

In vitro evaluacija sigurnosti ortodontskih naprava

Orešić, Sunčana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:855720>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Sunčana Orešić, 1392/MB

***IN VITRO* EVALUACIJA
SIGURNOSTI ORTODONTSKIH
NAPRAVA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Durgo.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta “Utvrđivanje pojavnosti, uzroka i štetnih učinaka oksidativnog stresa izazvanog uporabom fiksnih ortodontskih naprava”, IPS-2020-01-7418, financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

ZAHVALA

Prvenstveno zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Kseniji Durgo što je kroz svaki korak izrade ovog rada bila sa mnom i pokazala puno volje, strpljenja i ljubavi prema svojem poslu.

Zahvaljujem cijeloj obitelji, pogotovo roditeljima, koji su me cijeli život gurali i motivirali kako bih došla do pozicije u kojoj jesam i hvala što su podržavali moje snove i odluke, barem one pametne.

Zahvaljujem i Nikolini, Davoru, Leu, Manon, Martinu, Vilimu te svim drugim prijateljima koji su bili uz mene i podnosili me kroz period studiranja na svoj podršci i motivaciji.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

IN VITRO EVALUACIJA SIGURNOSTI ORTODONTSKIH NAPRAVA

Sunčana Orešić, 1392/MB

Sažetak: Ortodontske naprave primjenjuju se već niz godina kao primarni oblik postizanja ortodontskog pomaka i estetski ljepšeg pozicioniranja zubi. Najčešće su izrađene od metala, koji u usnoj šupljini lako korodiraju i ispuštaju ione u slinu. Metalni ioni imaju poznat čitav niz negativnih bioloških aktivnosti te se postavlja pitanje štete li metalni ioni ispušteni od strane ortodontskih naprava pacijentima. Cilj ovog rada bio je ispitati citotoksičan, genotoksičan i prooksidativni efekt metala ispuštenih u slinu iz dijelova ortodontskih naprava. Za mjerenje citotoksičnosti korištena je Neutral Red metoda, za mjerenje genotoksičnosti komet test, a za mjerenje prooksidativnog učinka metode DCFH-DA i linearizacije plazmida ϕ X-174 RF I. Vrijeme elucije ortodontskih naprava utječe na sastav sline te se mogu izmjeriti različiti biološki efekti na stanicama. Većina eluata djelovala je toksično u cijelom koncentracijskom rasponu neovisno o vremenu elucije na CAL 27 stanice. Na AGS staničnoj liniji određeno je da niže koncentracije eluata bravica, ligatura, prstenova te svih dijelova izazivaju prooksidacijsko djelovanje, dok više koncentracije eluata istih ortodontskih naprava imaju antioksidacijsko djelovanje. Prooksidacijski učinak određen na plazmidu ϕ X-174 RF I je bio slab. Metali prisutni u eluatima ne izazivaju trajne promjene na genetički materijal stanica te je njihova primjena sigurna.

Ključne riječi: *citotoksičnost, metali, ortodontske naprave, genotoksičnost, prooksidativna aktivnost*

Rad sadrži: 68 stranica, 60 slika, 7 tablica, 54 literaturna navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *prof. dr. sc. Ksenija Durgo*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Draženka Komes*
2. Prof. dr. sc. *Ksenija Durgo*
3. Izv. prof. dr. sc. *Gordana Čanadi Jurešić*
4. Prof. dr. sc. *Višnja Gaurina Srček* (zamjena)

Datum obrane: 27.9.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

IN VITRO EVALUATION OF SAFETY OF ORTHODONTIC APPLIANCES

Sunčana Orešić, 1392/MB

Abstract: Orthodontic appliances have been used for decades as a primary way of treating orthodontic problems and achieving an aesthetically pleasing look. They are usually made of metal, which can easily corrode and release metal ions into saliva. Metal ions are known for their numerous negative biological effects, so a question, whether ions released by appliances cause damage to patients, rises. The goal of this paper was to test cytotoxic, genotoxic and prooxidative effects of metal ions released by appliance parts into saliva. The results show that a certain amount of those effects on cells is visible, but that it is not worrying to the point of saying that orthodontic appliances are harmful for human health. Cytotoxicity was measured using NR method, prooxidative effects were tested using the DCFH-DA method and ϕ X-174 RF I plasmid linearization, while genotoxicity was measured with comet assay. The elution time has an impact on the composition of the saliva and biological effects can be measured. Most of the tested samples had a toxic effect on CAL 27 cell line. Regarding AGS cell line, lower concentrations of samples were shown to have a prooxidative effect, while higher concentrations had an antioxidative effect. The prooxidative effect tested using the ϕ X-174 RF I plasmid linearization was weak. Metals present in the eluates do not cause permanent changes of the genetic material and their application is safe.

Key words: *citotoxicity, metals, orthodontic appliances, genotoxicity, prooxidative effect*

Thesis contains: 68 pages, 60 figures, 7 tables, 54 references, 1 appendix

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *Ksenija Durgo, PhD., full professor*

Reviewers:

1. PhD., *Draženka Komes, full professor*
2. PhD., *Ksenija Durgo, full professor*
3. PhD., *Gordana Čanadi Jurešić, associate professor*
4. PhD., *Višnja Gaurina Srček, full professor, (substitute)*

Thesis defended: September 27th, 2021

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ORTODONTSKE NAPRAVE	2
2.2. MATERIJALI U ORTODONCIJI.....	4
2.3. METALI	4
2.4. LEGURE.....	5
2.5. METALI U MEDICINI	5
2.6. TOKSIČNOST METALA	8
2.6.1. Toksičnost kroma.....	10
2.6.2. Toksičnost nikla	11
2.6.3. Toksičnost kobalta	13
2.6.4. Toksičnost kadmija	13
2.6.5. Terapija nakon trovanja metalima.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1. MATERIJALI.....	15
3.1.1. Biološki test sustavi	15
3.1.2. Otopine.....	16
3.1.3. Laboratorijski pribor	20
3.1.4. Računalni programi.....	22
3.2 METODE.....	23
3.2.1. Ispitivanje citotoksičnosti metala u otopinama umjetne sline Neutral Red (NR) metodom	23
3.2.2. Mjerenje prooksidativnog učinka pomoću diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA) metodom	24
3.2.3. Ispitivanje prooksidativnog učinka na DNA metodom linearizacije plazmida ϕ X-174 RF I... ..	25
3.2.4. Ispitivanje genotoksičnosti komet testom	26
3.2.5. Obrada podataka	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. KEMIJSKI SASTAV OTOPINA I KOMENTARI	28
4.2. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI NEUTRAL RED METODOM	28
4.3. ISPITIVANJE PROOKSIDATIVNOG UČINKA DCFH-DA METODOM	38
4.4. ISPITIVANJE PROOKSIDATIVNOG UČINKA NA DNA METODOM LINEARIZACIJE PLAZMIDA ϕ X-174 RF I	47
4.5. ISPITIVANJE GENOTOKSIČNOSTI KOMET TESTOM.....	54

5. ZAKLJUČAK	62
6. LITERATURA	63
7. PRILOZI.....	
7.1. Prilog 1. - Kemijska analiza otopina umjetne sline u kojima su određeno vrijeme stajali dijelovi fiksnih ortodontskih naprava, koncentracije metala izražene u $\mu\text{g L}^{-1}$	

1. UVOD

Ortodontske naprave, često poznatije kao „aparatići“, u dentalnoj se medicini koriste na svakodnevnoj bazi, a koriste se od 1970-ih. Radi se o metalnim konstrukcijama koje čine bravice, lukovi, prstenovi, ligature i žice, koji su povezani sa zubima pomoću posebnog ljepljiva. Vrijeme nošenja najčešće je oko dvije godine, što je dovoljno vremena da naprava počne utjecati na organizam pacijenta. Logično je zaključiti da će dugotrajno nošenje takvih naprava izazvati određenu štetu usne šupljine i iskazati lokalnu agresiju prema sluznici. Uz fizičku abraziju, bitno je spomenuti i kemijsku koroziju te otpuštanje metalnih iona korištenih metala koje uvjeti u usnoj šupljini samo dodatno potiču (nikal, krom, titan, kobalt i drugi metali). Iako je korozija kratkotrajna i ovisi o faktorima poput pH sline, vlage, pastama za zube i vodicama za usta, nije zanemariva (Kishore i sur., 2021; Loyola-Rodriguez i sur., 2020; Downarowicz i Mikulewicz, 2017). Glositis, metalni okus u ustima, suhe usne, upalno crvenilo i hipertrofija zubnog mesa često se manifestiraju u pacijenata i smatra ih se posljedicama korozije tih metala. Čak i ako sama naprava ne nanese tešku štetu usnoj šupljini, može ju ostaviti podložniju oštećenjima i toksičnim agensima kasnije tijekom života (Martin-Camean i sur., 2015; Mikulewicz i sur., 2013; Ortiz i sur., 2011).

Iako su istraživanja o citotoksičnosti spomenutih metala i ortodontskih naprava provedena često i većina ih pokazuje kako je citotoksičnost zanemariva, ne može se isključiti mogućnost da su i ovdje primijenjene, male koncentracije metala dovoljne da izazovu biološke promjene oralne sluznice, posebice zato jer se nalaze u obliku smjesa. Tkivo sluznica usne šupljine u mogućnosti je apsorbirati te malene količine metalnih iona kroz duži period, što može dovesti do promjena u genomu stanica usne šupljine. Osim toga, metali nisu biorazgradivi te mogu izazvati ireverzibilne toksične efekte svojim nakupljanjem u tkivima. Također, kobalt i nikal dokazano su kancerogeni za sluznice (Martin-Camean i sur., 2015a). Ne smije se zanemariti ni činjenica kako ti metali ne ostaju samo lokalno nakupljeni, već je u mnogim studijama utvrđeno da se nalaze u tjelesnim tekućinama i tkivima nepovezanim s usnom šupljinom. Općenito, izlaganje metalnim ionima izaziva različite patološke učinke poput upalnog odgovora, promjena u oksidativnom sustavu, povećanja lipidne peroksidacije te promjena u mehanizmima popravka deoksiribonukleinske kiseline (DNA; Martin-Camean i sur., 2015a).

Sukladno svemu rečenom, ortodontske naprave, ovisno o svom sastavu, mogu imati određena negativna biološka djelovanja na ljudski organizam. Ciljevi ovog istraživanja su utvrditi citotoksični, prooksidacijski te genotoksični učinak metala otpuštenih u umjetnu slinu tijekom 3, 7 i 14 dana iz lukova, bravica, ligatura i prstenova. Kao biološki test sustavi korištene su stanične linije usne šupljine, jetre, želuca te debelog crijeva, odnosno stanice tkiva koje su i u *in vivo* uvjetima izložene djelovanju tih metala. Iz dobivenih rezultata utvrditi će se koje je vrijeme kontakta ortodontskih naprava i sline kritično za postizanje neželjenih učinaka te će se utvrditi koja ortodontska naprava ispušta najviše metala tijekom kontakta sa slinom. Iz dobivenih rezultata zaključiti će se kakva je sigurnost primjene ovakvih naprava i koje su potencijalne neželjene pojave prilikom njihovog korištenja.

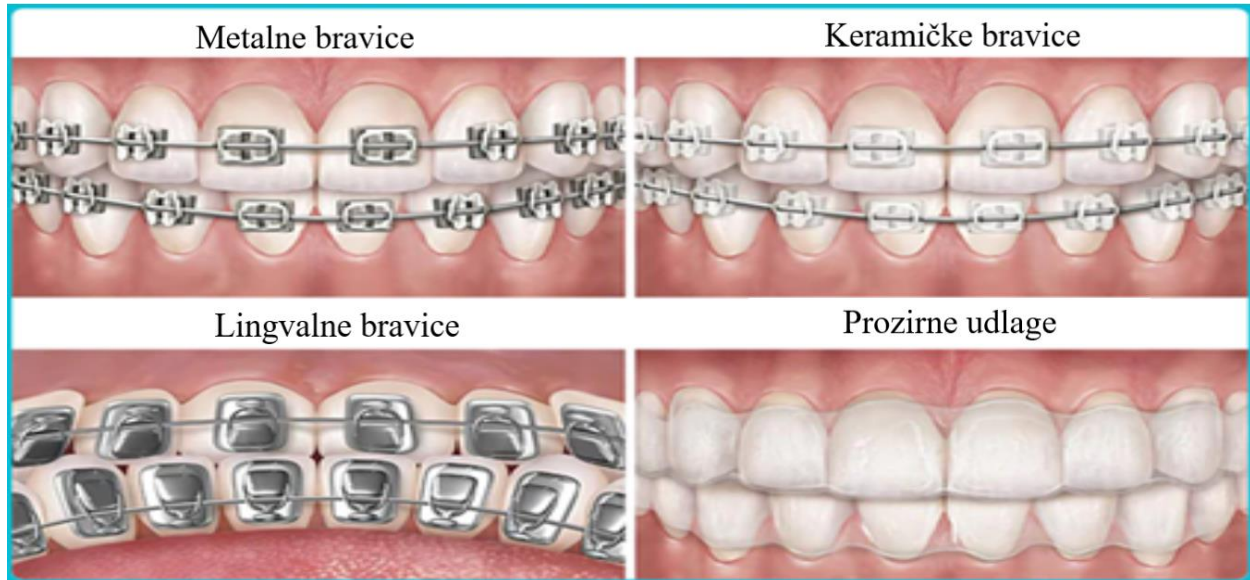
2. TEORIJSKI DIO

2.1. ORTODONTSKE NAPRAVE

Kao što je već rečeno, ortodontske naprave medicinski su uređaji koji se u stomatologiji koriste svakodnevno kako bi se ispravili zubi i/ili položaji čeljusti pacijenta, bilo iz estetskih bilo iz zdravstvenih razloga, a koriste se još od davnih 1900-tih i njihov razvoj konstantno napreduje (Proffit i sur., 2009). Najpoznatije su naprave za ravnanje i pomicanje zubi, „aparatići“, koji mogu biti mobilni i fiksni, no tu su još i naprave poput implantata, maski i kapa. Mobilne naprave kombinacija su metalnih dijelova (najčešće žica) i plastičnih dijelova. Fiksne se sastoje od bravica, lukova, prstenova i ligatura povezanih žicom te fiksiranih na zube posebnim ljepilom, najčešće akrilnom smolom. Ove naprave su smjesa metala čiji sastav varira, a za njihovu se izradu najčešće koristi čelik, srebro, krom, kobalt, nikal, titan, cink, kadmij i drugi (Orthonova, 2020; Martin-Camean i sur., 2015a; Gonçalves i sur., 2014; Heravi i sur., 2013; Mikulewicz i sur., 2013; Proffit i sur., 2009). Ove naprave usnu šupljinu oštećuju mehanički, ali zbog stalnog kontakta sa slinom, hranom i tekućinama dolazi do disocijacije iona metala od kojih su građeni te mogu negativno utjecati na higijenu zubi.

U novije doba ortodoncija napreduje te se sve češće primjenjuju i alternativne fiksne naprave koje koriste keramičke bravice, bravice postavljene na stražnju stranu zubi (lingvalne

bravice) ili pak isključivo plastične udlage koje se redovito mijenjaju kako bi postupno pomicala zube u željenom smjeru, no i dalje je najčešći oblik klasični, potpuno metalni (Alansari i sur., 2019). Na slici 1 prikazani su najčešći oblici ortodontskih naprava.



Slika 1. Različiti tipovi ortodontskih aparata (prilagođeno prema Jeevan Dental Clinic, 2019).

O načinu i trajanju ortodontske terapije odlučuje specijalizirani stomatolog nakon niza procjena (fizički rast, psihosocijalna procjena, oralno zdravlje, procjena funkcija čeljusti i okluzije i procjena izgleda) i pregleda (skeniranje, otisak zagrizi). U širem smislu, postoji šest razloga, približno ovim redom po učestalosti, zbog kojih pacijenti traže terapiju: ukloniti hendikep, poboljšati izgled zubi i/ili lica kako bi se poboljšala kvaliteta života, zadržati normalan razvojni proces, poboljšati funkciju čeljusti, umanjiti utjecaj traume ili bolesti te olakšati druge stomatološke tretmane. Stomatolog na kraju mora naći ravnotežu između pacijentovih želja te dijagnoze i mogućnosti za liječenje istih i odabrati terapiju koja se temelji na dokazima. Dakako, naprave nisu jedino rješenje ortodontskih problema, mogući su i zahvati preoblikovanja zubi te kirurški zahvati, a nije rijetko ni kombiniranje više vrsta terapija i naprava kako bi se postigao željeni rezultat (Proffit i sur., 2009).

