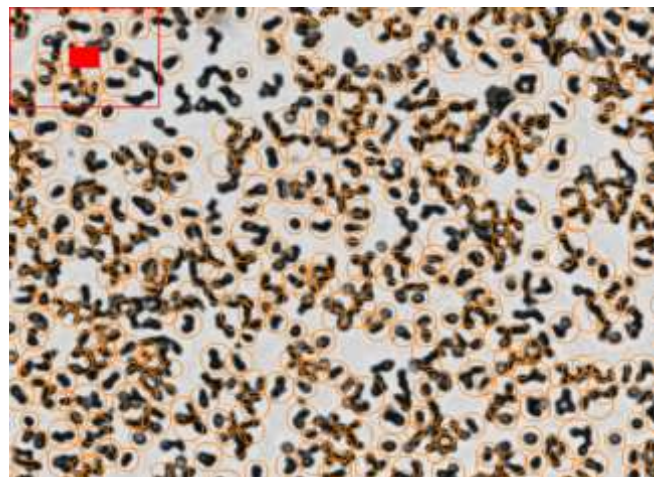
Kraj pokusa:	KONTROLA	14 DANA
Broj stanica	$2,62 \times 10^7$ stanica/mL	$2,51 \times 10^7$ stanica/mL
Veličina stanica (μm)	8,6	9,4



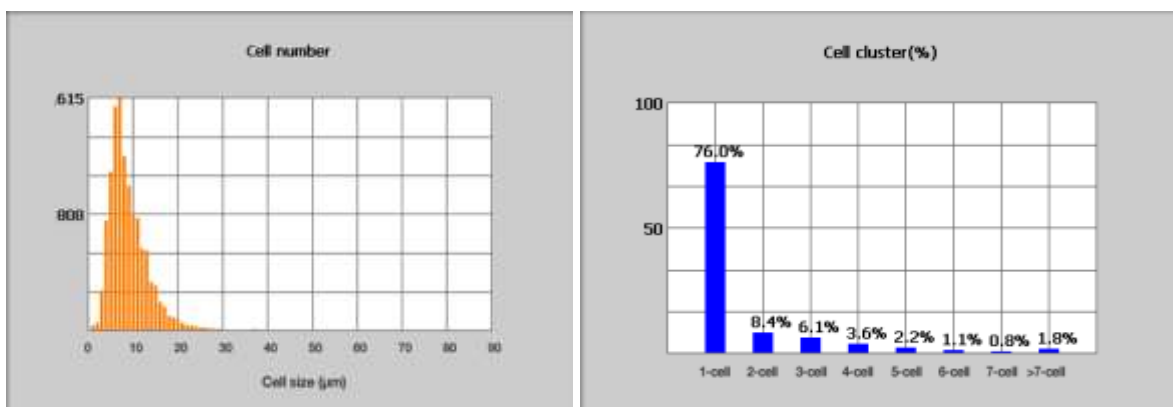
Slika 8. Prebrojane stanice na uređaju LUNA vidljive u kontroli na kraju pokusa.



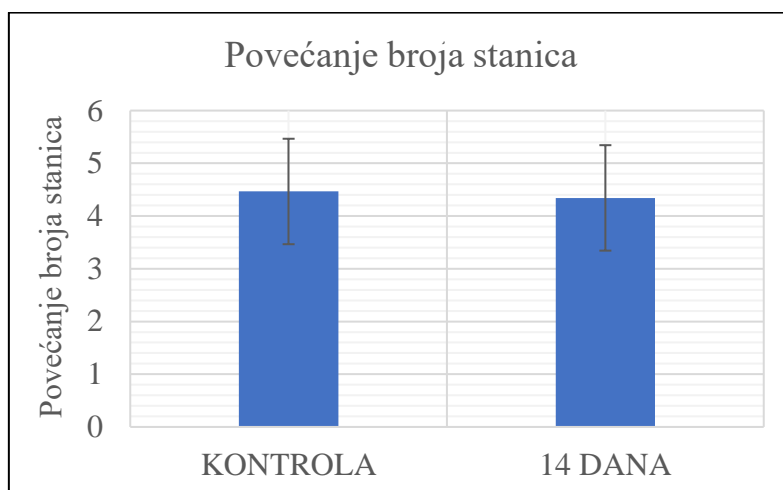
Slika 9. Histogram veličine stanica (lijevo) te zastupljenost stanica kvasca koje rastu pojedinačno, kao dvostruke, trostruke, četverostruke, peterostruke, šesterostruke, sedmerostruke te kao stanice u nakupinama na kraju uzgoja u kontroli (desno).



Slika 10. Prebrojane stanice na uređaju LUNA vidljive u uzorku tretman 14 dana na kraju pokusa.



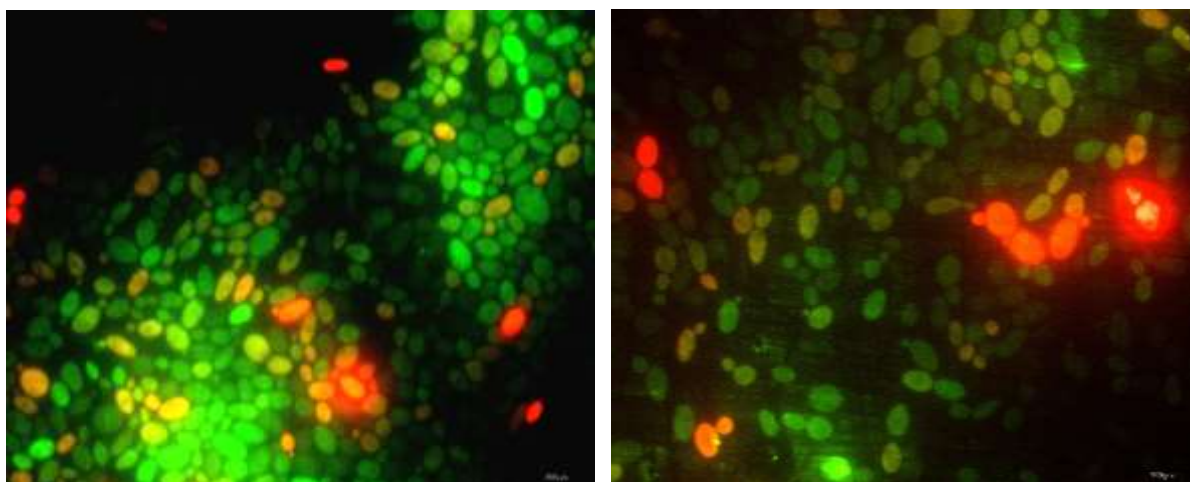
Slika 11. Histogram veličine stanica (lijevo) te zastupljenost stanica kvasca koje rastu pojedinačno, kao dvostruke, trostruke, četverostruke, peterostruke, šesterostruke, sedmerostruke te kao stanice u nakupinama na kraju uzgoja u uzorku tretman 14 dana (desno).



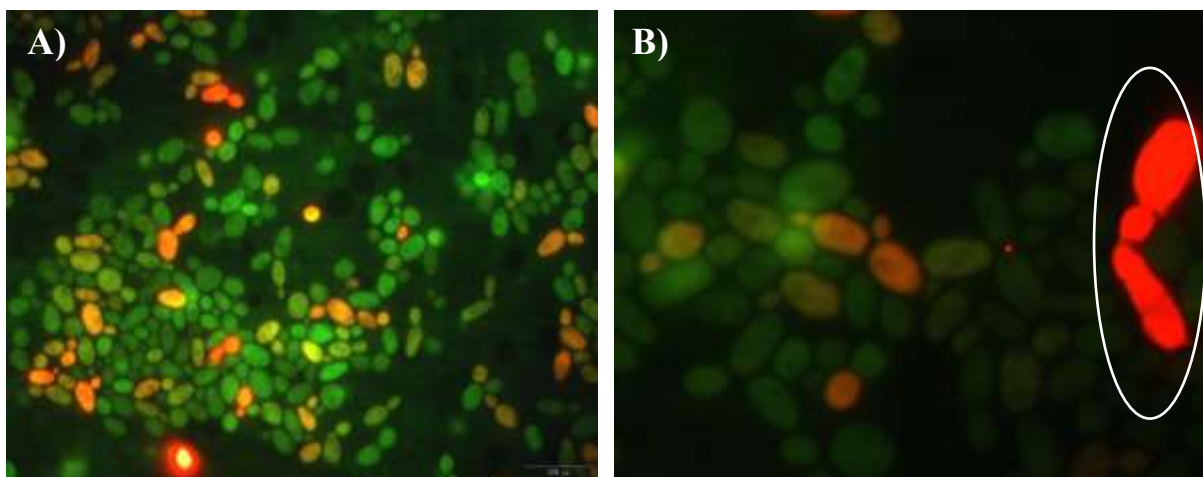
Slika 12. Grafički prikaz povećanja broja stanica u kontroli i uzorku tretman 14 dana.

4.2. Određivanje vitalnosti AO/PI bojanjem

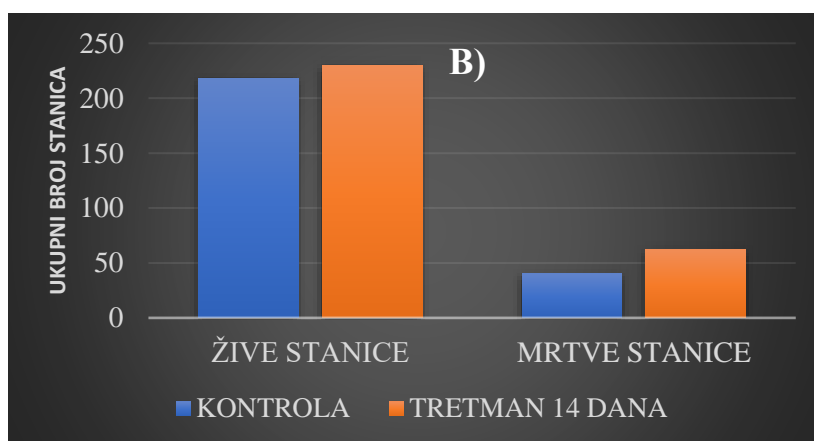
AO/PI bojanjem određivana je vitalnost kvasca uspoređujući kontrolni i tretirani uzorak. Stanice netretiranog kvasca obojane AO/PI bojom prikazane su Slikom 13, dok su one u kontroli prikazane Slikom 14. Grafički prikaz broja živih stanica (zeleno obojanih) i mrtvih ili metabolički promjenjenih i oštećenih stanica, obojanih crveno, za tretirani i netretirani uzorak prikazan je Slikom 15.



Slika 13. Stanice kvasca obojane AO/PI bojom u kontrolnom uzorku, P=400x.



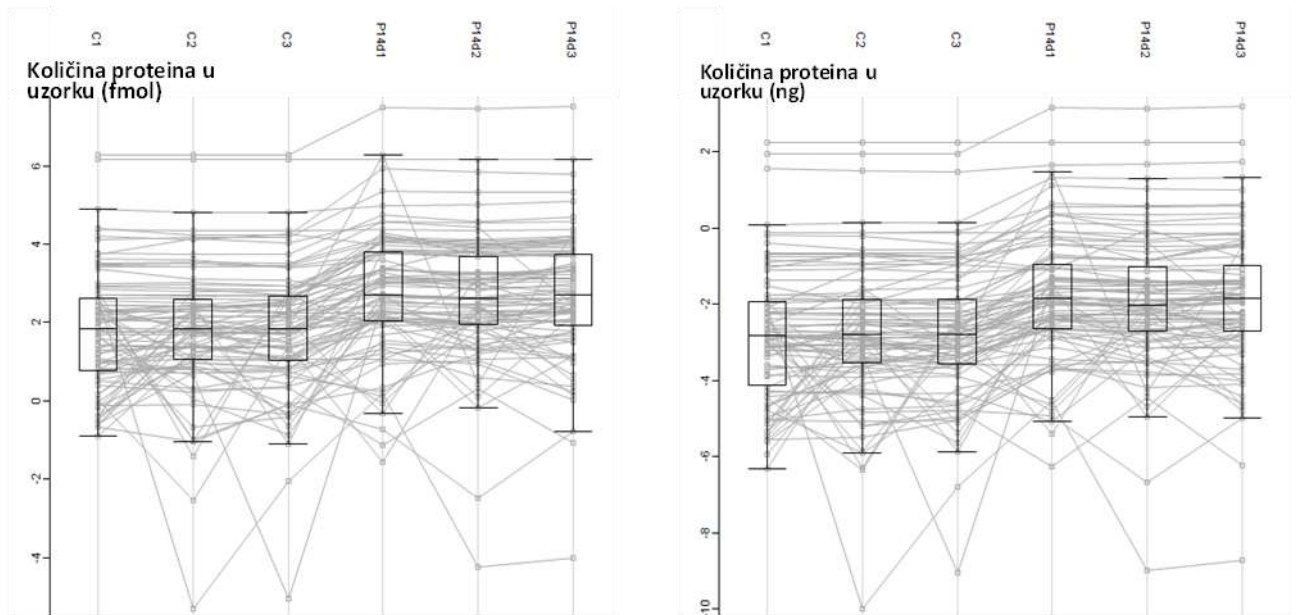
Slika 14. Stanice kvasca obojane AO/PI bojom u uzorku nakon tretmana od 14 dana A) P=400x, te B) P=1000x.



Slika 15. Zastupljenost mrtvih i živih stanica kvasca u kontrolnom uzorku te nakon tretmana od 14 dana.

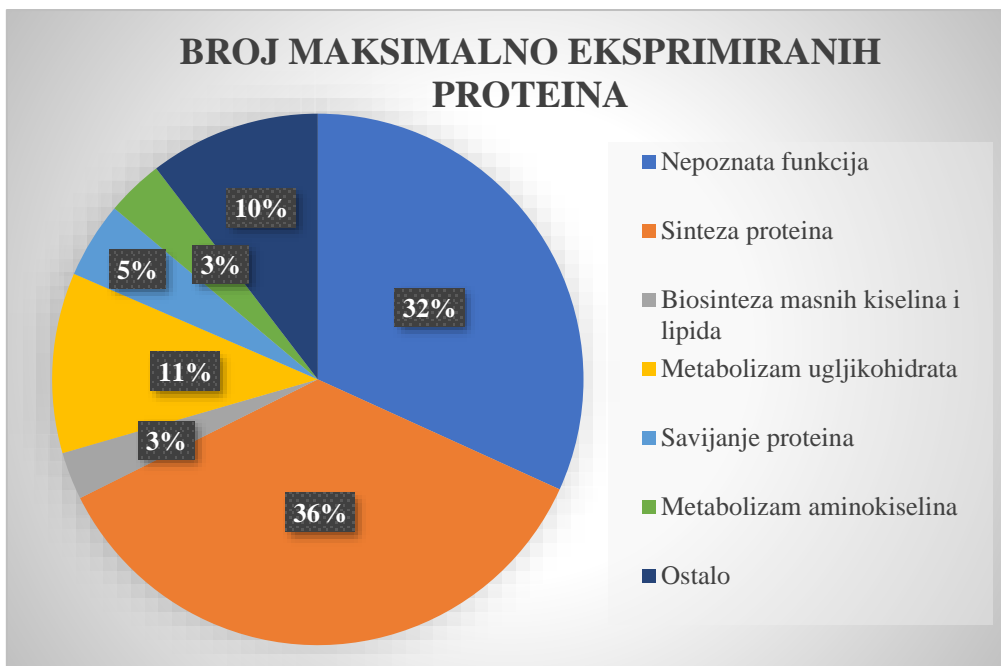
4.3. Proteini mitohondrija

Svaki je uzorak proteina mitohondrija određivan u triplicatu. Slikom 16 prikazane su dobivene vrijednosti proteina u svakom određivanju (izražene kao količina tvari (fmol) ili masa (ng) po svakom ubačenom μL uzorka).



Slika 16. Koncentracija proteina u uzorcima kontrole i u tretiranim uzorcima, izražene množinskom ($\text{fmol}/\mu\text{L}$, lijevi dijagram) odnosno masenom koncentracijom ($\text{ng}/\mu\text{L}$, desni dijagram).

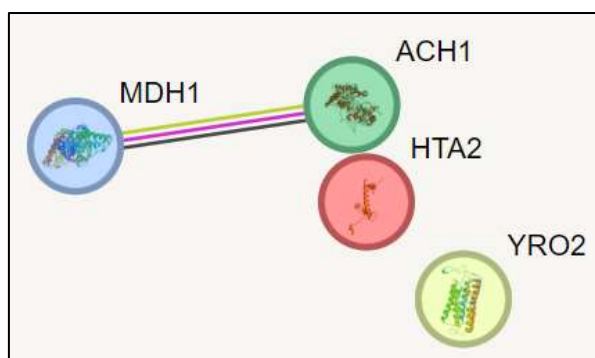
U ovom istraživanju LC/MS metodom identificirano je nešto više proteina u kontrolnim, netretiranim uzorcima, nego u tretiranim uzorcima, no u interpretaciji podataka iskoristili smo mogućnost koju pruža software MassLynx verzije 4.1 te koristili „preklopljene“ rezultate od ukupno 284 zajedničkih proteina. U svim prikazanim tablicama (Tablica 3. – 5.), uz puni naziv, navedena je i funkcija u kojem svaki od tih proteina sudjeluje (bilo da je dio nekog metaboličkog puta, ili ima regulacijsku funkciju, ili pak transportersku funkciju ili sl.). Slika 17. prikazuje distribuciju maksimalno eksprimiranih proteina prema skupinama, dok je u popis svih 171 proteina prikazan u Tablici u dodatku diplomskom radu. Tablica 3 prikazuje proteine sa smanjenom ekspresijom, u Tablici 4 su proteini koji se javljaju samo u mitohondrijima tretiranog uzorka, a u Tablici 5, proteini mitohondrija netretiranog, kontrolnog kvasca. Popratni String prikaz povezanosti proteina sa smanjenom ekspresijom prikazuje slika 18, za proteine mitohondrija tretiranog uzorka Slika 19, a za kontrolni uzorak Slika 20.