2.2. MATERIJALI U ORTODONCIJI

Optimalni ortodontski pomak postiže se laganom, kontinuiranom silom te je stoga važan odabir materijala odgovarajućih biomehaničkih svojstava. Slitine plemenitih metala su se koristile među prvima, uglavnom iz razloga što su jedine podnosile uvjete usne šupljine. Uvođenjem čelika one su postale zastarjele. Čelik i slitine kobalt-krom brzo su zamijenile slitine plemenitih metala zbog manje cijene, bolje snage i elastičnosti te jednake otpornosti na koroziju za koju je zaslužan krom. Tipični sastav materijala za ortodontsku upotrebu ima 18% kroma i 8% nikla. Krom djeluje antikorozivno, baš kao i molibden, koji je također često u sastavu naprava. Nikal pak povećava čvrstoću i duktilnost, no također ima i ulogu u otpornosti naprave na koroziju. Ukoliko se želi veća elastičnost, obično se bira nikal-titan slitina. Ona ima svojstva „pamćenja“ oblika i superelastičnosti. Beta-titan još je jedna titanska slitina, a razvijena je prvenstveno za ortodontsku upotrebu. Laka je za oblikovanje, snažna i elastična, što ju čini idealnim materijalom za opruge i žice. Također, titan se često smatra najbiokompatibilnijim i najmanje toksičnim metalom. U 21. stoljeću sve se više koristi kompozitna plastika kao zamjena za metale, a očekuje se i njena rutinska primjena u skorjoj budućnosti, iako naravno, ima očit nedostatak elastičnosti. Kao materijali za izradu pomoćnih dijelova naprava često se koriste guma, lateks i elastomerna plastika zbog elastičnosti te magneti kao pojačivači sile (Ortiz i sur., 2011; Proffit i sur., 2009).

2.3. METALI

Metali su kemijski elementi specifičnih svojstava. U prirodi ih nalazimo najviše kao rude koje čine oko 25% Zemljine kore. Kemijski su posebni po svojoj sposobnosti formiranja jedinstvenog tipa veza, metalne veze. Atomi metala izrazito lako otpuštaju elektrone iz vanjske ljuske, dolazi do delokalizacije elektrona i formiranja metalne veze između dva atoma metala. Prijelazni metali imaju posebno izraženo to svojstvo. Priroda metalnih veza odgovorna je za svojstva metala poput vodljivosti, otpornosti i čvrstoći. Općenito, metali su gušći od nemetala, ali unutar skupine metala postoji veliki raspon gustoća (litij je najmanje gustoće od $0,534 \text{ gcm}^{-3}$, a najgušća je živa gustoće $22,59 \text{ gcm}^{-3}$). Rjeđi, lakši metali poput titana, magnezija i aluminija imaju veću komercijalnu važnost (Mortimer, 1975). Atomi unutar metala raspoređeni su u kristalne

rešetke, kubične i heksagonalne, što je također odgovorno za posebna fizikalna svojstva metala (Holleman i Wiberg, 2001).

Metale se može kategorizirati na temelju nekoliko fizikalnih svojstava te na temelju kemijskih svojstava. Druga kategorizacija vidljiva je u periodnom sustavu elemenata i ona obuhvaća alkalijske metale, zemnoalkalijske metale, prijelazne metale, posttranzicijske metale i metaloide (IUPAC, 2005). Prema fizikalnim svojstvima mogu se izdvojiti kategorije poput krutih metala (koji nisu savitljivi), refraktornih metala (s izuzetnom otpornošću na toplinu i trošenje), bijelih metala (lako taljivi), teških metala (visoke gustoće i često toksični) te plemenitih metala (otporni na oksidaciju i koroziju) (Russell i Lee, 2005). Upravo su fizikalna svojstva važna za odabir metala koji će se upotrijebiti u medicini (favoriziraju se legure, refraktorni i plemeniti metali).

2.4. LEGURE

Legure su smjese više metala ili metala s drugim elementima koje zadržavaju metalna svojstva poput vodljivosti i otpornosti, a opet dobivaju sva željena svojstva iz drugih elemenata. Primjeri legura su čelik, mjed i bronca. Širok je raspon industrija koje koriste legure, od građevinske, preko automobilske do medicinske industrije (Britannica, 2019).

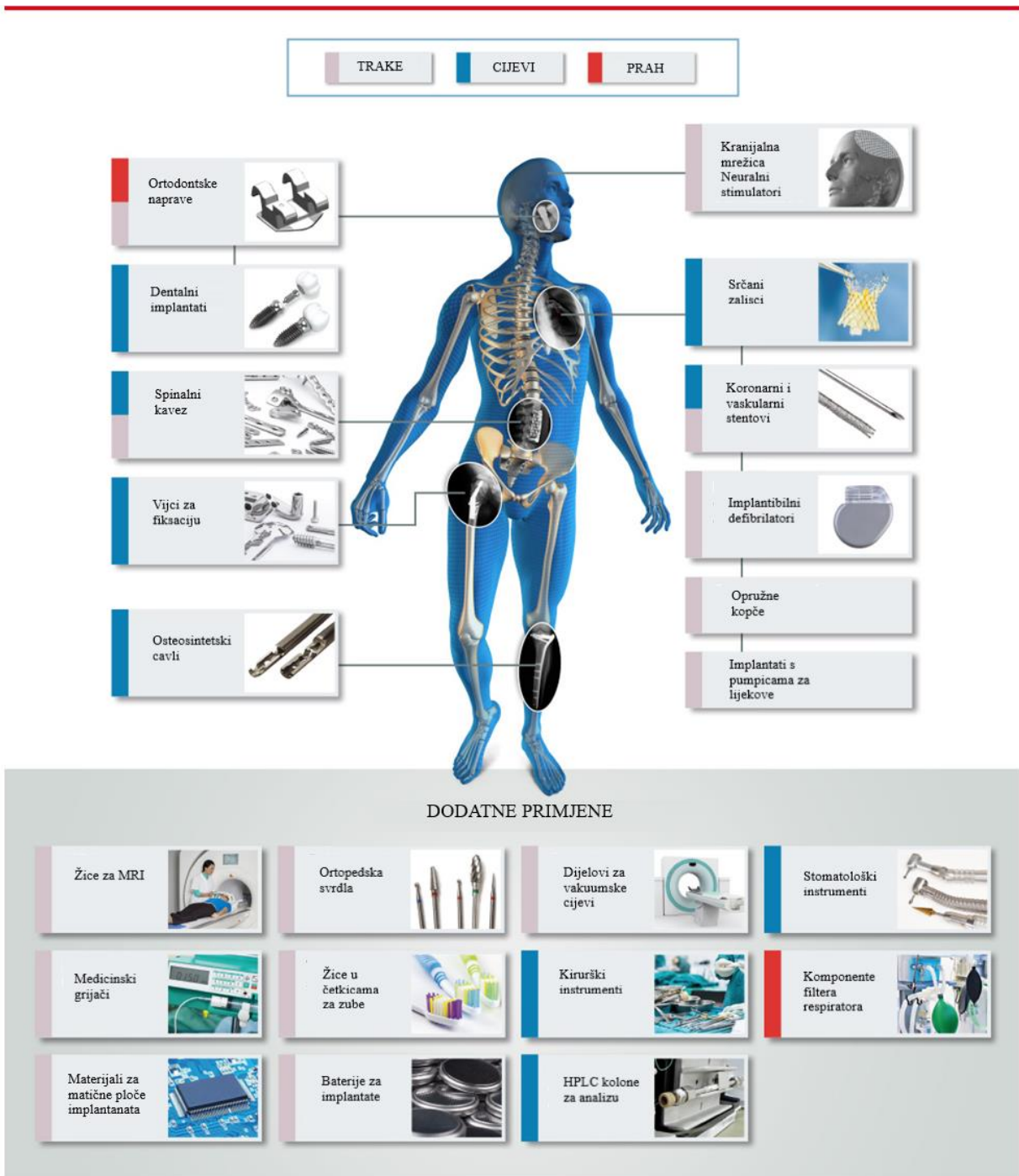
2.5. METALI U MEDICINI

Metali se u medicini koriste za spektar različitih stvari, od izrade implantata (umjetnih zglobova), fiksiranja kostiju, intrauterlnih kontracepcijskih uređaja pa sve do ortodontskih naprava, kao što je i vidljivo na slici 2. Prednosti korištenja metala su čvrstoća, elastičnost, električna vodljivost i otpornost na lomove. Ta svojstva daju metalima prednost pred keramikom i polimerima što se tiče korištenja u medicini. S obzirom na to da je sigurnost na prvom mjestu, uvijek se cilja na korištenje nisko korozivnih metala poput kobalta, molibdena, kroma i titana te različitih legura. Uz to, konstantno se radi na istraživanju novijih i boljih materijala te načina poboljšavanja svojstava metala poput otpornosti na koroziju i trošenje, mehaničkih svojstava te iznimno važne biokompatibilnosti s ljudskim organizmom. Trenutno najčešće korišteni metali su

titan, legure poput nehrđajućeg čelika, legura s plemenitim metalima i nekorozivnim metalima, nikal, željezo i magnezij, no koriste se i mnogi drugi metali. Odabir metala za izradu dakako ovisi o svrsi i položaju medicinske naprave u tijelu (Hanawa, 2012).

Pri izradi bilo kakvih metalnih medicinskih naprava koje dolaze u direktan duži kontakt s pacijentovim organizmom, krucijalno je obratiti pozornost na biokompatibilnost odabranih materijala s organizmom. Kako bi se njihova biokompatibilnost odredila, naprave moraju proći niz rigoroznih testiranja, bez obzira na poznata mehanička, kemijska i fizikalna svojstva. Testiranja su standardizirana od strane Međunarodne organizacije za standardizaciju (ISO) te nacionalnih tijela. Testovima se provjeravaju citotoksičnost, izazivanje iritacija, akutna sistemska toksičnost i niz drugih svojstava naprava ključna za njihovo odobravanje za korištenje unutar organizma. Testovi nisu ujednačeni za sve naprave radi različitosti u sastavu, građi i ciljevima naprava (Li i sur., 2015).

Također, postoje i metode kojima se djeluje na kemijska i fizikalna svojstva metala koja utječu na njihovu biokompatibilnost te ih se tako čini primjerenijima za korištenje u medicini. Primjeri toga su djelovanja na površinu metala kako bi se smanjila korozivnost, a uključuju premazivanje nekorozivnim supstancama poput hidroksiapatita i različitih oksida, implantaciju iona poput dušikovih i kisikovih iona te fizikalne i kemijske promjene teksture površine metala (Asri i sur., 2017).



Slika 2. Prikaz raznovrsnih vanjskih i unutarnjih primjena metala u različitim oblicima u medicini (prilagođeno prema Ametek, 2021).

2.6. TOKSIČNOST METALA

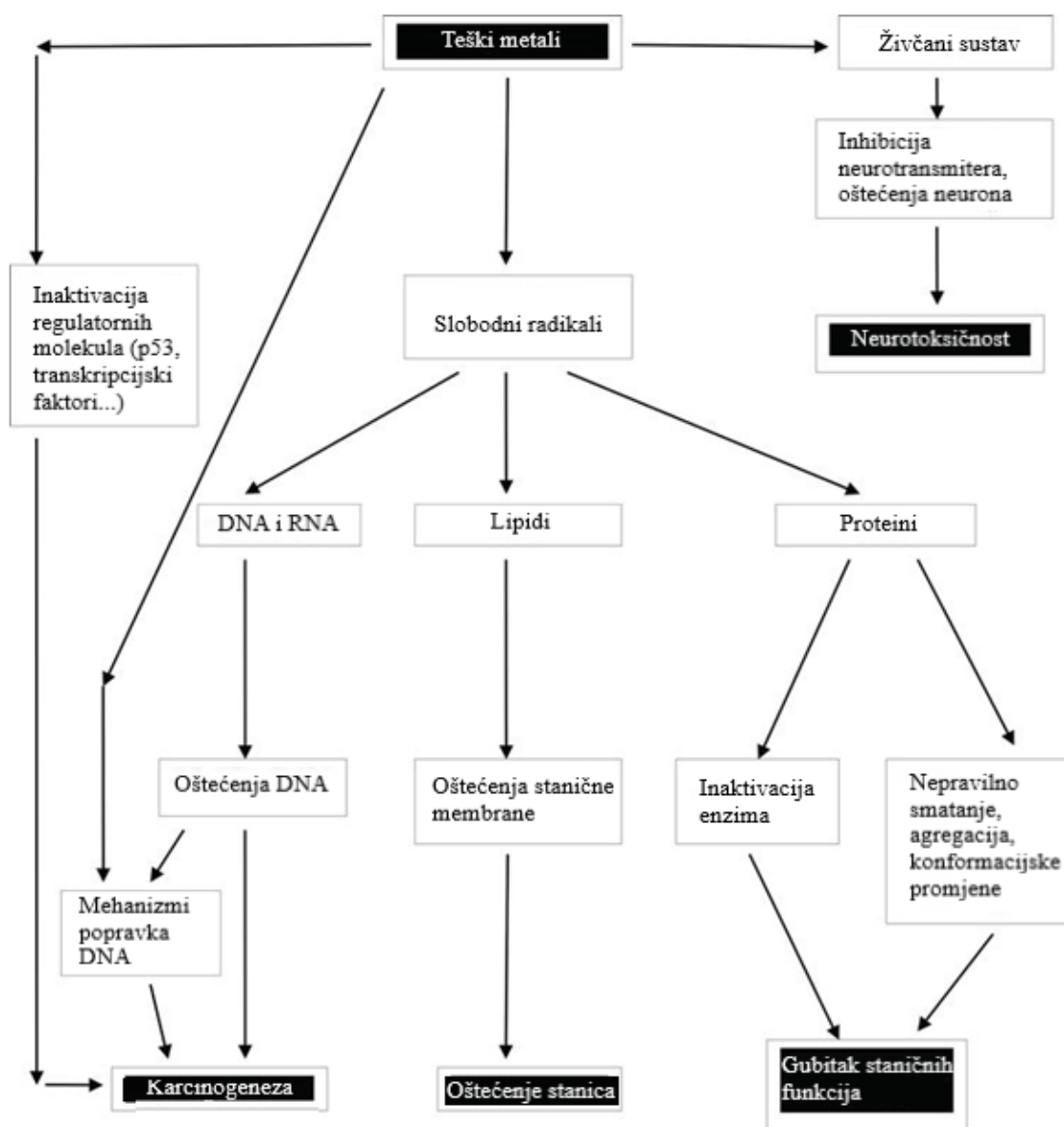
Općenito, iako su sastavni dio ljudskog tijela, metali su često toksični ili mogu postati toksični određenim procesima. Željezo, magnezij i kalij primjeri su metala bez kojih ljudski organizam ne bi mogao funkcionirati. S druge strane olovo, živa i arsen primjeri su izrazito toksičnih metala. Toksičnost kod metala, kao i kod drugih tvari, ovisi i o dozi te obliku u kojem metal dolazi u kontakt s organizmom. Na djelovanje metala u organizmu utječu i faktori poput interakcija s esencijalnim metalima, kompleksiranja s proteinima, starosti jedinke (djeca bolje apsorbiraju metale te je kod njih izraženiji genotoksični učinak), životnih navika jedinke (pušenje, alkohol) i imunološkog statusa jedinke (Durgo, 2020). Također, djelovanje metala može biti i sinergističko te može doći do pojačanog toksičnog djelovanja kada su u pitanju smjese metala (Primožič i sur., 2021).

Metali se izuzetno lako nakupljaju u tijelu te ulaze u hranidbeni lanac. Sama toksičnost temelji se na nekoliko svojstava metala. Jedno od njih je to da su metali pozitivno nabijeni te lako ulaze u komplekse s negativno nabijenim biološkim molekulama (Durgo, 2020).

Nakupljanje metala u krvnim žilama rezultira smanjenjem razine dušikovog oksida koji je iznimno važan za relaksaciju krvnih žila. Nakupljanje u žlijezdama pak, može rezultirati hormonalnim disbalansom i razvojem stanja poput osteoporoze, hipotireoidizma i preranog starenja. Kod dijabetičara je moguće da dođe do prestanka odgovaranja organizma na terapiju. Teški metali su sistemski toksini s direktnim utjecajem na živce, urinarni sustav, razvoj embrija i metaboličke procese. Oni uzrokuju izlazak kalcija iz kostiju kako bi se održao pH sustava jer sami izazivaju povećani aciditet, uzrokuju upale arterija i tkiva i otvrdnuće arterija. Lako prolaze barijere te tako mogu proći kroz placentu te ući u majčino mlijeko. Ruše antioksidacijski balans stanice, uzrokujući prooksidativni učinak i stvaranje slobodnih radikala (Durgo, 2020).