Slika 17. Udio identificiranih maksimalno ekspimiranih proteina prema skupinama (proteini koji sudjeluju u procesima sinteze proteina, metabolizmu ugljikohidrata, biosintezi masnih kiselina i lipida, savijanju proteina, metabolizmu aminokiselina, u nekim drugim procesima, ali i proteini nepoznate funkcije).

Tablica 3. Proteini sa smanjenom ekspresijom.

PROTEINI:	NAZIV:	FUNKCIJA:
1) P32316	Acetil-CoA hidrolaza	Metabolizam
2) P04912	Histon H2A	Regulacija transkripcije, popravak i replikacija DNA
3) P38079	Protein s pretpostavljenom ulogom u odgovoru na kiselinski stres	Protein nepoznate funkcije
4) P17505	Mitohondrijska malat dehidrogenaza	TCA ciklus



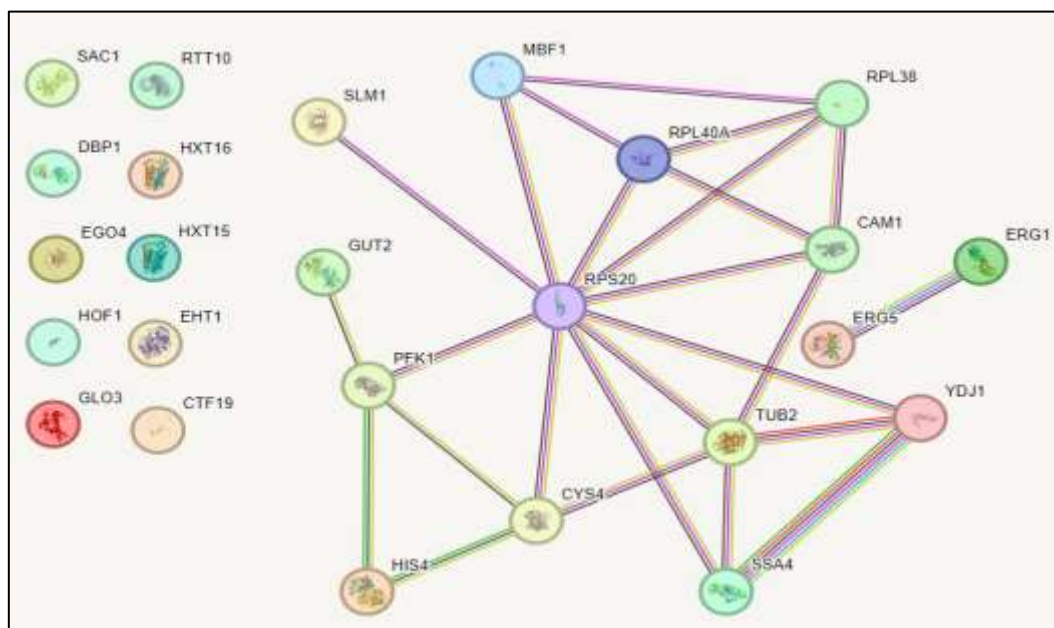
Slika 18. Proteini sa smanjenom ekspresijom te njihova povezanost.

Tablica 4. Proteini ekspimirani samo u mitohondrijima tretiranog kvasca.

PROTEINI:	NAZIV:	FUNKCIJA:
1) P00815	Trifunkcionalni protein biosinteze histidina	Biosinteza histidina
2) P0CH09	L40B fuzijski protein ubikvitin-ribosomske 60S podjedinice	Biogeneza ribosoma
3) P0CH08	Ubikvitin-ribosomski 60S podjedinica protein L40A fuzijski protein	Biogeneza ribosoma
4) P54854	Heksozni transporter HXT15	Metabolizam šećera
5) P32368	Fosfoinozidit fosfataza SAC1	Promet proteina, biosinteza sfingolipida
6) P38295	Acil-koenzim A: etanol O-aciltransferaza	Biosinteza masnih kiselina srednjeg lanca
7) P54781	Citokrom P450 61	Biosinteza ergosterola
8) P38682	ADP-ribozilacijski čimbenik GTPaze aktivirajući protein	Transport ER - Golgi
9) P47185	Transporter heksoze HXT16	Metabolizam šećera
10) P25491	Uvozni protein mitohondrijskog proteina MAS5	Savijanje proteina
11) Q02732	Podjedinica unutarnjeg kinetohora CTF19	Segregacija kromosoma
12) P38701	Proteinska komponenta male (40S) ribosomske podjedinice	Translacija

13) Q05080	Protein citokineze 2	Citokineza
14) P40485	Fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat-vezujući protein SLM1	Organizacija i biogeneza aktinskog citoskeleta
15) P24784	Pretpostavljena ATP-ovisna RNA helikaza iz obitelji DEAD-box proteina	Translacija
16) O14467	Multiproteinski prenosni faktor 1	Transkripcija
17) P0C2J3	Transpozon Ty2-LR1 Gag-Pol poliprotein	Još nije dovoljno poznata njihova funkcija
18) P32191	Mitohondrijska glicerol-3-fosfat dehidrogenaza	Metabolizam glicerola, oksidacija NADH
19) P32582	Cistationin beta-sintaza	Biosinteza cisteina
20) P25384	Transpozon Ty2-C Gag-Pol poliprotein	Još nije dovoljno poznata njihova funkcija
21) P16861	Alfa podjedinica heterooktamerne fosfofruktokinaze	Glikoliza
22) P49167	Protein L38 podjedinice ribosoma 60S	Translacija
23) P0CX64	Transpozon Ty2-GR2 Gag-Pol poliprotein	Još nije dovoljno poznata njihova funkcija
24) P0CX63	Transpozon Ty2-F Gag-Pol poliprotein	Još nije dovoljno poznata njihova funkcija
25) P22202	Protein toplinskog šoka koji je jako izazvan stresom	Savijanje proteina
26) Q12491	Transpozon Ty2-B Gag-Pol poliprotein	Još nije dovoljno poznata njihova funkcija
27) Q08924	Regulator Ty1 transpozicijskog proteina 10	Metilacija riboze
28) Q3E841	Neokarakterizirani protein YNR034W-A	Protein nepoznate funkcije
29) P32476	Skvalen epoksidaza	Biosinteza ergosterola
30) P02557	β -tubulin	Organizacija citoplazmatskih mikrotubula

31) P29547	Faktor istežanja 1-gama 1	Transkripcija
------------	---------------------------	---------------



Slika 19. Povezanost proteina eksprimiranih samo u mitohondrijima tretiranog uzorka.

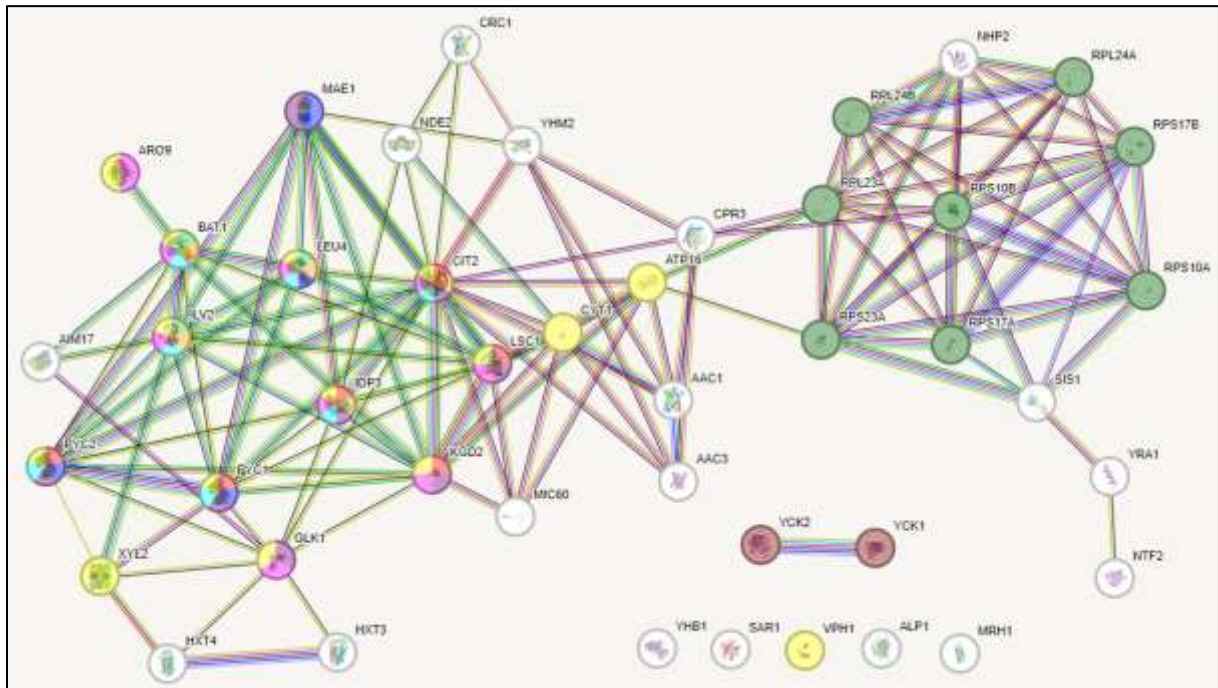
Tablica 5. Proteini eksprimirani samo u mitohondrijima netretiranog uzorka.

PROTEINI:	NAZIV:	FUNKCIJA:
1) Q04214	Transpozon Ty1-MR1 Gag-Pol poliprotein	Još nije dovoljno poznata njihova funkcija
2) P07342	Acetolaktat sintaza	Biosinteza leucina i valina
3) Q08745	Proteinska komponenta male ribosomske podjedinice	Sinteza proteina
4) P14127	Proteinska komponenta male ribosomske podjedinice	Sinteza proteina
5) P32327	Izoforma piruvat karboksilaze	Glukoneogeneza
6) P17709	Glukokinaza-1	Metabolizam glukoze
7) Q12289	Prijenosnik karnitina unutarnje membrane mitohondrija	Beta oksidacija masnih kiselina
8) P02407	Ribosomski protein 51 male podjedinice	Sinteza proteina
9) Q07993	D-ksiluloza reduktaza	Biosinteza ksiluloze

10) P20606	ARF obitelj GTPaze	Unutarstanični transport proteina
11) P33331	Nuklearni transportni faktor 2	Transport proteina
12) P39676	Dušikov oksid oksidoreduktaza	Oksidativni i nitrozativni stres
13) P06208	Alfa-izopropilmalat sintaza	Biosinteza leucina
14) Q04013	Proteinski nosač citrata i oksoglutarata	TCA ciklus
15) P36112	Komponenta MICOS kompleksa	Uvoz proteina
16) P04449	Protein L24A ribosomske 60S podjedinice	Sinteza proteina
17) P08679	Citrat sintaza	Gliksilatni ciklus
18) P23292	Palmitoilirana izoforma kazein kinaze I	Metabolizam glukoze
19) P23291	Palmitoilirana izoforma kazein kinaze I	Metabolizam glukoze
20) P53598	Alfa podjedinica sukcinil-CoA ligaze	TCA ciklus
21) P24000	Protein L24B ribosomske 60S podjedinice	Sinteza proteina
22) P38971	Osnovna permeaza aminokiselina	Sinteza proteina
23) P53982	Peroksisomska NADP-ovisna izocitrat dehidrogenaza	TCA ciklus
24) P18238	ADP, ATP protein nosač 3	Transport hema
25) P46784	Proteinska komponenta male ribosomske podjedinice	Sinteza proteina
26) P32563	Podjedinica a vakuolarne ATPaze V0 domene	Metabolizam polifosfata
27) Q12165	Delta podjedinica ATP sintaze	Sinteza ATP-a
28) P19262	Komponenta 2-oksoglutarat dehidrogenaze	TCA ciklus
29) P11154	Izoforma piruvat karboksilaze	Glukoneogeneza

30) Q12159	Nuklearni poliadenilirani RNA-vezujući protein	Transkripcija
31) P38891	Aminotransferaza razgranatog lanca	Biosinteza BCAA
32) P07143	Citokrom c1	Respiratorni lanac
33) P36013	Mitohondrijski jabučni enzim	TCA ciklus
34) Q07500	Vanjska NADH-ubikinon oksidoreduktaza 2	Oksidacija NADH
35) P32495	Podjedinica H/ACA ribonukleoproteinskog kompleksa NHP2	Biogeneza ribosoma
36) Q12490	Transpozon Ty1-BL Gag-Pol poliprotein	Još nije dovoljno poznata njihova funkcija
37) P0CX42	Protein L23A ribosomske 60S podjedinice	Sinteza proteina
38) P0CX41	Protein L23B ribosomske 60S podjedinice	Sinteza proteina
39) P23180	Vjerojatna oksidoreduktaza AIM17	Protein nepoznate funkcije
40) Q99337	Transpozon Ty1-NL2 Gag-Pol poliprotein	Još nije dovoljno poznata njihova funkcija
41) P25294	Protein SIS1	Sinteza proteina
42) P0CX30	Ribosomski protein 28 male ribosomske podjedinice	Sinteza proteina
43) Q12117	Protein MRH1	Protein nepoznate funkcije
44) Q12470	Transpozon Ty1-NL2 Gag poliprotein	Još nije dovoljno poznata njihova funkcija
45) P0CX29	Ribosomski protein 28 male ribosomske podjedinice	Sinteza proteina
46) P04710	ADP, ATP protein nosač 1	Transmembranski transport
47) P25719	Mitohondrijska peptidil-prolil cis-trans izomeraza	Apoptoza
48) P32467	Transporter glukoze visokog afiniteta	Metabolizam šećera

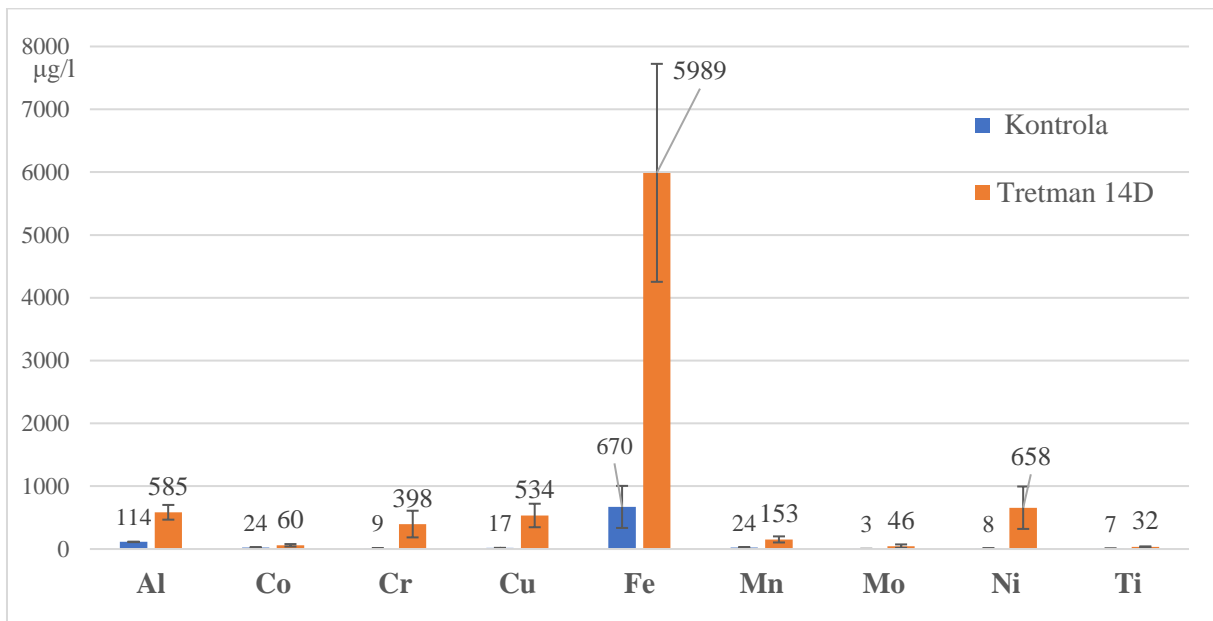
49) P32466	Prijenosnik glukoze niskog afiniteta	Metabolizam šećera
50) P38840	Aromatska aminotransferaza II	Biosinteza aminokiselina



Slika 20. Identificirani proteini eksprimirani samo u mitohondrijima netretiranog uzorka prikazani korištenjem baze podataka String.