Djelovanja metala u organizmu očituju se na nizu sustava, kao što je i vidljivo na slici 3. Ukoliko dođe do vezanja metala na neke enzime, često dolazi do njihove inaktivacije (npr. vezanje olova umjesto cinka na δ -aminolevulinska kiselina dehidratazu, što rezultira inhibicijom sinteze hema). Također tako može doći i do inhibicije respiratornih enzima u mitohondrijima i stanične smrti. Poznato je i da metalni ioni lako ulaze u interakcije s DNA, tako povećavajući vjerojatnost da dođe do mutacije u istoj, što ih čini mutagenima i kancerogenima. Jedan od metala koji tako

djeluje je nikal. Određeni metali, poput kadmija i žive su nefrotoksični jer se nakupljaju u bubrezima. Isto tako, metali vezani na organske spojeve lako prelaze krvno-moždanu barijeru i oštećuju centralni živčani sustav. Interakcije metala s organskim spojevima u tijelu često rezultiraju i izmijenjenom endokrinom kontrolom te direktnim oštećenjem spolnih organa (kadmij oštećuje testise, olovo nakupljanjem inhibira spermatogenezu, uzrokuje degeneraciju tkiva i atrofiju Leydigovih stanica). Metalna prašina (nikal, krom, arsen) dokazano iritira te djeluje kancerogeno na respiratorni sustav (Durgo, 2020; Godwill i sur., 2019).

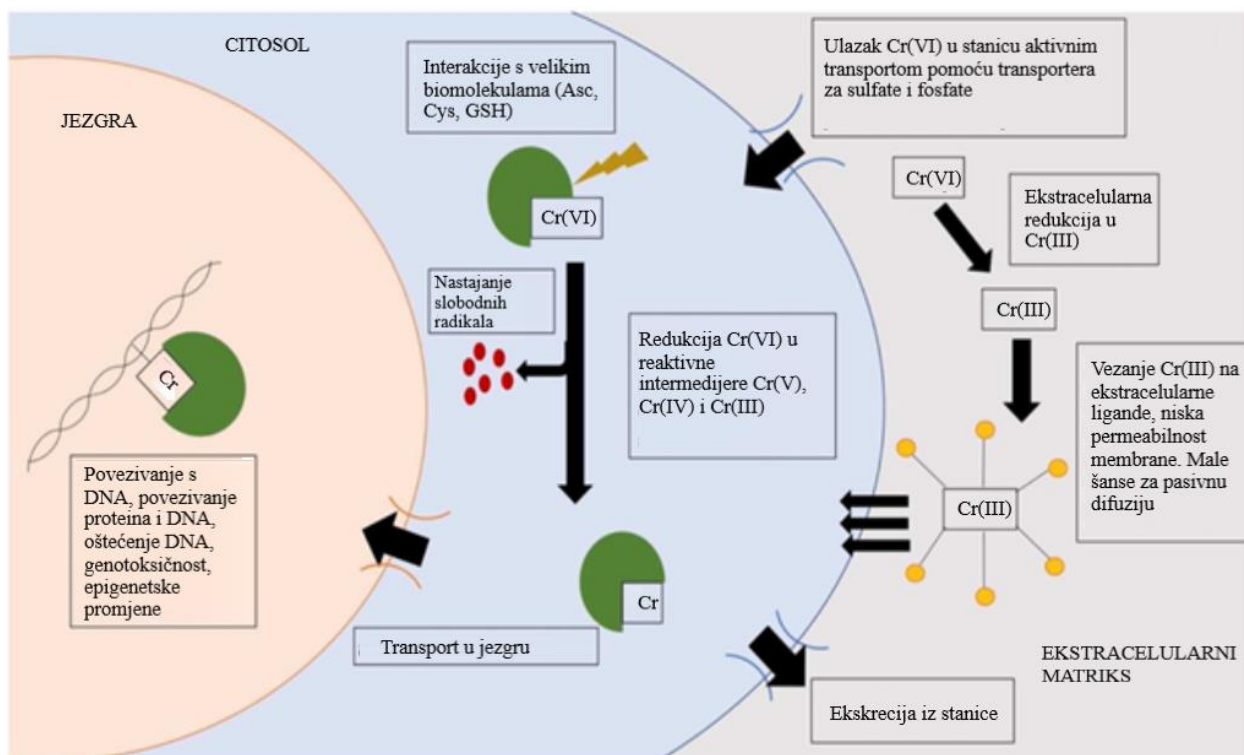


Slika 3. Općenita shema djelovanja metala na ljudski organizam (prilagođeno prema Godwill i sur., 2019).

2.6.1. Toksičnost kroma

Krom se javlja u različitim oksidacijskim oblicima, a biološki su najznačajniji trovalentni i heksavalentni krom. Heksavalentni oblik nije topljiv u vodi i lakše se apsorbira u stanice, gdje se reducira u trovalentni krom. U takvom obliku on se može vezati s organskim spojevima i izazvati toksični i kancerogeni učinak (Durgo, 2020). Moguć je unos u ljudski organizam, osim kroz direktni kontakt, kroz pitku vodu, jer je krom česti kontaminant u njoj. Mehanizmi toksičnosti kroma još nisu u potpunosti poznati, no zna se da prolazi kroz staničnu membranu putem nespecifičnih anionskih transportera, jer je strukturno sličan sulfatnim i fosfatnim anionima. U stanici ga reducirati može veliki broj molekula, a najčešće u reakcijama redukcije sudjeluju vodikov peroksid, glutation reduktaza, askorbinska kiselina, cistein i glutation. Tako nastaju intermedijeri peterovalentnog, četverovalentnog i trovalentnog kroma, hidroksilni radikali i tiolni radikali. Svi ti spojevi lako mogu narušiti strukturu i funkciju DNA, lipida i proteina te u krajnosti dovesti do apoptoze ili nekroze stanice, što je prikazano i vizualno na slici 4. Dokazano je da krom utječe na epigenetičke promjene točnije na metilaciju DNA i posljedično utišavanje ekspresije određenih gena (najčešće tumor supresora). Osim toga, krom djeluje i na acetilaciju i biotinizaciju histona te na ekspresiju miRNA i time također utječe na ekspresiju različitih gena.

Također, krom djeluje na respiratorni sustav, bubrege, kožu, jetru, gastrointestinalni sustav, kardiovaskularni sustav, krvotvorne organe i reproduktivni sustav, a primijećeno je i erozijsko i diskoloracijsko djelovanje na zube. Zbog mogućih interakcija s DNA, smatra ga se karcinogenom i mutagenom tvari te ga je Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) klasificirala kao kancerogen za ljude kada ga se udahne. Ukoliko pak dođe do ekstracelularne redukcije heksavalentnog kroma u trovalentni krom, putem sline, želučane kiseline i drugih tjelesnih tekućina, velika je vjerojatnost kako će taj krom biti bezopasan za tijelo i brzo izlučen iz istog (ATSDR, 2021; Sun i sur., 2015).

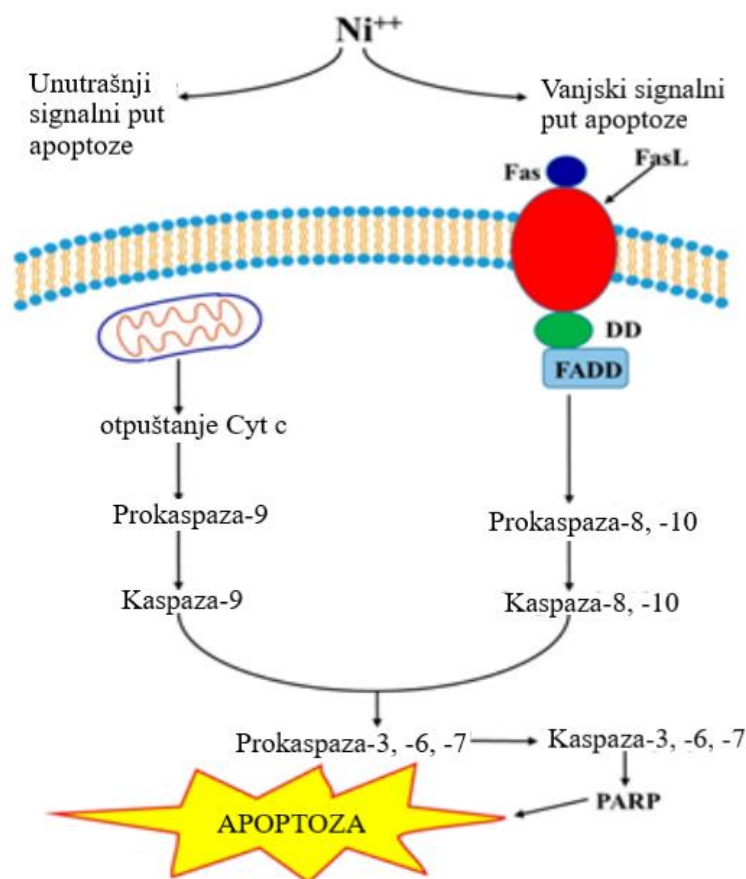


Slika 4. Shema mogućih djelovanja kroma u organizmu
(Prilagođeno prema DesMarais i Costa, 2019).

2.6.2. Toksičnost nikla

Nikal je široko rasprostranjen element (voda, zrak, tlo), no njegova funkcionalna uloga za ljudski organizam još uvijek nije poznata. Ono što jest poznato su njegovi štetni učinci poput alergijskih reakcija, kardiovaskularnih i bubrežnih bolesti, fibroze pluća te razvoja raka pluća i nazalnih puteva. Spada u najčešće metalne alergene, na njega je alergično 10-15 % svjetske populacije. U prirodi se nalazi u nekoliko oksidacijskih stanja (od -1 do 4), a najčešće se u okolišu pronalazi u +2 stanju (Ni^{2+}). Takav oblik nikla spada u esencijalne elemente za određene niže organizme koji ga koriste kao kofaktor za određene enzime. Takvih enzima, međutim, u ljudskom organizmu nema, tako da se u ljudi očituju loši učinci na zdravlje. Glavni put unosa je respiratorni put, no moguć je i oralni unos kontaminiranom hranom i/ili vodom. Molekularni mehanizmi toksičnosti nikla još nisu poznati, ali zna se da izaziva oksidativni stres i mitohondrijsku disfunkciju. Nekoliko istraživanja na životinjama pokazalo je kako nikal inaktivira određene

enzime poput superoksid dismutaze i katalaze, dok istovremeno povećava ekspresiju kaspaza i proonkogenih proteina. Može se vezati na histonske komplekse te tako izazvati heterokromatinizaciju i utjecati na ekspresiju gena. Također, primijećeno je i da nikal može izazvati bubrenje mitohondrija i nestanak krista u mitohondrijima. Vezanje nikla na određene proteine može aktivirati vanjski signalni put apoptoze (tzv. put receptora smrti) i tako dovesti do umiranja stanica, a to je i prikazano na slici 5. Kao sastavni dio ortodontskih naprava, nikal ima abrazivno i alergeno djelovanje. Zbog pH vrijednosti i sastava sline dolazi do otpuštanja iona metala koji čine napravu, tako i nikla. Takvi ioni mogu izazvati kontaktni dermatitis, biti citotoksični i izazvati oštećenja DNA. Europska agencija za kemikalije (ECHA), stoga strogo regulira maksimalno dozvoljene koncentracije nikla u kovanicama, nakitu, ortodontskim napravama i drugim proizvodima koji dolaze u kontakt s kožom. Također, prije korištenja medicinskih naprava koje sadrže nikal, preporuča se provođenje testova na alergene kako bi se sigurnost pacijenta stavila na prvo mjesto (Genchi i sur., 2020a).



Slika 5. Apoptoza inducirana Ni²⁺ ionima (Prilagođeno prema Genchi i sur., 2020a).

2.6.3. Toksičnost kobalta

Kobalt je element svojstava sličnih onima željeza i nikla. Iako je esencijalan kao sastavnica vitamina B₁₂, poznatog i kao cijanokobalamin, u bilo kojem drugom obliku kobalt može biti toksičan za ljudski organizam, pogotovo u prevelikim dozama. U prirodi se kobalt najčešće nalazi u dvovalentnom i trovalentnom obliku. Dvovalentni oblik lako se veže na biomolekule, receptore i ionske kanaliće. Također, ioni kobalta, baš kao i krom i nikel, dovode do nastanka niza slobodnih radikala te mogu dovesti do oštećenja mitohondrija. Osim toga, vezanjem na različite molekule kobalt može poremetiti homeostazu željeza i kalcija u organizmu, utjecati na eritropoezu, izazvati genotoksični učinak te poremetiti sustav za popravak DNA. Simptomi trovanja kobaltom očituju se kao neurološki, endokrini i kardiovaskularni problemi. Najčešći simptomi su vrtoglavica, mučnina, problemi s vidom, problemi sa štitnjačom, astma, fibroza pluća te kontaktni dermatitis ukoliko je kontakt s kobaltom postignut preko kože. IARC klasificira prašinu mješavine kobalta i volframovog karbida „vjerojatno kancerogenom“, jer se inhalacija tih čestica povezuje s razvojem raka pluća. Paustenbach i suradnici su u radu objavljenom 2013. u časopisu „Critical Reviews in Toxicology“, u kojem je detaljno objašnjena toksičnost kobalta, opisali neke od mehanizama djelovanja kobalta (Leyssens i sur., 2017).

2.6.4. Toksičnost kadmija

Kadmij je toksični neesencijalni prijelazni metal opasan i za ljude i za životinje. U prirodi se najčešće nalazi kao industrijski zagađivač. U kontakt s kadmijem najčešće se tako i dolazi - putem kontaminirane hrane i vode. Vulkanska aktivnost također znatno povećava koncentraciju kadmija u zraku koji se zatim akumulira u okolišu. Unos u ljudski organizam primarno se odvija respiratornim i gastrointestinalnim putem, dok je apsorpcija preko kože rijetka. Jednom kada uđe u organizam, kadmij se krvotokom transportira po tijelu vezan za albumin i eritrocite te se često nakuplja u bubrežima, jetri i gastrointestinalnom traktu. To nakupljanje dovodi do renalne i jetrene disfunkcije, formiranja plućnih edema, oštećenja testisa, osteomalacije te prestanka rada nadbubrežnih i hematopoetskih žlijezdi. Najpoznatiji oblik trovanja kadmijem naziva se Itai-itai bolest, a prvi put primijećena je u Japanu 1960-ih godina, nakon što su vode u rižinim poljima bile izuzetno kontaminirane kadmijem. Mehanizmi samog toksičnog djelovanja iona kadmija

uključuju stvaranje slobodnih radikala, vezanje na biomolekule poput antioksidativnih i regulacijskih proteina, pojačanu ekspresiju kaspaze 3 te smanjenu ekspresiju tumor supresora bcl-2 i p-53. IARC ga sukladno svemu navedenom klasificira kao kancerogen za ljude. Također, u mitohondriju djeluje nizom mehanizama koji interferiraju s normalnom funkcijom mitohondrija, kao što se vidi i na slici 6, a ističe se vezanje na proteine respiratornog lanca. Iz organizma se izlučuje slinom, urinom te majčinim mlijekom (Genchi i sur., 2020b; Rafati Rahimzadeh i sur., 2017).



Slika 6. Prikaz djelovanja iona kadmija na mitohondrij
(Prilagođeno prema Genchi i sur., 2020b).

2.6.5. Terapija nakon trovanja metalima

Česta terapija za trovanje metalima jest jednostavno korištenje kelirajućih agenasa prema kojima će metali imati veći afinitet nego prema organskim spojevima u organizmu. Često se radi o ligandima koji sadržavaju O-, S-, i N- (-OH, -COOH, -S-S- i -NH₂) skupine i vežu metale. Važno je da se agensi mogu distribuirati do mjesta skladištenja ciljanog metala, da tvore netoksične

komplekse, da ne reagiraju s esencijalnim metalima te da se novonastali spojevi mogu lako izlučiti (Durgo, 2020). U praksi se koriste kelatori poput dimerkaprola (tzv. *British anti-Lewisite* (BAL)), kalcij natrij etilendiamin tetraoctena kiselina (CaNa_2EDTA) i D-penicilamina. Iako oni vežu metale te tako smanjuju njihovu koncentraciju u organizmu, imaju i svojih mana. BAL se mora davati intramuskularnim injektiranjem, što je bolno za pacijente, a i moguća je pojava alergijskih reakcija. CaNa_2EDTA pak, ima ograničeno djelovanje jedino na metale koji nisu ušli u stanice, jer ni on sam ne može proći staničnu membranu. DPA je teratogen te može izazvati anafilaktički šok kod pacijenata alergičnih na penicilin. S obzirom na sve mane kelatora, sve se više istražuje uzimanje antioksidansa poput L-karnitina, taurina i melatonina ili konzumacije hrane bogatih antioksidansima (češnjak, kurkruma, sezamovo ulje...) jer oni znatno ublažavaju štetno oksidacijsko djelovanje metalnih iona na organizam (Genchi i sur., 2020; Amadi i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biološki test sustavi

Kao biološki test sustavi u izradi ovog rada upotrebljavane su stanične linije humanih stanica iz zbirke *American Type Culture Collection* (ATCC, SAD) za testiranje citotoksičnosti, prooksidativne aktivnosti i genotoksičnosti te test plazmid $\phi\text{X-174 RF I}$ (Promega, SAD) za ispitivanje prooksidativnog učinka na DNA.

3.1.1.1. Humane stanice

Korištene su četiri humane stanične linije: Hep G2, CAL 27, AGS i Caco2. Hep G2 stanice su stanice karcinoma jetre, CAL 27 stanice su epitelne stanice karcinoma jezika, AGS su stanice adenokarcinoma želuca, a Caco2 epitelne stanice kolorektalnog karcinoma. Sve te stanice predstavljaju tip stanica na koje bi *in vivo* najviše mogli djelovati metali iz ortodontskih naprava. Sve su stanice uzgajane na način da su rasle u monosloju u T-boci u kompletiranom mediju RPMI (eng. *Roswell Park Memorial Institute*) u kojeg je dodana 10 %-tna otopina fetalnog goveđeg

seruma (eng. *fetal bovine serum*, FBS). Stanice su uzgajane u inkubatoru u atmosferi s 5 % CO₂ na temperaturi od 37 °C. Nakon uzgoja, za potrebe korištenja u eksperimentima, stanice su prevedene u suspenziju korištenjem 0,25 %-tne otopine tripsina. Daljnje djelovanje tripsina je zaustavljeno dodatkom medija sa serumom. Brojanjem pomoću Türken-Bürkove komorice određen je broj stanica u suspenziji u T-boci te izračunata koncentracija iz koje je određen potreban volumen te suspenzije kako bi se u radnoj suspenziji postigla željena koncentracija stanica (ovisno o metodi za koju se koriste stanice). Iz te radne suspenzije, stanice su bile nasađene u 4 96-jažične ili 24-jažične pločice (ovisno o metodi) te inkubirane preko noći pri istim uvjetima kao i u T-bocama.

3.1.1.2. Plazmid ϕ X-174 RF I

Za testiranje genotoksičnosti korištena je smrznuta izvorna otopina test plazmida ϕ X-174 RF I. Neposredno prije korištenja kiveta s izvornom otopinom plazmida je izvađena iz frižidera te je pripravljena otopina potrebne koncentracije koristeći izvornu otopinu i TE (Tris-EDTA) pufer u željenim omjerima.

3.1.2. Otopine

3.1.2.1. Uzorci

Kao testni uzorci korištene su ukoncentrirane otopine umjetne slina (Toni-Zucchi umjetna slina, pH 4.8) u kojoj su dijelovi ortodontskih naprava (bravice, lukovi, ligature, prstenovi i svi dijelovi zajedno) stajali određeno vrijeme (3, 7 i 14 dana), uz jednu otopinu čiste umjetne slina kao kontrolu, dakle ukupno 16 uzoraka. Uzorci su pripremljeni na Zavodu za kemiju, biokemiju i kliničku kemiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci na način da je u ukupni volumen od 100 mL umjetne slina dodano po 5 lukova ili 50 bravica ili 50 ligatura ili 10 prstenova ili 5 lukova, 50 bravica i 50 ligatura. Testni su uzorci bili 20 puta koncentriraniji u odnosu na fiziološku normalu, tj. stvarnu koncentraciju u ustima pacijenata. Mora se uzeti u obzir kako su sva tri testirana vremenska perioda i dalje relativno kratka u odnosu na stvarno prosječno vrijeme nošenja ortodontskih naprava. Detaljna kemijska analiza otopina provedena je na Institutu Ruđer Bošković

kako bi se znao točan udio metala u pojedinim otopinama i tablica koja prikazuje rezultate nalazi se u prilogu 1.

3.1.2.2. Fosfatni pufer

Fosfatni pufer je korišten za pripremu razrjeđenja različitih spojeva, ispiranje stanica i pripravu agaroznog gela za komet metodu. Sastav fosfatnog pufera je naveden u tablici 1.

Tablica 1. Sastav fosfatnog pufera.

SASTOJAK	KOLIČINA
NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	1,15 g
K ₂ HPO ₄	0,20 g
Destilirana voda	do 1000 mL

3.1.2.2. Neutral Red

Neutral Red boja korištena je za bojanje stanica pri određivanju postotka preživljenja Neutral Red metodom. Sastav otopine naveden je u tablici 2.

Tablica 2. Sastav Neutral Red otopine

SASTOJAK	KOLIČINA
Neutral Red boja	200 µL
RPMI medij	20 mL

3.1.2.3. Otopina za odbojavanje

Otopina za odbojavanje korištena je pri provođenju Neutral Red metode za odbojavanje stanica. Sastav otopine za odbojavanje naveden je u tablici 3.

Tablica 3. Sastav otopine za odbojavanje

SASTOJAK	KOLIČINA
Etanol	50,00 mL
Destilirana voda	49,00 mL
Ledena octena kiselina	1,00 mL

3.1.2.4. Diklorofluorescein-diacetat (DCFH-DA)

DCFH-DA korišten je za tretiranje stanica pri ispitivanju prooksidativnog učinka uzoraka DCFH-DA metodom. Sastav otopine naveden je u tablici 4.

Tablica 4. Sastav otopine DCFH-DA

SASTOJAK	KOLIČINA
DCFDA	500 µL
PBS	19,5 mL

3.1.2.5. TE pufer

TE pufer korišten je za pripremu otopina željenih koncentracija pri određivanju učinka istraživanih otopina na superzavijenost plazmida. Sastav TE pufera naveden je u tablici 5.

Tablica 5. Sastav TE pufera.

SASTOJAK	KOLIČINA
Tris (tris(hidroksimetil)aminometan)	1,00 mL
EDTA (etliendiamintetraoctena kiselina)	200,00 µL
Destilirana voda	do 100 mL

3.1.2.6. TAE pufer

TAE pufer korišten je za pripremu agaroznih gelova te kao pufer za provođenje elektroforeze u svrhu utvrđivanja stupnja superzavijenosti plazmida nakon izlaganja plazmida istraživanim otopinama. Sastav mu je naveden u tablici 6.

Tablica 6. Sastav TAE pufera.

SASTOJAK	KOLIČINA
Tris	48,40 g
EDTA	3,70 g
Octena kiselina	11,40 mL
Destilirana voda	do 1000 mL

3.1.2.7. Pufer za lizu

Pufer za lizu korišten je pri provođenju komet analize za liziranje stanica. Njegov sastav naveden je u tablici 7.

Tablica 7. Sastav pufera za lizu stanica.

SASTOJAK	KOLIČINA
NaCl	130,00 g
EDTA	29,225 g
Tris	1,078 g
Na-lauril-sarkozinat	8,90 g
Destilirana voda	do 890 mL
Triton X-100	1 mL (neposredno prije uporabe)
DMSO (dimetil sulfoksid)	10 mL (neposredno prije uporabe)

3.1.2.8. Pufer za elektroforezu

U ovom je puferu provedena elektroforeza pri provođenju komet analize. Sastav ovog pufera naveden je u tablici 8.

Tablica 8. Sastav pufera za elektroforezu.

SASTOJAK	KOLIČINA
NaOH	30,00 mL
EDTA	5,00 mL
Destilirana voda	do 1000 mL

3.1.2.9. Etidij bromid

Etidij bromid korišten je kao interkalirajuća boja za vizualizaciju zavijenog i superzavijenog plazmida nakon tretmana s istraživanim otopinama koji su formirali vrpce nakon provedene elektroforeze. Sastav otopine naveden je u tablici 9.

Tablica 9. Sastav otopine etidij bromida

SASTOJAK	KOLIČINA
Etidij bromid	75,00 μ L
Destilirana voda	750,00 mL

3.1.3. Laboratorijski pribor

3.1.3.1. Pribor

- Automatske pipete od 20, 200 i 1000 μ L
- Erlenmayerove tikvice različitih volumena
- FalconTM epruvete
- Kivete po Eppendorfu različitih volumena
- Kutijica za predmetna stakalca
- Laboratorijske žlice
- Marker za pisanje
- Menzura od 20 mL
- Mikrotitarske pločice s 24 jažice

- Mikrotitarske pločice s 96 jažica
- Nastavci za automatske pipete
- Odmjerne tikvice različitih volumena
- Parafilm
- Pipete od 5, 10, 20 i 25 mL
- Pištolj za pipetiranje
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Predmetna stakalca od brušenog stakla
- Staklene epruvete
- Stalci za kivete i epruvete
- T-boce
- Türken-Bürkova komora za brojanje
- Višekanalska automatska pipeta

3.1.3.2. Kemikalije

- Agaroz niske točke topljivosti (eng. LMP, *Low melting point*), Invitrogen, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Agaroz, Biolife, Italija
- Destilirana voda
- Diklorofluorescein-diacetat (DCFH-DA), Sigma Aldrich, Kanada
- Dimetilsulfoksid (DMSO), Merck, Njemačka
- EDTA, Kemika, Hrvatska
- Etanol, p.a., Kemika, Hrvatska
- Etidij bromid, Sigma Aldrich, Kanada
- Fetalni goveđi serum, toplinski inaktiviran, Capricorn Scientific GmbH, Njemačka
- Glicerol, Gram-mol d.o.o, Hrvatska
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), Riedel-De Hean, Njemačka
- Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Natrijev hidroksid, Kemika, Hrvatska

- Natrijev klorid (NaCl), Carlo Erba Reagents, Francuska
- Natrijev lauril sarkozinat, Sigma Aldrich, Kanada
- Neutral Red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), Feinchemie K.-H. Kallies KG, Njemačka
- Octena kiselina, p.a., Kemika, Hrvatska
- RPMI 1640 medij, Capricorn Scientific, GmbH, Njemačka
- Tripsin, Capricorn Scientific GmbH, Njemačka
- Tris, Invitrogen, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Triton X-100, Sigma Aldrich, Kanada

3.1.3.3. Aparatura

- Analitička vaga 1712 Mp8 SilverEdition, Sartorius, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Aparatura za termostatiranje BTE-S, Termo-medicinski aparati, Hrvatska
- Centrifuga za kivete po Eppendorfu HC-240, Tehnica-Železniki, Slovenija
- Čitač mikrotitarskih pločica, Cecil Instruments Ltd, Engleska
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Forma Scientific, SAD
- Komora za sterilni rad, Iskra, Slovenija
- Invertni svjetlosni mikroskop, Optika Microscopes, Italija
- Zamrzivač: Ultralow temperature freezer, New Brunswick Scientific, SAD
- Frižider, Gorenje, Slovenija
- Fluorescentni mikroskop, Leitz Wetzlar, Njemačka
- Kada za gel elektroforezu komet test, Bio-Rad, SAD
- Kadica za gel elektroforezu, Bio-Rad, SAD

3.1.4. Računalni programi

Za analizu rezultata, dobivanje statističkih podataka te izradu grafičkih prikaza rezultata eksperimenta korišteni su Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, SAD), JASP 0.14.1.0. (Sveučilište u Amsterdamu, Nizozemska), program PyCharm Community Edition 2020.2.3.

(JetBrains, Češka Republika), GelAnalyzer 19.1. (www.gelanalyzer.com, Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc) te Comet Assay II (Instem, Ujedinjeno Kraljevstvo).

3.2 METODE

3.2.1. Ispitivanje citotoksičnosti metala u otopinama umjetne sline Neutral Red (NR) metodom

Citotoksični učinak svih uzoraka u 4 različite koncentracije ispitan je na 4 već navedene stanične linije, a korištena je Neutral Red metoda. Metoda je jedna od najčešće korištenih za određivanje citotoksičnosti. Neutral Red (3 - amino - 7 - dimetilamino - 2 - metilfenazin hidroklorid) je slaba kationska boja koja neionskom difuzijom može ući u stanicu i vezati se na anionske dijelove lizosomskog matriksa. S obzirom na to da se Neutral Red boja u stanicu unosi aktivnim transportom, za to joj je potrebna neoštećena stanična membrana te sama mogućnost unosa ovisi o mogućnosti stanice da preko proizvodnje ATP-a održava gradijent pH. Neki spojevi mogu oštetiti membranu ili uzrokovati smrt stanice, pa u takve stanice boja ne može ući. U živim stanicama s funkcionalnom membranom će se boja nakupljati u lizosomima, što će biti mjerljivo nakon dodatka otopine za odbojavanje. Naime, apsorbancija stanične suspenzije na 540 nm i broj preživjelih stanica su proporcionalni (Repetto i sur., 2008).

Korišteni protokol je prilagođen prema Repetto i sur., 2008. Po 100 μL suspenzije stanica koncentracije 5×10^4 stanica mL^{-1} je nasađeno u jednu jažicu 96-jažične mikrotitarske pločice. Stanice su uzgajane 24 h u inkubatoru na temperaturi od 37 °C i atmosferi s 5 % CO_2 . Nakon inkubacije, stanice su tretirane s uzorcima umjetne sline (uključujući i čistu umjetnu slinu kao kontrolu) u rasponu koncentracija od 0,1, 0,5, 1 i 2 puta u odnosu na stvarnu fiziološku koncentraciju. Svaka koncentracija ispitana je u 6 paralela. Stanice su uzorcima bile izložene 24 h. Nakon završetka inkubacije, sa stanica se uklonio medij, te je na stanice dodana radna otopina Neutral Red boje koncentracije 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ te su se pločice inkubirale na 37 °C sat vremena. Nakon inkubacije sadržaj iz pločica se izbacio te se provelo ispiranje fosfatnim puferom (PBS). Nakon što je PBS izbačen iz pločica u svaku se jažicu nanijelo 100 μL otopine za odbojavanje. Tada su pločice bile spremne za mjerenje apsorbancije. Intenzitet obojenja je određen spektrofotometrijski,

mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 540 nm. Intenzitet obojenja je proporcionalan preživljenju stanica, koje se računa prema formuli 1 (Repetto i sur., 2008).

$$[1] \quad \% \text{ preživljenja} = (A_{540 \text{ nm uzorka}} / A_{540 \text{ nm kontrole}}) \times 100$$

3.2.2. Mjerenje prooksidativnog učinka pomoću diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA) metodom

Slobodni radikali, odnosno reaktivne kisikove vrste (eng. ROS, *Reactive Oxygen Species*) koji nastaju metabolizmom ili djelovanjem vanjskih faktora skupina su molekula koje u stanicama mogu imati različita biološka djelovanja koja utječu na stanične funkcije. Njihova koncentracija se može izmjeriti pomoću diklorodihidrofluorescein diacetata, nepolarnog spoja koji može difundirati kroz staničnu membranu. Nakon što uđe u citosol, hidrolizira se u nefluorescirajući DCHF karboksilatni anion, u reakciji koju kataliziraju unutarstanični enzimi. DCHF se tek u prisutnosti slobodnih radikala oksidira u DCF, odnosno dihidrofluorescein, koji je izrazito fluorescentan. Fluorescencija se mjeri pomoću fluorimetra pri valnim duljinama od 485 nm za ekscitaciju i 520 nm za emisiju. Intenzitet fluorescencije je mjera za prisutnost slobodnih radikala u stanici. Metoda ipak ima neka ograničenja, poput toga da stanice koje ulaze u apoptozu otpuštaju citokrom c iz mitohondrija, a on je protein koji izrazito potiče nastajanje DCF-a, što može rezultirati jakim signalima fluorescencije iako stanice više nisu vijabilne, a poznato je i kako nisu svi tipovi stanica jednako propusni za DCFH-DA. (Wang i Roper, 2014; Kalyanaraman i sur., 2012).

Kako bi se izmjerilo prooksidativno djelovanje uzoraka na stanice, korišten je protokol prilagođen prema Wang i Roper, 2014. Nasađivanje i tretman stanica identično je kao i u protokolu za određivanje citotoksičnog učinka, samo što su se stanice nasađivale u crne mikrotitarske pločice. Nakon tretmana u trajanju od 24 sata, sa stanica je uklonjen medij te je u jažice stavljena otopina DCHF-DA, koncentracije $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ te su pločice inkubirane 30 minuta na $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Tada su pločice bile spremne za mjerenje fluorescencije. Intenzitet izmjerene fluorescencije proporcionalan je nastanku ROS-ova te se kao mjera prooksidativne aktivnosti uzima omjer intenziteta fluorescencije uzorka i intenziteta fluorescencije kontrole (Wang i Roper, 2014).

3.2.3. Ispitivanje prooksidativnog učinka na DNA metodom linearizacije plazmida ϕ X-174 RF I

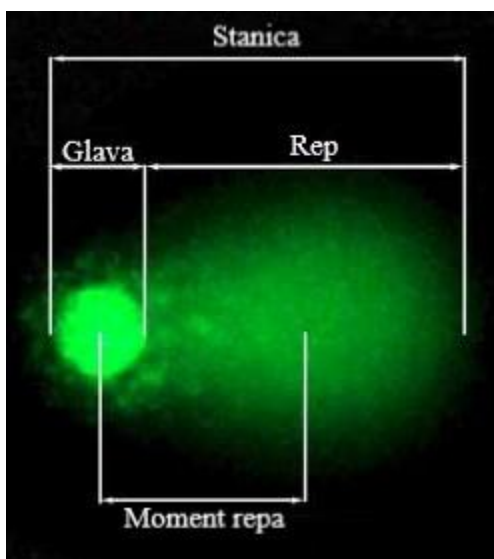
Za provođenje ispitivanja genotoksičnosti korištena je metoda linearizacije plazmida. Sam plazmid ϕ X-174 RF I je u superzavijenom obliku te putuje u agaroznom gelu određenom brzinom. Vodikov peroksid koji se dodaje u reakcijsku smjesu služi kao inducer oštećenja DNA, iako ih on sam ne uzrokuje (vidljivo u kontroli). Ukoliko tvar koja se testira ima prooksidativni učinak na DNA, odnosno uzrokuje lomove u DNA, plazmid se linearizira te putuje sporije u gelu od superzavijenog oblika plazmida (Vandjelovic i sur., 2012). Pri tome se, u ovisnosti o stupnju oštećenja (odnosno linearizacije) formiraju dvije vrpce na gelu, a mjerenjem intenziteta vrpce zavijenog, odnosno superzavijenog plazmida moguće je odrediti stupanj oštećenja plazmida.