4.4. ICP-MS analiza iscrpina metalnih iona u YPD podlogu

ICP-MS metodom analiziran je sadržaj i sastav metalnih iona prisutnih u kvaščevoj podlozi u koju su se dijelovi ortodontskog aparatića u simuliranim uvjetima usne šupljine eluirali 14 dana pri pH 5.5. Grafički prikaz sadržaja i sastava određenih metalnih iona u tretiranoj podlozi, uspoređen sa sadržajem i sastavom u netretiranoj kvaščevoj podlozi prikazan je Slikom 21.



Slika 21. Usporedba sadržaja i sastava metalnih iona u iscrpinama metalnih iona u podlogu za uzgoj kvasca u tretiranom uzorku (tretman od 14 dana) i u kontroli (netretiranom uzorku).

5. Rasprava

Kvasac kao modelni organizam jako je svestran, a opet jako jednostavan za uzgoj i manipulaciju (25, 27-29). I vrlo jednostavnim metodama, poput praćenja rasta, bilo broja stanica, veličine stanica ili načina rasta kao takvog (jesu li stanice pojedinačne ili u nekim vrstama manjih ili većih nakupina) mogu se dobiti jako korisne informacije o učincima/toksičnosti nekih agenasa na stanicu. U ovom smo se istraživanju koristili brojačem stanica Luna koji nam daje upravo te podatke (broj, veličina, način rasta). Broj stanica mjeren na aparatu LUNA na početku pokusa u kontroli iznosio je $5,59 \times 10^6$ stanica/mL, a u 14 dana $6,52 \times 10^6$ stanica/mL. Na kraju pokusa broj stanica u kontroli iznosio je $2,62 \times 10^7$ stanica/mL, a slično u uzorku tretman 14 dana $2,51 \times 10^7$ stanica/mL. Histogramom veličine stanica te načinom kako one rastu (Slike 7 – 12), jasno se vidi smanjenje stanica koje rastu pojedinačno, a povećanje onih koje rastu kao dvostruke, trostruke, četverostruke, peterostruke, šesterostruke, sedmerostruke te stanica koje rastu u nakupinama.

Iz navedenog se može zaključiti kako se broj stanica povećao za oko 4,4 puta, slično u tretiranom kao i kontrolnom uzorku (Slika 12). Prema Pearce i Shermanu, inhibicija rasta kvasca *Saccharomyces cerevisiae* bakrom i drugim metalnim solima ovisi o pH (35). pH 5,5 koji je korišten u ovom istraživanju odabran je s ciljem kako bi omogućio rast kvasca na podlozi s dosta metalnih iona (koji su prisutni i dokazani u podlozi s eluiranim metalnim ionima) te on metalne ione prisutne u podlozi ne raspoznaje kao toksične. Isto tako, slična prosječna veličina stanica na početku nije se značajno razlikovala nakon rasta na podlogama, $8,6 \mu\text{m}$ u kontrolnom uzorku te $9,4 \mu\text{m}$ u tretiranom uzorku. Također, na početku pokusa, i u kontrolnom i tretiranom uzorku bio je veći postotak onih stanica koji rastu pojedinačno, dok se na kraju taj broj smanjio. Na kraju pokusa povećao se broj stanica koje rastu kao dvostruke, trostruke ili u nakupinama. Znači, kvasac rastao na podlozi s eluiranim metalnim ionima nije se ni po broju, a ni po načinu rasta razlikovao od kvasca koji je rastao na podlozi bez tih iona.

No, uspoređujući stanice kvasca obojane AO/PI bojama ipak postoji razlika onih u kontrolnom te tretiranom uzorku od 14 dana. U kontroli, mogu se uočiti žive stanice kvasca i pokoja mrtva, odnosno stanice se nalaze u svim staničnim fazama. U kontroli na slici 13 pod A) izbrojano je 218 živih stanica, tj. onih koje su obojane zelenom bojom te 40 mrtvih stanica. Nakon tretmana od 14 dana, (slika 14 pod A) broj mrtvih stanica se povećao u odnosu na kontrolu te on iznosi 62, dok je pak živih stanica 230. Nakon tretmana od 14 dana (slika 14 pod B) može se primijetiti više oštećenih stanica. Slikom 15 upravo je i prikazano kako se nakon tretmana od 14 dana povećao broj mrtvih stanica u odnosu na kontrolni uzorak. Odnosno, broj mrtvih stanica u

kontrolnom uzorku iznosi 15,5%, dok u tretiranom uzorku on iznosi 21,2% u odnosu prema ukupnom broju stanica. Važno je naglasiti kako se u tretiranom uzorku u odnosu na kontrolni uzorak promijenio sam izgled i oblik crvenih stanica. Među crveno obojanim stanicama, znači metabolički poremećenim stanicama ima razlika – neke su veće od drugih, u nekima se pojavljuju crvene nakupine, fragmentacija staničnog sadržaja je više ili manje izražena, intenzitet boje nije isti i sl. Vrijedi istaknuti crvene, posebno velike stanice (zaokružene na slici 14 pod B) – to je stanica koja je gotovo pred puknućem, odnosno nekako metabolički poremećena stanica. Prema Trumpu i suradnika nekoliko je mehanizama programirane stanične smrti. Apoptoza, morfološki je različit mehanizam programirane stanične smrti koji uključuje aktivaciju staničnog intrinzičnog programa samoubojstva te je poznato da glavnu ulogu ima tijekom razvoja, u homeostazi i procesu bolesti. (41, 42) Različita okruženja potiču stvaranje apoptoze. Često je prisutna tijekom razvoja te u toj situaciji predstavlja preletalnu fazu programirane reakcije na ozljedu prema rasporedu koji određuju hormonski te čimbenici makro i mikrokoliša. Može se reći da se apoptoza javlja poput obrambenog mehanizma, primjerice kad su stanice oštećene bolešću ili nekim drugim štetnim agensima. Općenito se u apoptozi stanice skupljaju, pokazuju višestruke citoplazmatske izbočine ili mjehuriće, izraženu kondenzaciju kromatina te naposljetku fragmentaciju. Također, ono što je izraženo na slici 14 pod B), jedan uobičajeni preletalni tip reakcije uključuje bubrenje stanica prije smrti. Provedenim istraživanjem Trumpa i suradnika, elektronskom mikroskopijom su uvidjeli kako je tijekom apoptoze citosol gust, endoplazmatski retikulum može biti proširen, mitohondriji su kondenzirani i postoji izrazito nakupljanje jezgrinog kromatina, dok obris same jezgre postaje poprilično nepravilan s višestrukim izbočinama, za koje se najčešće smatra da su se odvojile, no ipak su povezane glavnom nukleoplazmom. (42)

Rezultati LC/MS analize pokazuju da je rast na podlozi s eluiranim metalnim ionima djelovao na ukupnu količinu sintetiziranih proteina, te da ima ukupno više proteina u tretiranom uzorku, u odnosu na kontrolni (Slika 16). Prema rezultatima istraživanja Vogela i sur (2011), koji su u svojoj studiji proučavali odgovor stanica kvasca na stres, povećanje ekspresije proteina stresnog odgovora, jedan je od mogućih mehanizama stresnog odgovora. Ukupna promjena ekspresije proteina rezultat je bilo smanjenja translacije, ili povećanja sinteze svih oksidoreduktaza, šaperona i preteasoma odnosno drugih proteina stresnog odgovora. (43)