Protokol je prilagođen prema Alsulami, 2016 te Vandjelovic i sur., 2012. U kivetama po Eppendorfu pripremljena je smjesa ukupnog volumena 30 μ L. Reakcijsku smjesu činili su: 0,3 μ g mL^{-1} plazmida, 0,3 % tni vodikov peroksid, te uzorci sline u rasponu koncentracija od 0,1-2 x. Reakcijska smjesa se priprema u TE puferu. . Reakcijska smjesa se inkubira 30 minuta na 37 °C, a pozitivna kontrola (plazmid + vodikov peroksid) su nakon 15 minuta inkubacije zračeni pod UV lampom 20 minuta. Uz pozitivnu kontrolu, pripremljene su i dvije negativne kontrole; jedna je sadržavala samo plazmid, a u drug je oslim plazmida dodan i vodikov peroksid. Nakon inkubacije, uzorci su nanešeni na 1 % agarozni gel koji je pripremljen u TAE puferu te je provedena elektroforeza u TAE puferu pod naponom od 10 mV i jakosti struje od 150 mA kroz sat vremena. Nakon što je završena elektroforeza, gel je stavljen u otopinu etidij bromida kako bi on interkalirao u DNA i kako bi se mogli vizualizirati uzorci. Nakon 3 sata gel je izvađen iz etidij bromida te promatran pod UV svjetlom kako bi se vidjele vrpce. Tumačenje rezultata temelji se na tome da će se plazmid, ukoliko je uzorak s kojim je tretiran genotoksičan (uvodi lomove) linearizirati te će u tom obliku putovati sporije u gelu od cirkulariziranog nativnog oblika. Uspoređivanjem intenziteta fluorescencije vrpce oba oblika plazmida nastalih nakon tretmana te njihovom usporedbom s omjerima oblika u kontroli određuje se genotoksičnost ispitivanih spojeva. Analiza intenziteta vrpce lineariziranog i superzavijenog plazmida provedena je pomoću softverskog programa GelAnalyzer 19.0.

3.2.4. Ispitivanje genotoksičnosti komet testom

Komet metoda za ispitivanje genotoksičnosti temelji se na imobilizaciji tretiranih stanica u slojevima agaroze i lize tih stanica kako bi u agarozu ostao samo genetički materijal stanice. Ukoliko je taj materijal oštećen, pod djelovanjem električnog polja induciranog u kadici za elektroforezu, taj materijal će se početi kretati prema pozitivnom polu te će nakon bojanja biti vidljiv kao komet (jače svjetleći dio u kojem se nalazi neoštećen materijal i „rep“ komete koji je zapravo materijal koji je migrirao zbog toga što je oštećen), kao što se to može vidjeti na slici 7. Određeni broj dobivenih kometa genetičkog materijala se označi te se prate parametri poput duljine i intenziteta glave kometa, širine cijelog kometa te duljine, momenta i intenziteta repa kometa. Stručnjaci se slažu kako je najrelevantniji podatak intenzitet repa kometa, jer je najviše linearno povezan s frekvencijom lomova u DNA te je odlučeno kako će se u svrhu izrade rada upravo on i pratiti (Møller i sur., 2020).

Sama metoda ima mane poput toga da monosloj ispitivanih stanica nije dovoljno sličan živom tkivu te toga da nije moguće simulirati stvarnu okolinu usne šupljine pri provođenju testova (Tomakidi i sur., 2000).



Slika 7. Primjer izgleda rezultata komet analize (Prilagođeno prema MyBioSource.com, 2021).

Genotoksični učinak izmjeren je za uzorke koji su u prethodnim eksperimentima pokazali prooksidativno, genotoksično ili slabo citiotoksično djelovanje. Bitno je da se za komet analizu ne

uzimaju uzorci koji su uzorkovali smrt velikog broja stanica (preživljenje manje od ~80 %), kako bi rezultati imali veći kredibilitet, jer se metodom ne može razlikovati oštećen DNA od nevijabilnih stanica te bi rezultati mogli biti lažno pozitivni (Olive i Banath, 2006). Prema protokolu prilagođenom prema Møller i sur., 2020 i Olive i Banath, 2006, iz staničnih suspenzija koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} na 25-jažične pločice nasaden je 1 mL u svaku jažicu. Pločice su zatim inkubirane 24 h na $37\text{ }^\circ\text{C}$ uz atmosferu s 5 % CO_2 . Idući su dan stanice tretirane odabranim koncentracijama uzoraka tijekom 24 h. Nakon inkubacije i uklanjanja medija, stanice su odlijepjene s površine jažica pomoću 0,25 % -tne otopine tripsina te su prenešene u kivete po Eppendorfu. Stanice su istaložene tijekom centrifugiranja na $12\ 000\ \text{rpm}$ u trajanju od 5 minuta. Nakon uklanjanja supernatanta, zaostali talog stanica se koristio za pripremu stakalaca. Na stakalca od brušenog stakla navučeno je $300\ \mu\text{L}$ 1,5 % agaroznog gela pripremljenog u PBS-u, u tankom sloju. Kada se agarozna polimerizira, prevlači se sa slojem stanica koje su pomiješane s $100\ \mu\text{L}$ 0,5 % agaroznog gela s niskom točkom topljivosti pripremljenog u destiliranoj vodi te. Nakon polimerizacije tog sloja, na njega se navlači još jedan sloj 0,5 % agaroznog gela, volumena $100\ \mu\text{L}$. Nakon polimerizacije, stakalca se uranjaju u pufer za lizu stanica te se liza provodi min 2 sata u hladnom- Nakon lize stanica, stakalca se slažu u kadu za elektroforezu napunjenu puferom za elektroforezu. Elektroforeza se provela kroz 20 minuta na 25 V. Nakon toga, stakalca se ispiru tri puta s TRIS puferom u trajanju od pet minuta te bojaju etidij bromidom i promatraju pod fluorescentnim mikroskopom te su pomoću programa za obradu kometa mjereni parametri relevantni za utvrđivanje genotoksičnosti. U ovom radu, praćena je promjena intenziteta repa, čija je vrijednost proporcionalna s genotoksičnošću uzorka. U svrhu izrade rada korišten je fluorescentni mikroskop na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI).

3.2.5. Obrada podataka

Dobiveni podaci o citotoksičnosti i prooksidativnom učinku obrađeni su u JASP programu gdje se koristila ANOVA statistička analiza sa Scheffe i Tukey post-hoc testom usporedbe. Razina značajnosti za podatke bila je p-vrijednost manja od 0,05. Svaki rezultat koji pokazuje razinu značajnosti manju od 0,05 smatra se statistički značajnim. Pomoću programiranja u PyCharmu su dobiveni rezultati prikazani grafički, uz dodatak standardnih devijacija i statistički značajnih međusobnih odnosa podataka.

Podaci o genotoksičnosti iz metode linearizacije plazmida obrađeni su tako da su slike gelova analizirane su u programu GelAnalyzer, kako bi se što točnije odredile količine DNA u bendovima i provele daljnje analize podataka. GelAnalyzer kvantificira DNA u bendovima te se kao mjerilo genotoksičnosti u ovom radu uzimao omjer količine cirkulariziranog oblika plazmida i količine lineariziranog oblika plazmida. Dobiveni podaci prikazani su grafički pomoću programa Microsoft Excel 2016.

Podaci o genotoksičnosti dobiveni komet analizom obrađeni su simultano s promatranjem stakalaca pod mikroskopom u programu Comet Assay II. Kao parametar oštećenja, analiziran je izmjereni intenzitet repa. Za svaki uzorak analizirana je 51 stanica, a dobiveni podaci obrađeni su u programu Microsoft Excel 2016 te grafički prikazani pomoću programiranja u PyCharmu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

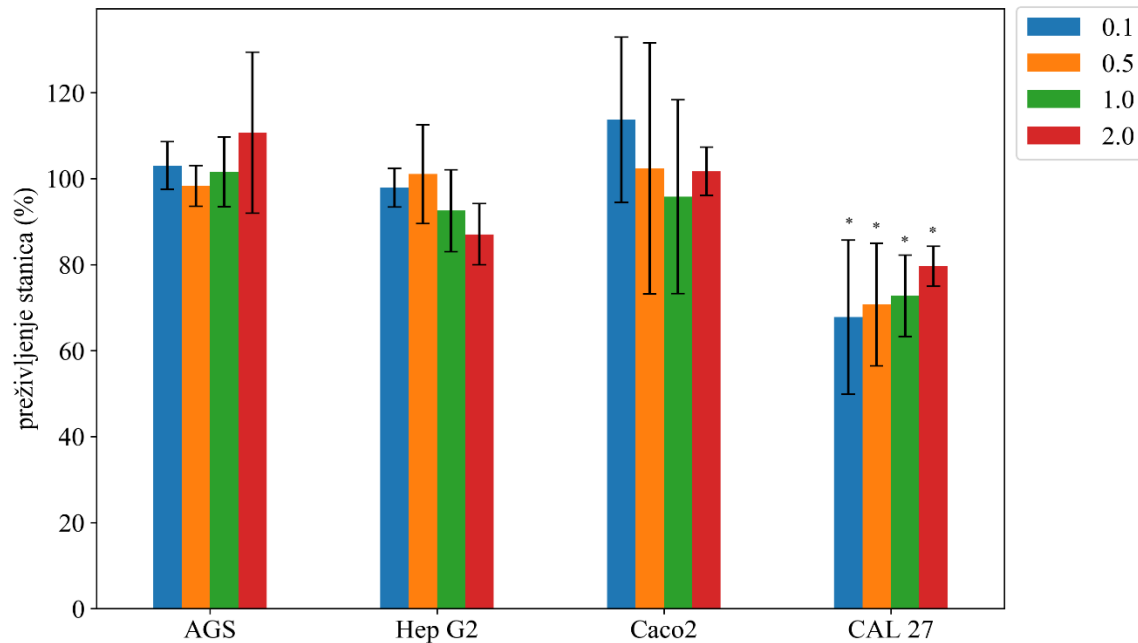
4.1. KEMIJSKI SASTAV OTOPINA I KOMENTARI

Iz rezultata je vidljivo da su koncentracije metala najviše u uzorcima u kojima su se dijelovi inkubirali 7 dana, te da dalje padaju s vremenom inkubacije. Krom i nikal prisutni su u svim uzorcima, a pogotovo su visoke koncentracije u uzorcima u kojima su inkubirani prstenovi. U uzorcima u kojima su bili inkubirani prstenovi također je prisutno i više od 20 puta više kobalta nego u kontroli, baš kao i oko 100 puta više mangana. Mangan je prisutan u koncentracijama oko 20 i 50 puta višima nego u kontroli u svim uzorcima osim u uzorcima s lukovima. Koncentracija kobalta u uzorcima s lukovima i ligaturama također ne prelaze koncentraciju koja je izmjerena u kontroli. Koncentracija aluminija je 3 do 9 puta viša u odnosu na kontrolu u uzorcima u kojima su se inkubirali svi dijelovi.

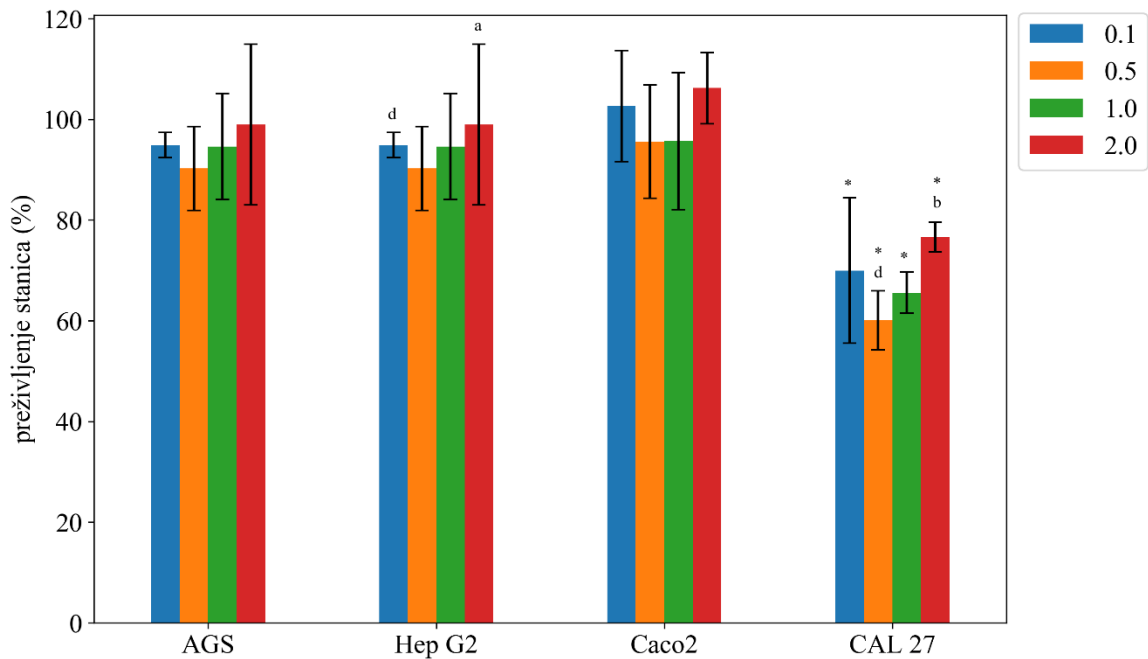
4.2. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI NEUTRAL RED METODOM

Ispitivanje je provedeno na četiri stanične linije, a svaka je koncentracija istražena paralela. Za svaki je uzorak uzeta je aritmetička sredina mjerenog parametra svih 6 paralela. Mjereni parametar bio je postotak preživjelih stanica. Rezultati su prikazani na slikama 8-22. Na slikama

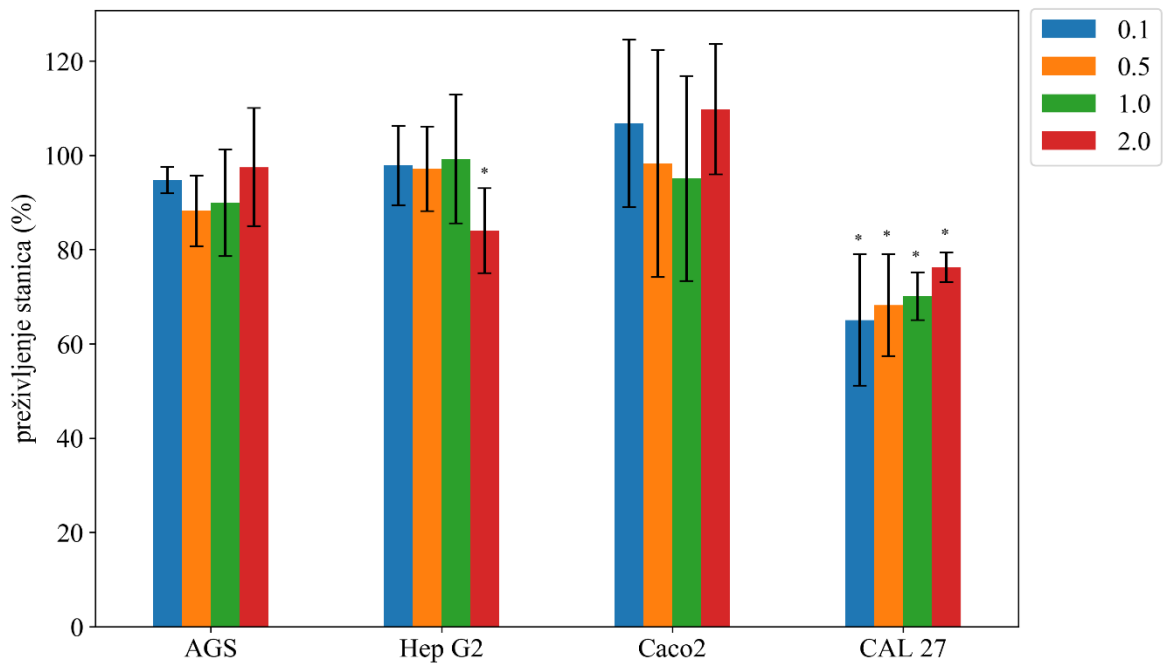
je grafički prikazano citotoksično djelovanje svakog uzorka, u sve četiri ispitivane koncentracije, na četiri ispitane stanične linije. Prikazana je ovisnost postotka preživljenja stanica o koncentraciji uzroka uz standardne devijacije mjerenja te statistički značajne odnose rezultata. Oznake statističke značajnosti su: a – značajno u odnosu na koncentraciju 0,1; b – značajno u odnosu na koncentraciju 0,5; c – značajno u odnosu na koncentraciju 1; d – značajno u odnosu na koncentraciju 2; * - značajno u odnosu na kontrolu (umjetna slina, 100 %-tno preživljenje).



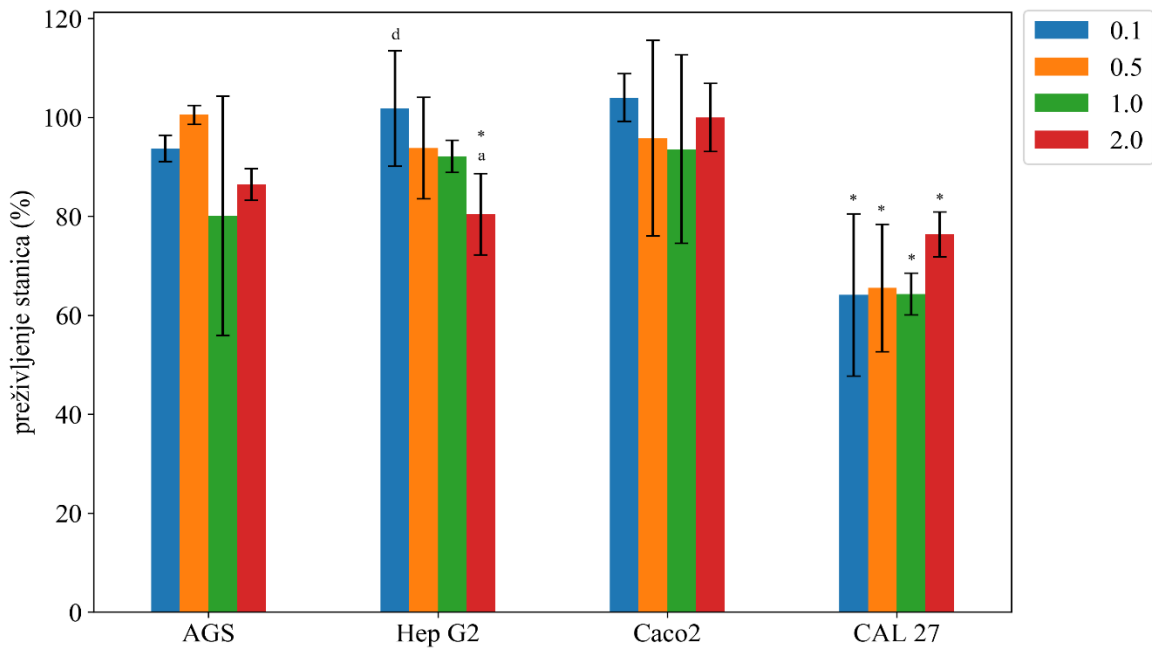
Slika 8. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon tri dana inkubacije s bravicama.



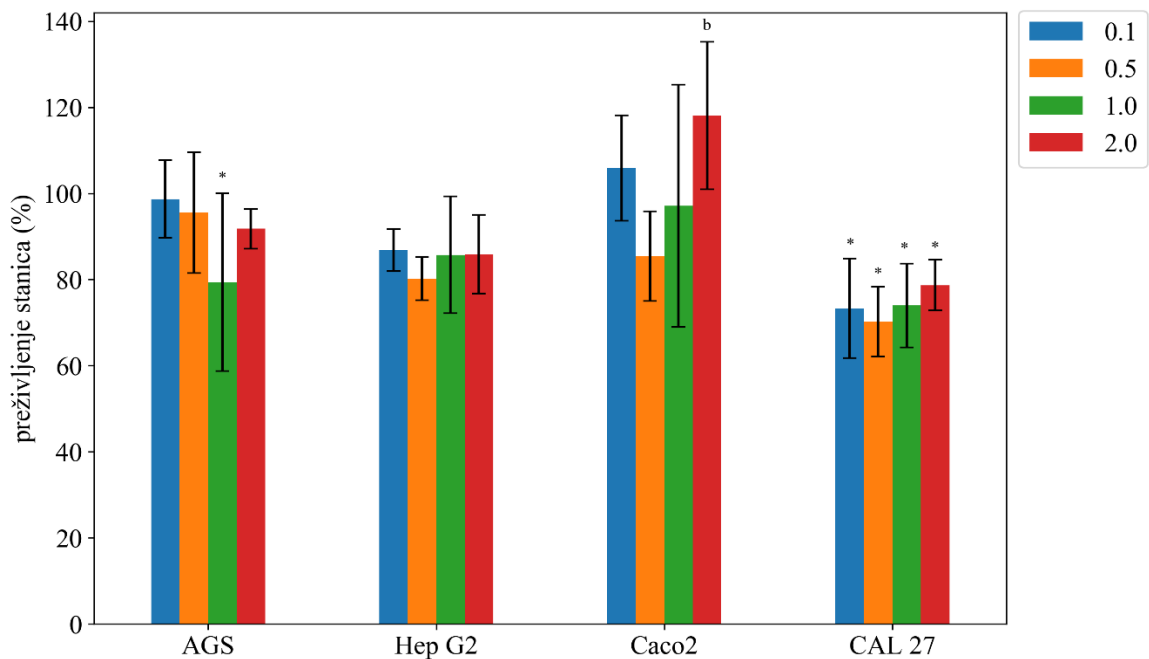
Slika 9. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon sedam dana inkubacije s bravicama.



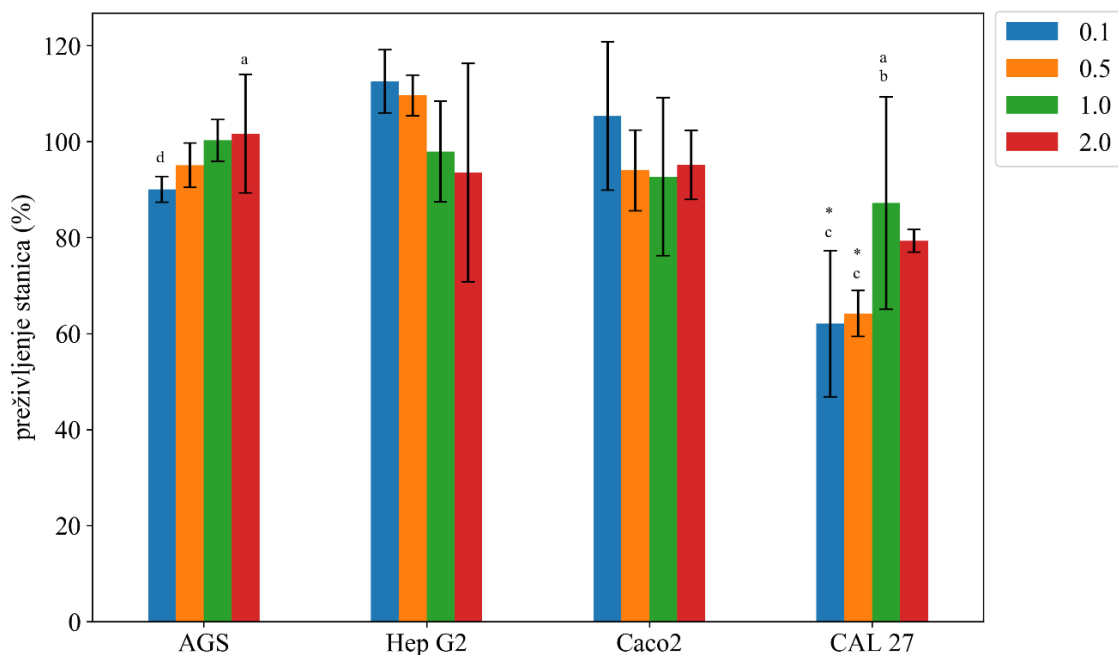
Slika 10. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon četrnaest dana inkubacije s bravicama.



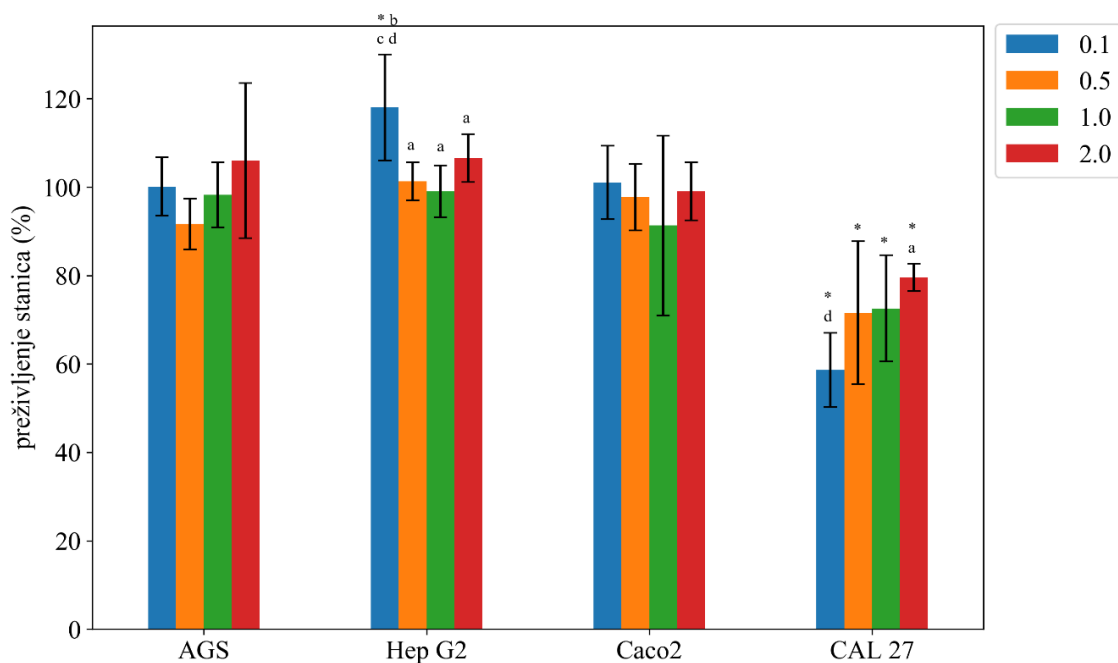
Slika 11. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon tri dana inkubacije s ligaturama.



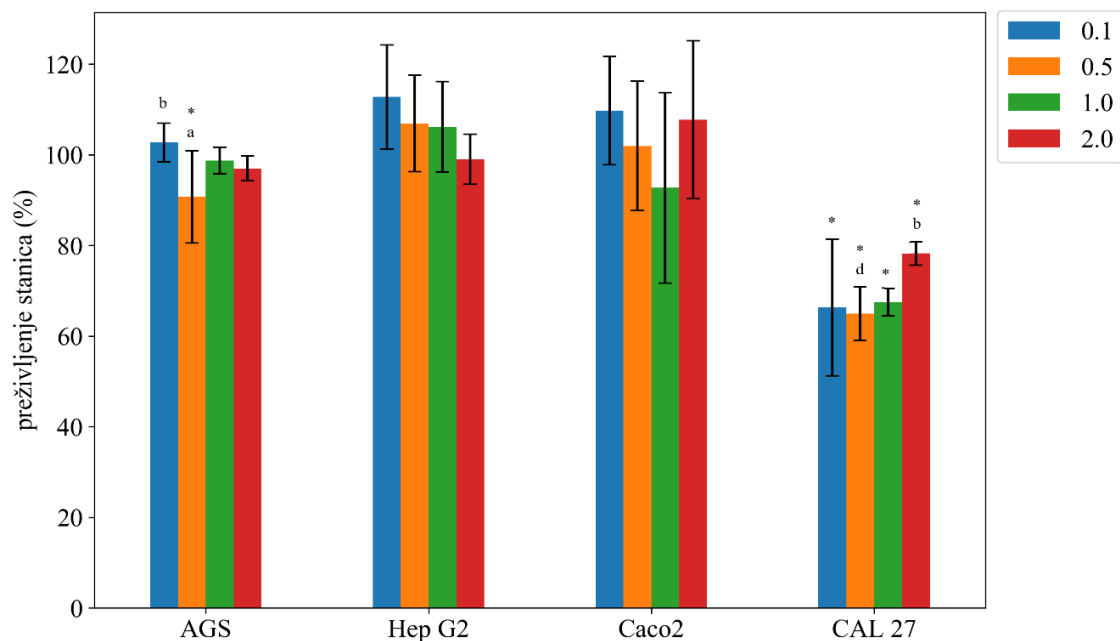
Slika 12. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon sedam dana inkubacije s ligaturama.



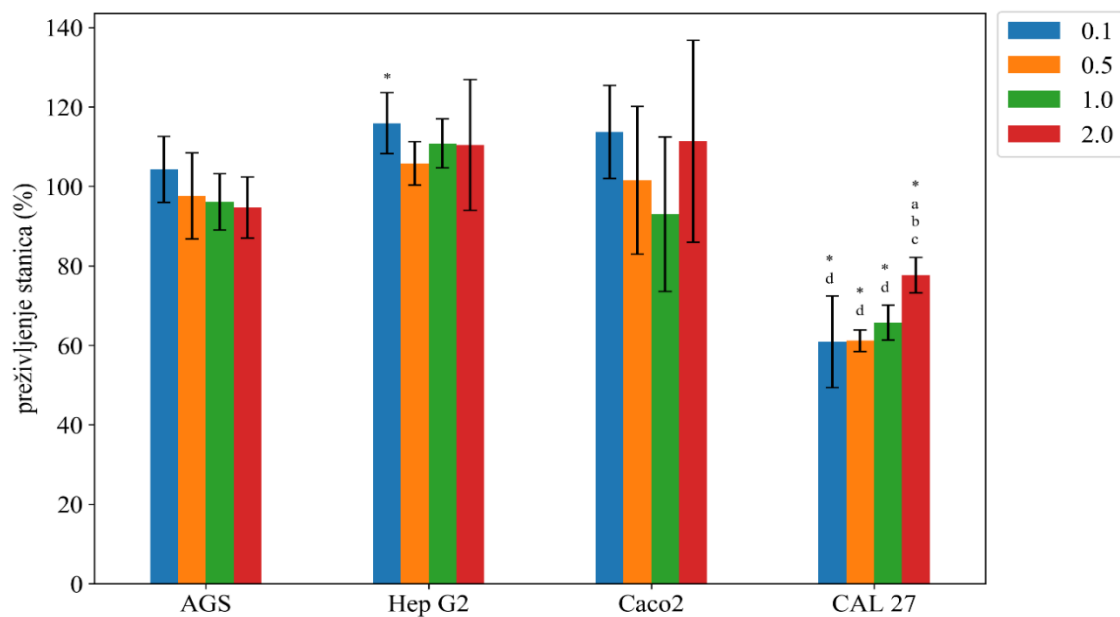
Slika 13. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon četrnaest dana inkubacije s ligaturama.



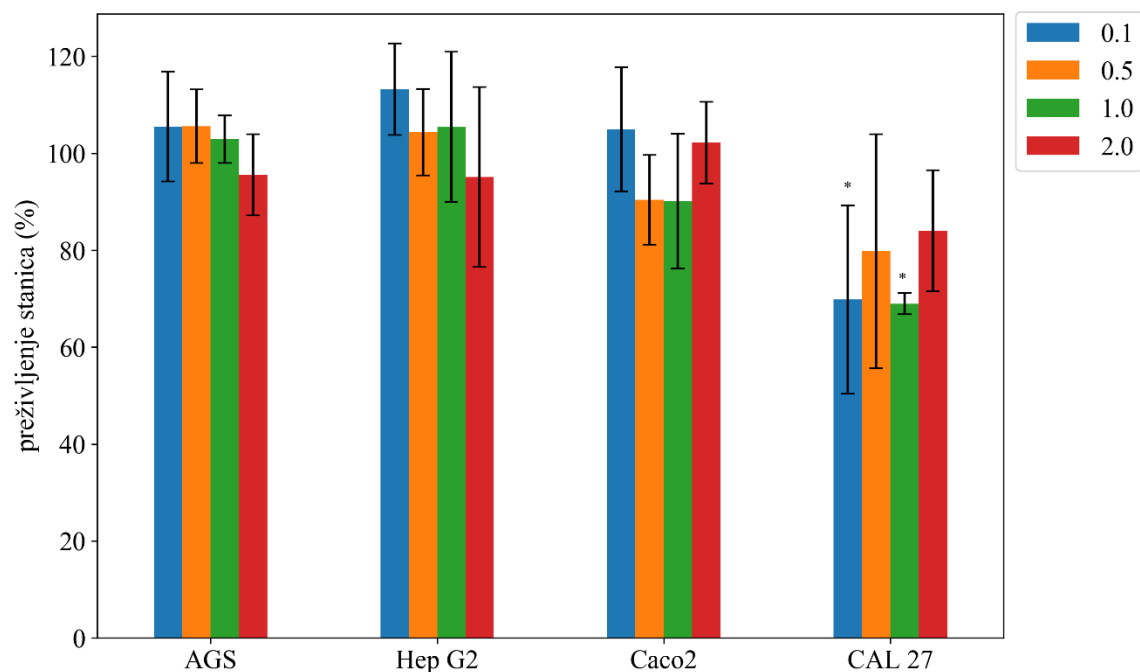
Slika 14. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon tri dana inkubacije s lukovima.