Ovim istraživanjem, obrađivano je 284 proteina koji predstavljaju ukupni broj detektiranih proteina u kontrolnom i tretiranom uzorku. Podaci su normalizirani, izračunat je omjer prema izričaju u kontroli, prirodni logaritam tog omjera i logaritam varijance te vjerojatnost povećane

ekspresije (probability of up-regulation) izražena faktorom 1. Čak 199 proteina ima povećanu vjerojatnost ekspresije, a 4 njih su pokazali smanjenu ekspresiju, 31 protein eksprimiran samo u tretiranom uzorku od 14 dana te 50 proteina eksprimirano samo u kontroli. 199 njih koji su pokazali povećanu ekspresiju izlistani su u tablici u dodatku diplomskog rada. Naveden je puni naziv svih proteina i njihova funkcija, a rezime rezultata prikazan je grafički (slika 17) gdje je 171 identificirani protein pokazao maksimalnu ekspresiju. Ti proteini sudjeluju u raznim procesima, a oni se mogu podijeliti na one koji sudjeluju u procesima sinteze proteina, metabolizmu ugljikohidrata, biosintezi masnih kiselina i lipida, savijanju proteina, metabolizmu aminokiselina, one nepoznate funkcije te ostale. Najzastupljeniji su proteini koji sudjeluju u procesima sinteze proteina (36%), a odmah iza njih su oni nepoznate funkcije (32%) što ostavlja još mjesta u proučavanju proteoma mitohondrija kvasca. Nadalje, 11% je onih koji sudjeluju u procesima metabolizma ugljikohidrata, a sa 10% slijede oni proteini svrstani pod ostalo. 5% proteina sudjeluje u procesima savijanja proteina, a 3% je onih koji svoju ulogu imaju u metabolizmu aminokiselina te biosintezi masnih kiselina i lipida. Pod ostale proteine spadaju oni koji sudjeluju u ciklusu trikarboksilne kiseline, oksidativnoj dekarboksilaciji, procesu organizacije kromatina, apoptozi te mnogi drugi. Primjerice, mitohondrijski porin, uz to što je ubikvitarn, jedan je od apoptotičkih proteina. Apoptotička smrt aktivan je proces koji ne uključuje neposrednu permeabilizaciju plazma membrane i često se smatra da je primarni uzrok smrti oštećenje proteina i DNA uzrokovano aktivacijom kaspaza i mitohondrijskom funkcijom. Kao jedno od obilježja apoptoze smatra se i stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva, a u većini slučajeva u kojima je primijećena apoptoza pokazuje znakove stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva. Mitohondrijska se disfunkcija poput gubitka potencijala mitohondrijske membrane, smatra ranim događajem apoptoze. (44)

Samo je 4 identificirana proteina pokazalo smanjenu ekspresiju, a to su mitohondrijska malat dehidrogenaza, histon H2A, protein s pretpostavljenom ulogom u odgovoru na kiselinski stres te acetil-CoA hidrolaza. Mitohondrijska malat dehidrogenaza ključna je u stvaranju stanične energije izravnim sudjelovanjem u ciklusu trikarboksilne kiseline. Njen nedostatak može biti nasljedan, no to je vrlo rijetko i tada se pojavljuje metabolička bolest uzrokovana bi-alelnim patogenim varijantama u genu mitohondrijske malat dehidrogenaze, što posljedično rezultira ranom pojavom encefalopatije, psihomotornim kašnjenjem, mišićnom hipotonijom te čestim napadajima. (45) Iako se o njezinoj biološkoj funkciji ne zna puno, acetil CoA hidrolaza ipak je pronađena u mnogim tkivima sisavaca, a katalizira hidrolizu acetil CoA. Prema Lee-u i suradnicima, razina mRNA i aktivnost enzima acetil CoA hidrolaze značajno su smanjeni u

mediju koji sadrži glukozu, a povećani u mediju bez glukoze što ukazuje na to da je ekspresija gena acetil CoA hidrolaze potisnuta glukozom. (46)

Proteini eksprimirani samo u tretiranom uzorku, dakle njih 31 sudjeluju u procesima biosinteze aminokiselina, biogeneze ribosoma, biosintezi ergosterola, metabolizmu šećera, procesima savijanja proteina. Proteini koji su eksprimirani samo u kontroli, njih 50, zaista su vezani uz normalni metabolizam kvasca. Predstavljaju procese koji se uobičajeno događaju u mitohondriju. Proteini (Slika 19. i 20.) označeni žutom bojom, koji su ujedno i najzastupljeniji, imaju raznolike metaboličke funkcije. Proteini obojani tamno zeleno sudjeluju u procesima koji se događaju u ribosomima, a oni svijetlo zeleni u biosintezi valina, leucina i izoleucina. Nadalje, proteini obojani tamno plavo svoju ulogu imaju u metabolizmu piruvata, dok oni obojani svijetlo plavo sudjeluju u biosintezi aminokiselina. Proteini označeni crveno sudjeluju u ciklusu trikarboksilne kiseline. Neobičan je podatak za tih 50 proteina koji su eksprimirani samo u kontrolnom tj. netretiranom uzorku i da su ti proteini potisnuti u tretiranom uzorku ta da ustvari tretman s metalnim izaziva pojačanu sintezu nekih drugih „temeljnih“ metaboličkih enzima. To je ujedno i nedostatak obrade podataka programima poput MassLynx i upućuje na potrebu za sofisticiranijom obradom podataka korištenjem matričnih programa, poput Pegasus.

ICP-MS tehnikom analiziran je sadržaj i sastav metalnih iona u podlogama korištenim za uzgoj kvasca (uz netretiranu podlogu korištena je i ona u koji su se ioni iz ortodonstkih aparata eluirali 14 dana u simuliranim uvjetima usne šupljine). Najzastupljeniji je metal željezo, a zatim ga slijede nikel, krom, aluminij, bakar te u malim količinama mangan, molibden, titanij te kobalt. Za određeni broj spojeva smatra se kako djeluju inducirajući oksidativni stres. Prema istraživanju Grosfelda i suradnika, detaljnom se analizom dokazalo kako metali poput kadmija, bakra, kroma i aluminijski uzrokuju nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta. Iako je u jednom istraživanju toksičnost mangana bila ovisna o mitohondrijima, što bi naposljetku moglo aludirati na stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva, u radu Grosfelda i suradnika manganski stres jedini nije prouzročio stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta. (44) Durgo i sur (2023) u svom su istraživanju dokazali toksični učinak metalnih iona eluiranih iz ortodonstkih naprava na stanice gastrointestinalnog trakta, čak i u ukupno manjim eluiranim količinama, nego u ovom radu. Proučavali su citotoksičnost, količinu proizvedenih reaktivnih kisikovih vrsta, genotoksičnost i prooksidativno oštećenje DNA, te pokazali da su ioni željeza i nikla odgovorni za povećanu produkciju reaktivnih kisikovih vrsta, dok su ioni mangana i kroma, imali genotoksični učinak. Sinergističko djelovanje iona Fe, Cr, Mn i Al rezultiralo je citotoksičnim efektom. (47)

U ovom je istraživanju dokazano željezo kao najzastupljeniji metal u korištenom mediju za eluiranje. Prema podacima Petković-Didović i suradnika koji su proučavali količine eluiranih metalnih iona iz zasebnih dijelova ortodontskih aparata u umjetnu slinu kao medij, može se vidjeti da su prstenovi najvažniji izvor otpuštenih iona željeza. (23)

U ovom istraživanju, svi dijelovi ortodontskog aparatića zajedno su eluirani u kvašćevu podlogu kao medij i otpustili su više od 6 mg/L iona željeza. Poznato je kako je željezo element nužan za život te da njegove funkcije sežu od disanja, staničnog metabolizma pa do sinteze i popravka DNA. Ravnoteža željeza ostaje kontinuirana, stalna ukoliko su i mehanizmi koordinirani, no poremećaj homeostaze željeza dovodi do oštećenja same stanice ili pak stvaranja slobodnih kisikovih radikala. Prema najnovijim znanstvenim spoznajama, poremećajem homeostaze željeza potiče se nastajanje nove vrste stanične smrti nazvane ferroptozom. Kada su stanice preopterećene udjelom željeza, dolazi do stvaranja toksičnih reaktivnih kisikovih vrsta, javlja se nedostatak višestruko nezasićenih masnih kiselina što posljedično vodi do ferroptoze. Ferroptozu pokazuje morfološke značajke kao što su rasipanje mitohondrijskih krista, smanjenje volumena mitohondrija te kolaps vanjske mitohondrijske membrane (48). Osim ionima željeza, pozornost valja obratiti i na prisutnost Al i Cu, kojeg ni ne bi trebalo biti u ortodontskim aparatićima, a znatno pridonose toksičnosti i sinergističkom učinku metalnih iona na žive organizme. (23)

6. Zaključak

Na kraju ovog rada može se zaključiti:

- Broj stanica kvasca nakon tretmana eluatom metalnih iona iz ortodontskih materijala nije se značajnije mijenjao u odnosu na kontrolu. Značajnije se nisu promijenile, ni veličina, oblik niti način rasta stanica.
- AO/PI bojanjem uočavaju se promijenjene stanice u tretiranom uzorku (vjerojatno u različitim stadijima apoptoze ili neke druge vrste oštećenja).
- U eksperimentalnoj kvaščevoj podlozi u koju su se dijelovi ortodontskog aparata ispirali tijekom 14 dana ICP-MS analizom ispitan je sadržaj i sastav metalnih iona. Identificirani su ioni željeza, nikla, bakra, kroma, aluminijska te u manjim količinama kobalta, mangana, molibdena te titanija. Prevladavaju ioni željeza s koncentracijom od oko 6 mg/L. U podlozi su pronađeni i ioni bakra i aluminijska koji nisu deklarirani sastavom legura korištenih u izradi pojedinih dijelova dentalnog aparata.
- Kako su očekivani toksični učinci metalnih iona djelovanje na mitohondrije i njihova posljedična disfunkcija, iz stanice su izolirani mitohondriji, a iz njih proteini koji su identificirani LC/MS metodom.
- Od ukupno 284 proučavanih proteina, 199 njih je povećane ekspresije, 4 proteina smanjene, 31 protein eksprimiran je samo u tretiranom uzorku, a 50 samo u kontroli.
- Od 199 proteina, 171 je onih maksimalno eksprimiranih, a oni sudjeluju u procesima sinteze proteina, metabolizmu ugljikohidrata, biosintezi masnih kiselina i lipida, savijanju proteina, metabolizmu aminokiselina te u nekim drugim procesima, ali identificirani su i proteini nepoznate funkcije.
- U ovom radu nismo uspjeli povezati dobivene rezultate proteina promijenjenog izričaja s količinom i vrstama eluiranih metalnih iona u podlogu na kojoj je kvasac uzgajan.