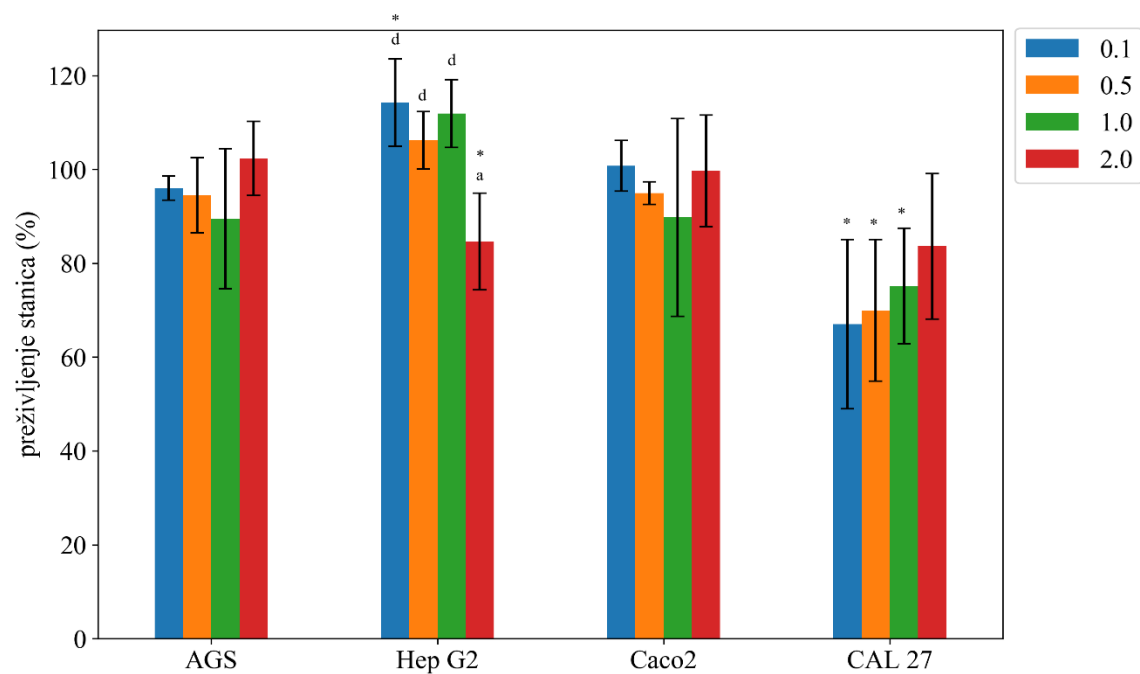
Slika 15. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon sedam dana inkubacije s lukovima.



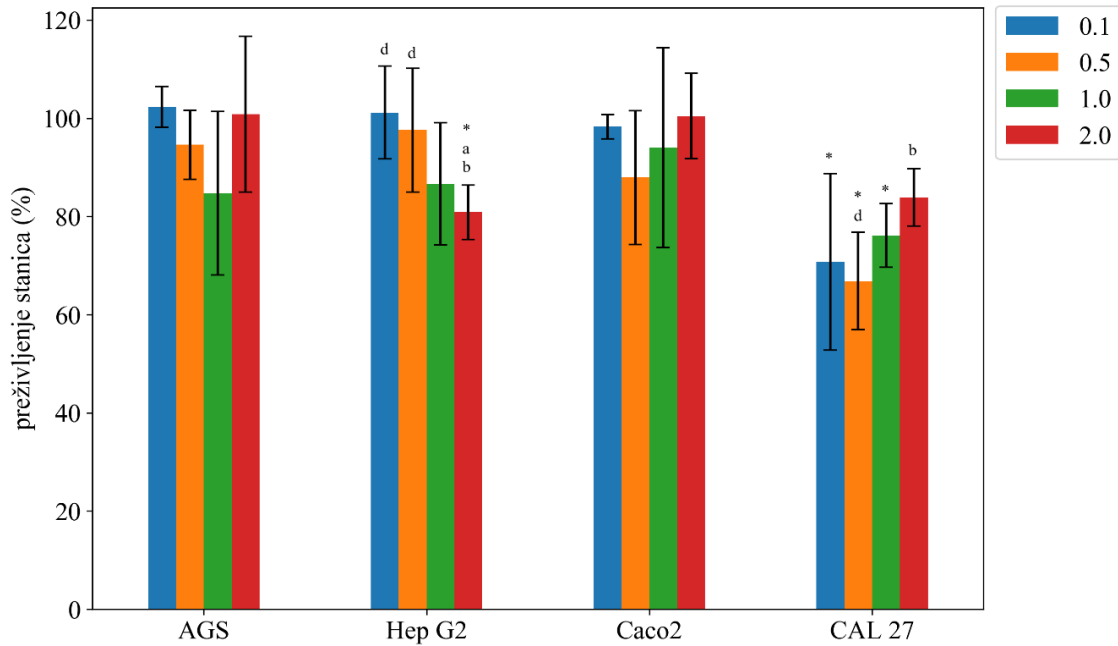
Slika 16. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon četrnaest dana inkubacije s lukovima.



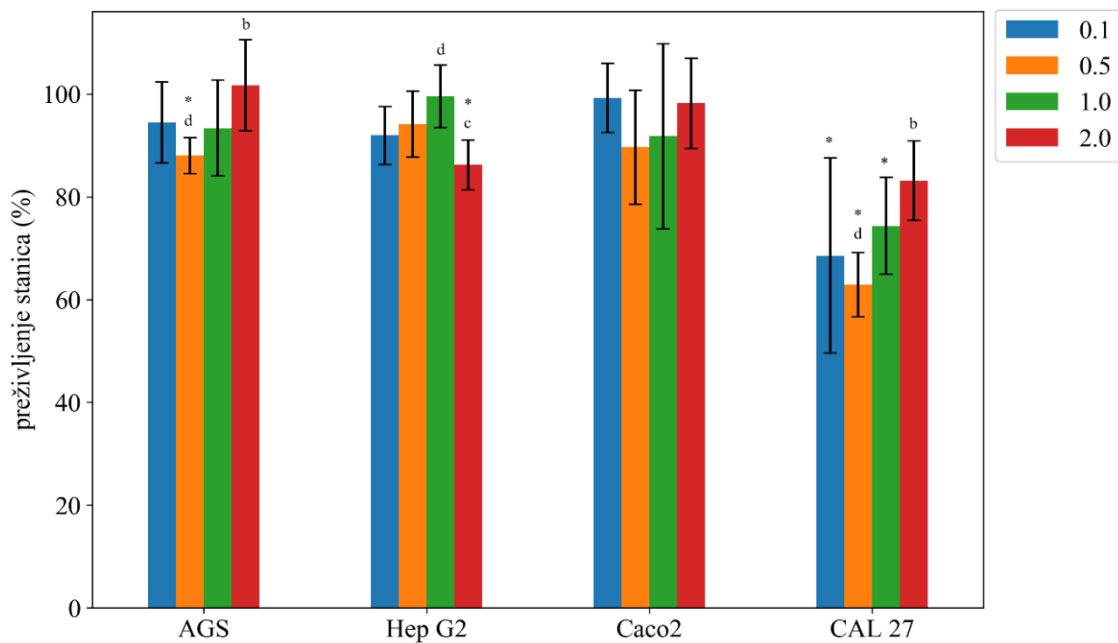
Slika 17. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon tri dana inkubacije s prstenovima.



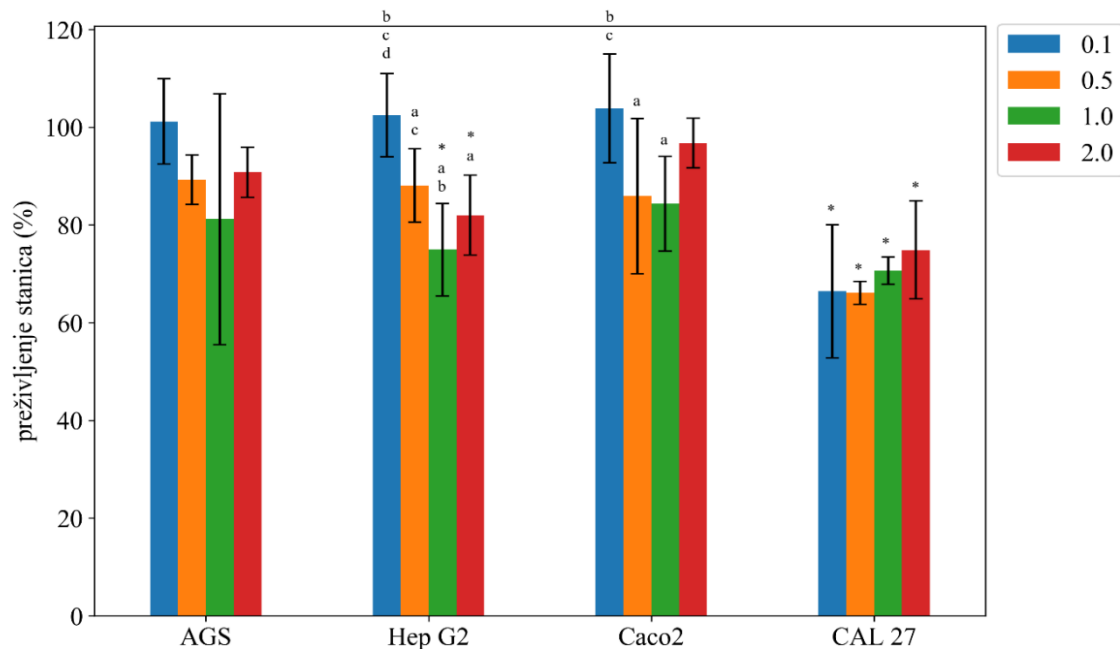
Slika 18. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon sedam dana inkubacije s prstenovima.



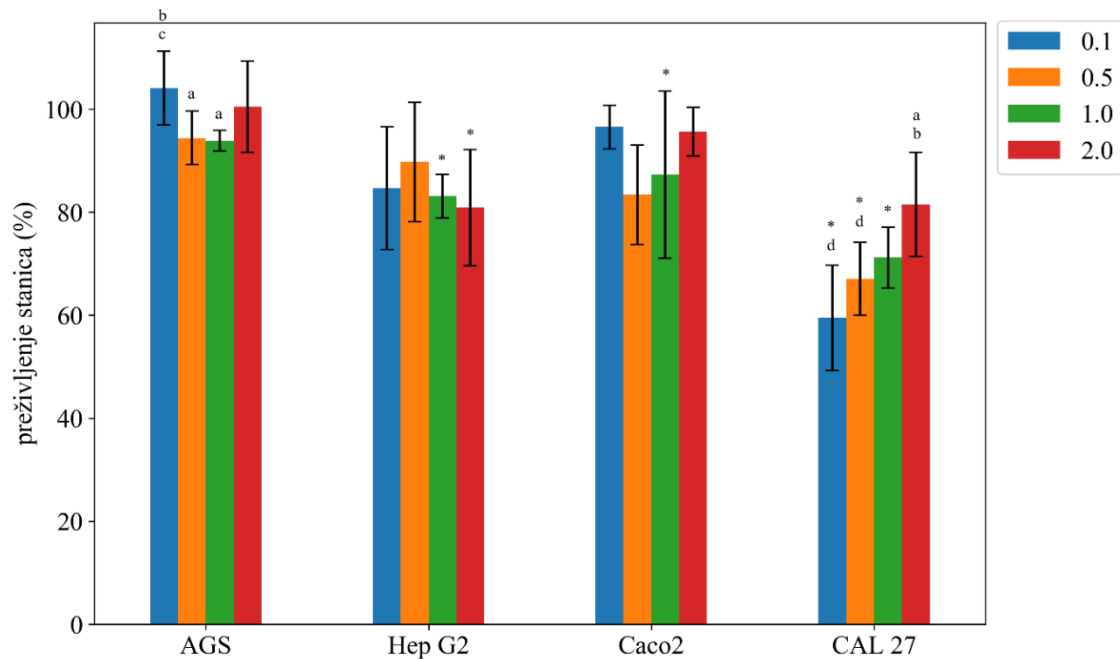
Slika 19. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon četrnaest dana inkubacije s prstenovima.



Slika 20. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon tri dana inkubacije sa svim dijelovima.



Slika 21. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon sedam dana inkubacije sa svim dijelovima.



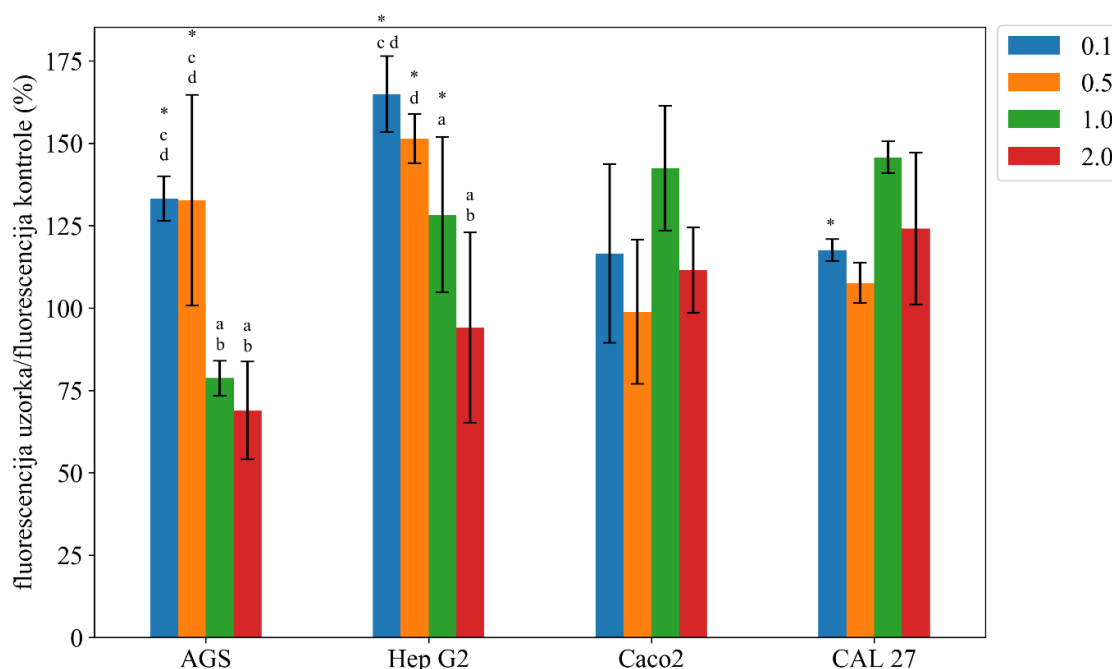
Slika 22. Preživljenje stanica nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon četrnaest dana inkubacije sa svim dijelovima.

Iz rezultata je vidljivo kako su najosjetljivije stanice epitela usne šupljine, CAL 27, te stanice karcinoma jetre - Hep G2. Citotoksični učinak u stanicama jetre izazvali su metali u otopinama nakon elucije prstenova 7 i 14 dana (najviša testirana koncentracija) te otopine dobivene nakon elucije svih dijelova 3, 7 i 14 dana, s time da se citotoksični učinak povećava povećanjem vremena elucije. Sukladno povećanim koncentracijama nikla, kroma i kobalta u tim otopinama, rezultati su očekivani. Stanice karcinoma želuca (AGS) i debelog crijeva (Caco2) su bile otporne na citotoksično djelovanje eluiranih metala, što je, zbog tipa stanica i očekivano. Ovakvi rezultati dobiveni su i u nekim dosadašnjim istraživanjima provedenim na stanicama jetre i usne šupljine, iako drugim metodama, primjerice MTT redukcijskim testom te bojanjem tripan plavim bojilom i brojanjem stanica (Gonçalves i sur., 2014; Hafez i sur., 2011). Nema jasne linearne ovisnosti pada preživljenja stanica o koncentraciji samih uzoraka, a generalno gledano najveći citotoksični učinak pokazali su uzorci koncentracije 1x, dakle uzorci kojima su izloženi i ljudi prilikom nošenja ortodontskih pomagala. Također, nema jasne povezanosti pada preživljenja stanica i vremenskog perioda inkubacije dijelova naprava u uzorcima. Najtoksičnije djelovanje vidljivo je kod rezultata dobivenih na CAL 27 stanicama koji pokazuju oko 60 % preživljenja stanica nakon tretmana s uzorcima koncentracije 0,1x i 0,5x, u kojima su se inkubirale bravice i ligature, što je zanimljivo kada se uzme u obzir to da ta stanična linija predstavlja tip stanica koji su u stvarnosti najviše izložene samoj napravi i djelovanju metala iz iste. Kao što je vidljivo u prilogu 1, bravice se ističu po koncentraciji nikla i kroma 10, odnosno 70 puta većom u odnosu na kontrolu, te je po tome i očekivana citotoksičnost tih uzoraka (Martín-Caméan i sur., 2015b). Ligature se pak ističu u odnosu na kontrolu 5 puta većom koncentracijom kroma te 20 puta većom koncentracijom mangana, koji također može biti citotoksičan (Francisco i sur., 2021). Kao što je već spomenuto, sinergističko djelovanje metala također može biti faktor koji utječe na citotoksično djelovanje uzoraka (Primožič i sur., 2021). Bitno je napomenuti kako je u ovom istraživanju izloženost stanica uzorcima bila 24 h u kontinuitetu, što ne predstavlja realnu situaciju u organizmu pacijenta, jer u realnoj situaciji dolazi do stalnog ispiranja slinom.