7. Literatura

1. Špalj S. (2012). Ortodontski priručnik | Repozitorij Medicinskog fakulteta u Rijeci [Internet]. Repozitorij Medicinskog fakulteta u Rijeci. str. 224. [Citirano 22.4.2024.] Dostupno na: <https://repository.medri.uniri.hr/islandora/object/medri%3A2804>
2. Ghodasra R, Brizuela M. Orthodontics, Malocclusion. [Updated 2023 Apr 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. [Citirano: 30.5.2024.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK592395/>
3. Devi, L. B., Keisam, A., & Singh, H. P. (2022). Malocclusion and occlusal traits among dental and nursing students of Seven North-East states of India. *Journal of oral biology and craniofacial research*, 12(1), 86–89. [Citirano 2.6.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2021.10.012>
4. Littlewood S.J. Mitchell L. (2019). An Introduction to Orthodontics [Internet]. 5. izdanje. Oxford University Press. 408 str. [Citirano: 2.6.2024.] Dostupno na: https://books.google.hr/books?id=vauaxarXU_2IC&printsec=frontcover&hl=hr#v=onepage&q&f=false
5. Tatarciuc M.; Diaconu Popa D.; Luca O.; Vitalariu A. (2019). Thermic treatments influence on the structure and properties od dental alloys [Internet]. Romanian Journal of Oral Rehabilitation. [Citirano 2.6.2024.] Dostupno na: <https://www.rjor.ro/wp-content/uploads/2019/06/THERMIC-TREATMENTS-INFLUENCE-ON-THE-STRUCTURE-AND-PROPERTIES-OF-DENTAL-ALLOYS.pdf>
6. Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., & Catalano, A. (2020). Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. *International journal of environmental research and public health*, 17(3), 679. [Citirano: 3.6.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijerph17030679>
7. Nickel | Definition, Properties, Symbol, Uses, & Facts | Britannica [Internet]. [Citirano: 3.6.2024.] Dostupno na: <https://www.britannica.com/science/nickel-chemical-element>
8. <https://www.bos.org.uk/wp-content/uploads/2022/09/nickelallergyinorthodontics.pdf> (pristupljeno 2.6.2024.)
9. Nickel Allergy in Orthodontic Patients. A Review; Faisal Abduljawad (2019). [Citirano: 8.6.2024.] Dostupno na: <https://www.saudijournals.com/media/articles/SJODR-47-495-497-c.pdf>

10. Klaudija Urbutytė, André Barčiūtė, Kristina Lopatienė; The Changes in Nickel and Chromium Ion Levels in Saliva with Fixed Orthodontic Appliances: A Systematic Review (2023.). [Citirano 10.6.2024.] Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2076-3417/13/8/4739>
11. Žigante, M., Rinčić Mlinarić, M., Kaštelan, M. et al. Simptomi alergijske senzibilizacije na titan i nikal u ortodontskom liječenju. *Prog Orthod.* 21 , 17 (2020). [Citirano: 2.6.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1186/s40510-020-00318-4>
12. Idil Uysal, Bengi Yilmaz, Aykan Onur Atilla, Zafer Evis, Nickel titanium alloys as orthodontic archwires: A narrative review, *Engineering Science and Technology, an International Journal*, Volume 36, 2022. [Citirano: 6.6.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.jestch.2022.101277>
13. NIKAL, Ni - Spojevi, dobivanje i uporaba - Periodni Sustav Elemenata [Internet]. [Citirano: 8.6.2024.] Dostupno na: <http://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/ni/spojevi.html>
14. Iron | Definition, Properties, Symbol, Uses, & Facts | Britannica [Internet]. [Citirano: 9.6.2024.] Dostupno na: <https://www.britannica.com/science/iron-chemical-element>
15. Lenntech, Iron (Chemical properties of iron - Health effects of iron - Environmental effects of iron [Internet]. [Citirano: 9.6.2024.] Dostupno na: <https://www.lenntech.com/periodic/elements/fe.htm#:~:text=Iron%20is%20a%20lustrous%2C%20ductile,but%20not%20in%20dry%20air.>
16. Ketij Mehulić i suradnici, Dentalni materijali, Udžbenici sveučilišta u zagrebu, Medicinska naklada, Zagreb, 2017. Dostupno na: http://bib.irb.hr/datoteka/866095.Dentalni_materijali_50_dpi.pdf
17. Dežulović, L. i Čanadi Jurešić, G. (2021). Potencijalna toksičnost titanija. *Medicina Fluminensis*, 57 (4), 341-355. Dostupno na: https://doi.org/10.21860/medflum2021_264888
18. Titanium | Definition, Properties, Symbol, Uses, & Facts | Britannica [Internet]. [Citirano 9.6.2024.] Dostupno na: <https://www.britannica.com/science/titanium>
19. TITANIJ, Ti - Spojevi, dobivanje i uporaba - Periodni Sustav Elemenata [Internet]. [Citirano: 6.6.2024.] Dostupno na: <http://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/ti/spojevi.html#SPOJEV>

20. Bharathi.S, Navaneethan, Titanium brackets used in dentistry, February 2020., IJSDR | Volume 5, Issue 2; Dostupno na: <https://www.ijedr.org/papers/IJSDR2002005.pdf>
21. Chromium | Definition, Properties, Symbol, Uses, & Facts | Britannica [Internet]. [Citirano: 9.6.2024.] Dostupno na: <https://www.britannica.com/science/chromium>
22. Mirhashemi, A., Jahangiri, S., & Kharrazifard, M. (2018). Release of nickel and chromium ions from orthodontic wires following the use of teeth whitening mouthwashes. *Progress in orthodontics*, 19(1), 4. [Citirano: 10.6.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1186/s40510-018-0203-7>
23. Petković Didović, M., Jelovica Badovinac, I., Fiket, Ž., Žigon, J., Rinčić Mlinarić, M., & Čanadi Jurešić, G. (2023). Cytotoxicity of Metal Ions Released from NiTi and Stainless Steel Orthodontic Appliances, Part 1: Surface Morphology and Ion Release Variations. *Materials (Basel, Switzerland)*, 16(11), 4156. [Citirano: 27.6.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ma16114156>
24. Kalenić S., i suradnici: Medicinska mikrobiologija; Zagreb: Medicinska naklada; 2013.; str. 511.-515.
25. Škara Josip, Sergej Nadalin, Alena Buretić-Tomljanović, Branka Blagović, Izučavanje neurodegenerativnih bolesti na kvascu kao modelnom organizmu; *Medicina fluminensis* 2016, [Internet] Vol. 52, No. 1, p. 14-27. [Citirano 11.6.2024.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/file/225168>
26. Teparić R, Stuparević I, Mrša V. Incorporation of Homologous and Heterologous Proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Food Technology and Biotechnology* [Internet]. 2010 [Citirano 11.6.2024.];48(3):317-328. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/57563>
27. Nielsen J. (2019). Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. *Biotechnology journal*, 14(9), e1800421. [Citirano: 10.6.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1002/biot.201800421>
28. Vanderwaeren, L., Dok, R., Voordeckers, K., Nuyts, S., & Verstrepen, K. J. (2022). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System for Eukaryotic Cell Biology, from Cell Cycle Control to DNA Damage Response. *International journal of molecular sciences*, 23(19), 11665. [Citirano: 22.4.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijms231911665>

29. Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1–31. [Citirano: 11.6.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>
30. Ralser M, Kuhl H, Ralser M, Werber M, Lehrach H, Breitenbach M, Timmermann B. The *Saccharomyces cerevisiae* W303-K6001 cross-platform genome sequence: insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt. *Open Biol.* 2012 Aug;2(8):120093. [citirano 11.6.2024.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3438534/pdf/rsob-2-120093.pdf>
31. Matheson, K., Parsons, L., & Gammie, A. (2017). Whole-Genome Sequence and Variant Analysis of W303, a Widely-Used Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda, Md.)*, 7(7), 2219–2226. [Citirano: 11.6.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1534/g3.117.040022>
32. Malina C., Larsson C., Nielsen J., (2018) Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology, *FEMS Yeast Research*, Volume 18, Issue 5. Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy040>
33. Miyakawa I. (2017). Organization and dynamics of yeast mitochondrial nucleoids. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 93(5), 339–359. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.021>
34. Elstner M., C. Andreoli, T. Klopstock, T. Meitinger, H. Prokisch, Chapter 1 The Mitochondrial Proteome Database: MitoP2, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Volume 457, 2009, Pages 3-20. [citirano 11.6.2024.] Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687909050010>
35. Pearce, D. A., Sherman, F. (1999). Toxicity of copper, cobalt, and nickel salts is dependent on histidine metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 181(16), 4774–4779. [citirano 29.4.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4774-4779.1999>
36. Dymond, J. S. (2013). *Saccharomyces cerevisiae* growth media. *Methods in enzymology*, 533, 191–204. [citirano 29.4.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00012-X>
37. <https://www1.cgmh.org.tw/intr/intr2/c3s000/corelab/RadiationBiology/doc/LUNA-FL%20user%20manual.pdf> (pristupljeno: 28.5.2024.)

38. [https://www.abcam.com/ps/products/65/ab65321/documents/Mitochondrial-DNA-Isolation-Kit-protocol-book-v6c-ab65321%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/65/ab65321/documents/Mitochondrial-DNA-Isolation-Kit-protocol-book-v6c-ab65321%20(website).pdf) (pristupljeno 29.5.2024.)
39. Cindrić M, Marković A, Horvatić A. Spregnute tehnike tekućinski kromatograf-spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina*, 2009, 45, 218-232.
40. Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic acids research*, 51(D1), D638–D646. [Citirano 23.6.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
41. Bernhard Hennig, Michal Toborek, Nutrition and endothelial cell function: implications in atherosclerosis, *Nutrition Research*, Volume 21, Issues 1–2, 2001, Pages 279-293, ISSN 0271-5317. [Citirano 26.6.2024.] Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00289-X](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00289-X)
42. Trump, B. F., Berezsky, I. K., Chang, S. H., & Phelps, P. C. (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic pathology*, 25(1), 82–88. [Citirano:26.6.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1177/019262339702500116>
43. Vogel, C., Silva, G. M., & Marcotte, E. M. (2011). Protein expression regulation under oxidative stress. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 10(12), M111.009217. Dostupno na: <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009217>
44. Grosfeld, E. V., Bidiuk, V. A., Mitkevich, O. V., Ghazy, E. S. M. O., Kushnirov, V. V., & Alexandrov, A. I. (2021). A Systematic Survey of Characteristic Features of Yeast Cell Death Triggered by External Factors. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(11), 886. [Citirano: 25.6.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/jof7110886>
45. Mathis, D., Koch, J., Koller, S., Sauter, K., Flück, C., Uldry, A. C., Forny, P., Froese, D. S., & Laemmle, A. (2024). Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes reveal TCA cycle disruption and the potential basis for triheptanoin treatment for malate dehydrogenase 2 deficiency. *Molecular genetics and metabolism reports*, 39, 101066. [Citirano: 24.6.2024.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2024.101066>
46. Lee, F. J., Lin, L. W., & Smith, J. A. (1990). A glucose-repressible gene encodes acetyl-CoA hydrolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological*

chemistry, 265(13), 7413–7418. [Citirano: 25.6.2024.] Dostupno na:
[https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)39129-X/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)39129-X/pdf)

47. Durgo, K., Orešić, S., Rinčić Mlinarić, M., Fiket, Ž. i Čanadi Jurešić, G. (2023). Toxicity of Metal Ions Released from a Fixed Orthodontic Appliance to Gastrointestinal Tract Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 24. (12). Dostupno na:
<https://doi.org/10.3390/ijms24129940>

48. Kwun, M. S., & Lee, D. G. (2023). Ferroptosis-Like Death in Microorganisms: A Novel Programmed Cell Death Following Lipid Peroxidation. *Journal of microbiology and biotechnology*, 33(8), 992–997. [Citirano: 25.6.2024.] Dostupno na:
<https://doi.org/10.4014/jmb.2307.07002>

7.1. Popis slika

Slika 1.1. Oblici malokluzija (1).....	9
Slika 2. Demijelinizacija na bukalnim površinama sjekutića i očnjaka tijekom liječenja fiksnim aparatom (4).....	10
Slika 3. Građa stanice kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : https://microbeonline.com/yeast-structure-reproduction-and-uses/	22
Slika 4. LUNA-FL TM dual fluorescence cell counter. (37).....	29
Slika 5. Nanošenje uzorka u PhotonSlide™ (37)	30
Slika 6. Prebrojane stanice vidljive na uređaju LUNA u kontroli na početku pokusa.....	37
Slika 7. Histogram veličine stanica (lijevo) te zastupljenost stanica kvasca koje rastu pojedinačno, kao dvostruke, trostruke, četverostruke, peterostruke te kao šesterostruke stanice na početku uzgoja (desno).....	38
Slika 8. Prebrojane stanice na uređaju LUNA vidljive u kontroli na kraju pokusa.....	38
Slika 9. Histogram veličine stanica (lijevo) te zastupljenost stanica kvasca koje rastu pojedinačno, kao dvostruke, trostruke, četverostruke, peterostruke, šesterostruke, sedmerostruke te kao stanice u nakupinama na kraju uzgoja u kontroli (desno).....	39
Slika 10. Prebrojane stanice na uređaju LUNA vidljive u 14 dana na kraju pokusa.....	39

Slika 11. Histogram veličine stanica (lijevo) te zastupljenost stanica kvasca koje rastu pojedinačno, kao dvostruke trostruke, četverostruke, peterostruke, šesterostruke, sedmerostruke te kao stanice u nakupinama na kraju uzgoja u 14 dana (desno).....	39
Slika 12. Grafički prikaz povećanja broja stanica u kontroli i 14 dana.....	40
Slika 13. Stanice kvasca obojane AO/PI bojom u kontroli pod povećanjem od 400x.....	40
Slika 14. Stanice kvasca obojane AO/PI bojom nakon tretmana od 14 dana pod povećanjem A) 400x, te B) pod imerzijom 1000x.....	41
Slika 15. Zastupljenost mrtvih i živih stanica kvasca u kontrolnom uzorku te nakon tretmana od 14 dana.....	41
Slika 16. Koncentracija proteina u uzorcima kontrole i u tretiranim uzorcima, izražene množinskom (fmol/ μ L, lijevi dijagram) odnosno masenom koncentracijom (ng/ μ L, desni dijagram).....	42
Slika 17. Udio identificiranih maksimalno eksprimiranih proteina prema skupinama (proteini koji sudjeluju u procesima sinteze proteina, metabolizmu ugljikohidrata, biosintezi masnih kiselina i lipida, savijanju proteina, metabolizmu aminokiselina, u nekim drugim procesima, ali i proteini nepoznate funkcije).....	43
Slika 18. Proteini sa smanjenom ekspresijom te njihova povezanost.....	44
Slika 19. Povezanost proteina eksprimiranih samo u 14 dana.....	46
Slika 20. Identificirani proteini eksprimirani samo u kontroli prikazani u bazi podataka String.....	49
Slika 21. Usporedba u sadržaju i sastavu metalnih iona u podlogama za uzgoj kvasca u kontroli i 14 dana.....	50

8. Životopis

Simone Radolović rođena je 30.08.1999. godine u Puli. Osnovnoškolsko obrazovanje završava u mjestu Marčana gdje i živi od rođenja. Nakon toga upisuje srednju školu, opću gimnaziju u Puli. Po završetku srednje škole upisuje fakultet, Sveučilišni prijediplomski studij Sanitarno inženjerstvo na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Po završetku 3 godine studija, 2022. stječe zvanje prvostupnika sanitarnog inženjerstva (univ. bacc. sanit. ing.). Odmah nakon toga upisuje i Sveučilišni diplomski studij Sanitarno inženjerstvo. Tijekom fakulteta sudjelovala je aktivno na kongresu Sanitas te radila u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Istarske županije u Puli u službi za epidemiologiju gdje je anketirala novooboljele od COVID-19 te ih upisivala u digitalnu platformu. Također je radila i u službi za zdravstvenu ekologiju, na odjelu voda gdje se bavila radom na terenu, uzorkovanjem vode.