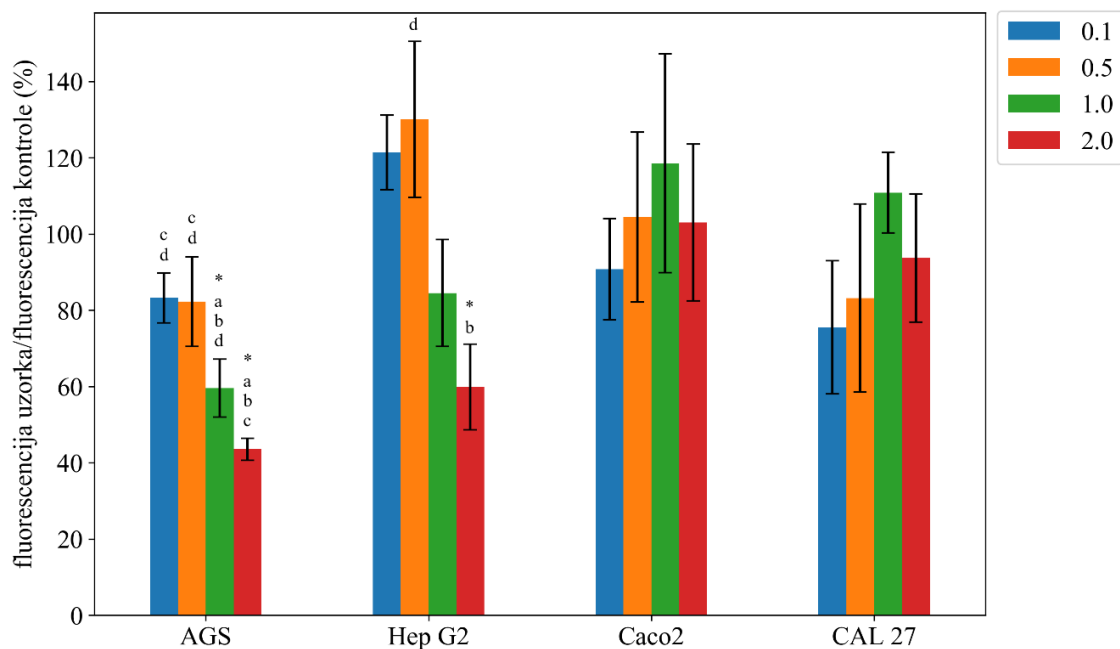
Dosadašnja *in vivo* istraživanja također pokazuju da pad preživljenja stanica kao rezultat citotoksičnosti metala iz ortodontskih naprava nije kritičan ni dugotrajan jer se stanice razmnožavaju i tkivo se obnavlja te povezuju citotoksičnost sa sadržajem prvenstveno nikla te kroma (Cunha i sur., 2018; Martín-Caméan i sur., 2015b).

4.3. ISPITIVANJE PROOKSIDATIVNOG UČINKA DCFH-DA METODOM

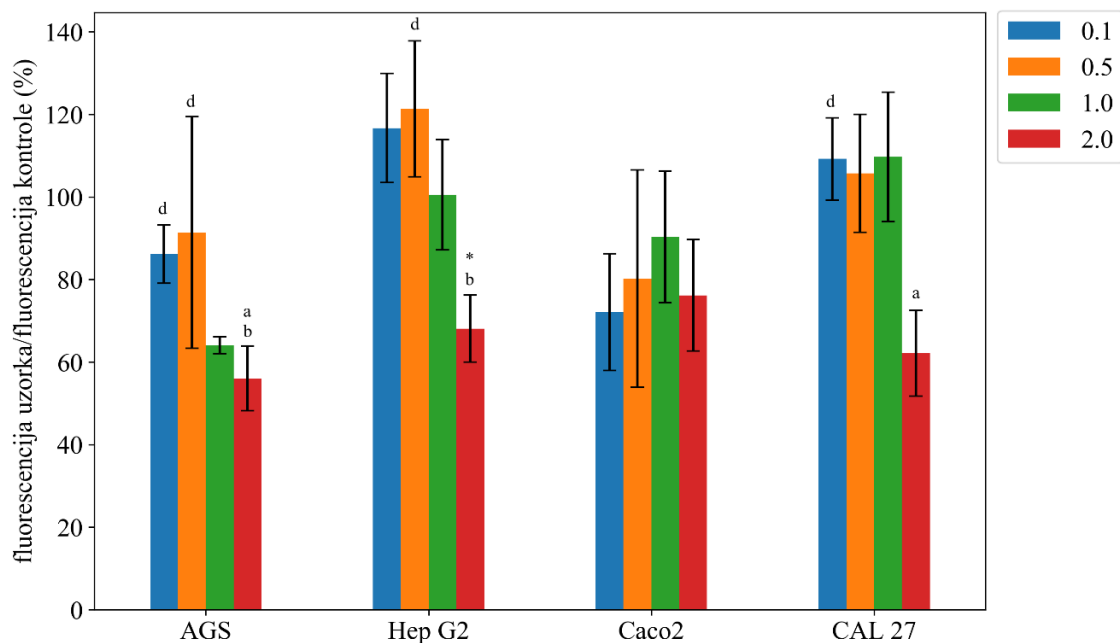
Ispitivanje je provedeno na četiri stanične linije, a svaki uzorak istražen je u 6 paralela. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina mjerenog parametra svih 6 paralela. Mjereni parametar bio je intenzitet fluorescencije uzorka podijeljen s intenzitetom fluorescencije kontrole. Rezultati su prikazani na slikama 23-37. Na slikama je grafički prikazano prooksidativno djelovanje svakog uzorka.. Prikazana je ovisnost omjera fluorescencije uzorka i kontrole o koncentraciji uzroka uz standardne devijacije mjerenja te statistički značajne odnose rezultata. Oznake statističke značajnosti su: a – značajno u odnosu na koncentraciju 0,1; b – značajno u odnosu na koncentraciju 0,5; c – značajno u odnosu na koncentraciju 1; d – značajno u odnosu na koncentraciju 2; * - značajno u odnosu na kontrolu (umjetna slina, 100 %-tno preživljenje).



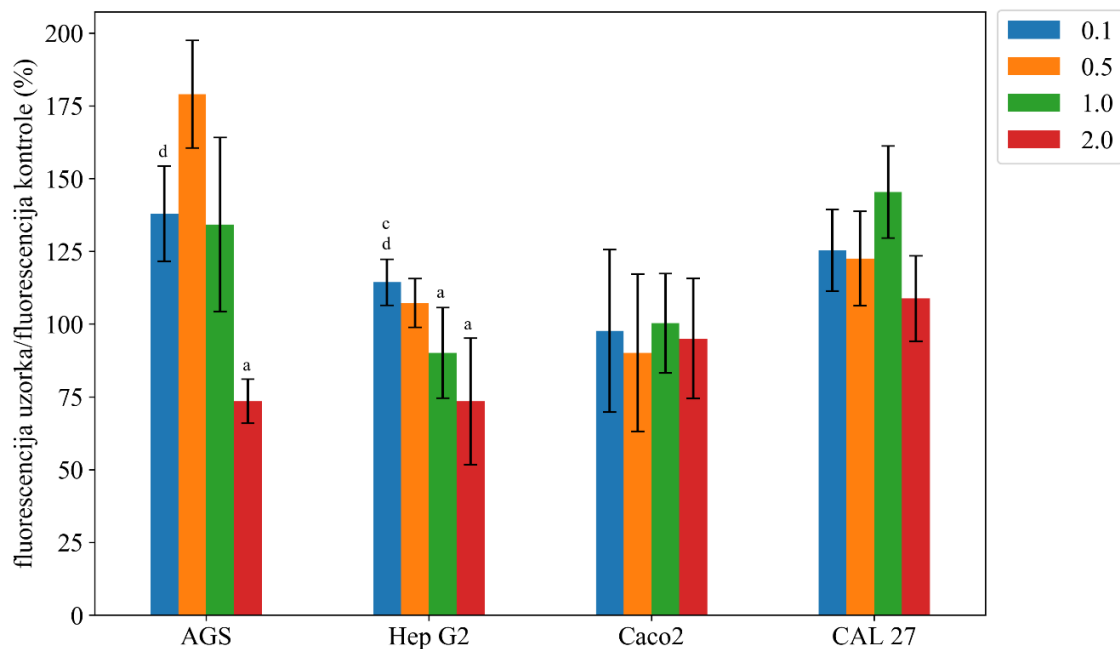
Slika 23. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne slina nakon tri dana inkubacije s bravicama.



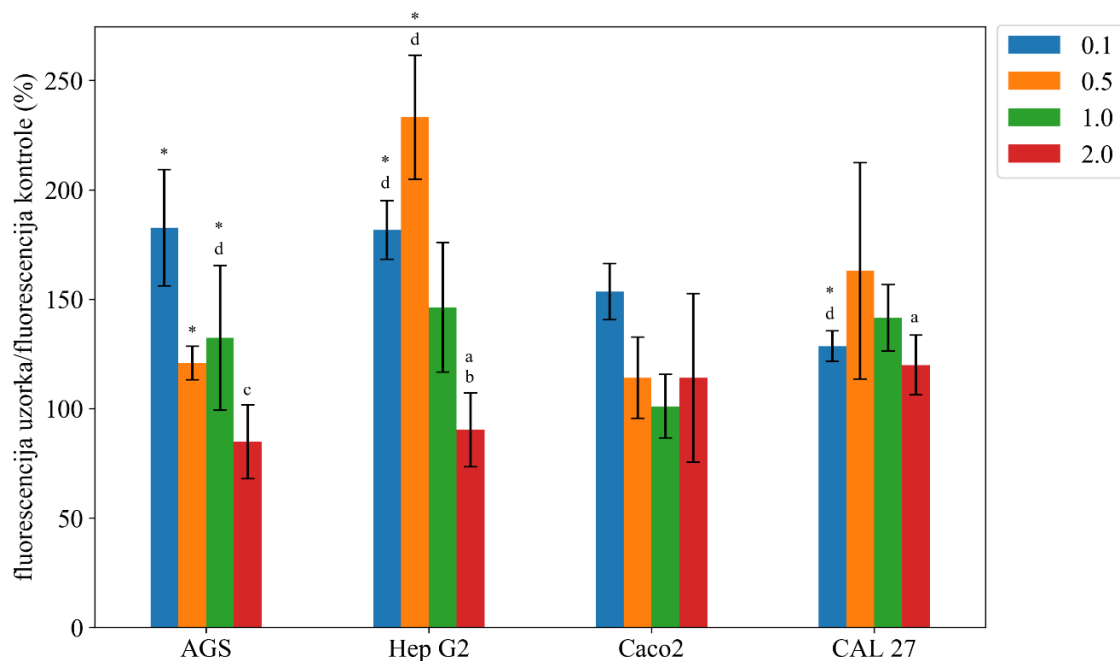
Slika 24. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon sedam dana inkubacije s bravicama.



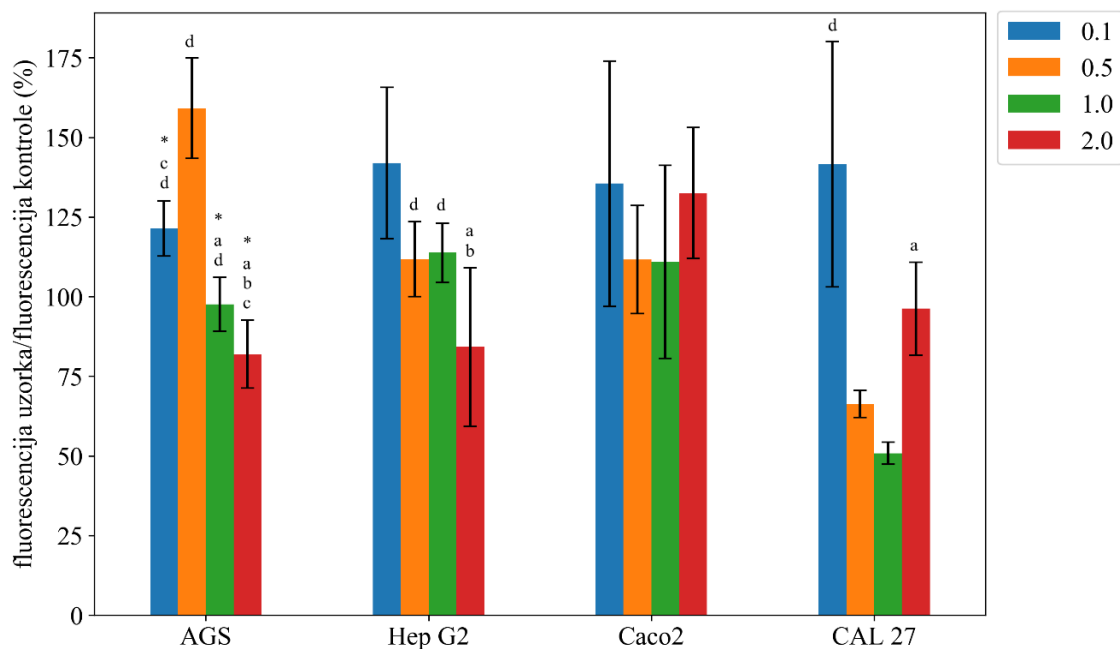
Slika 25. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon četrnaest dana inkubacije s bravicama.



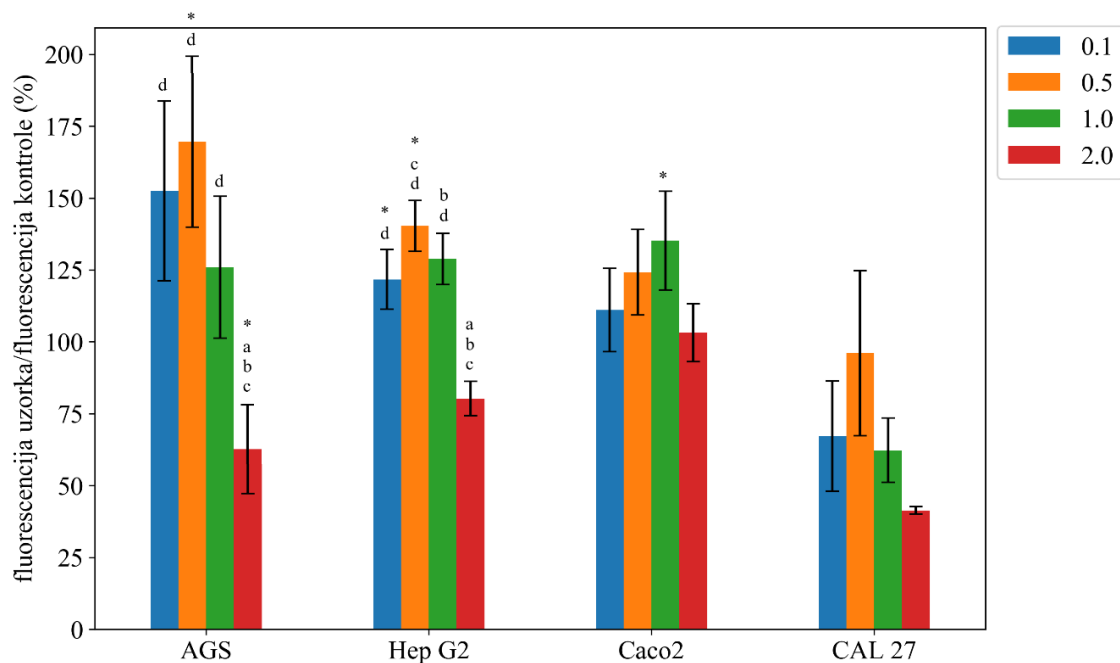
Slika 26. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon tri dana inkubacije s ligaturama.



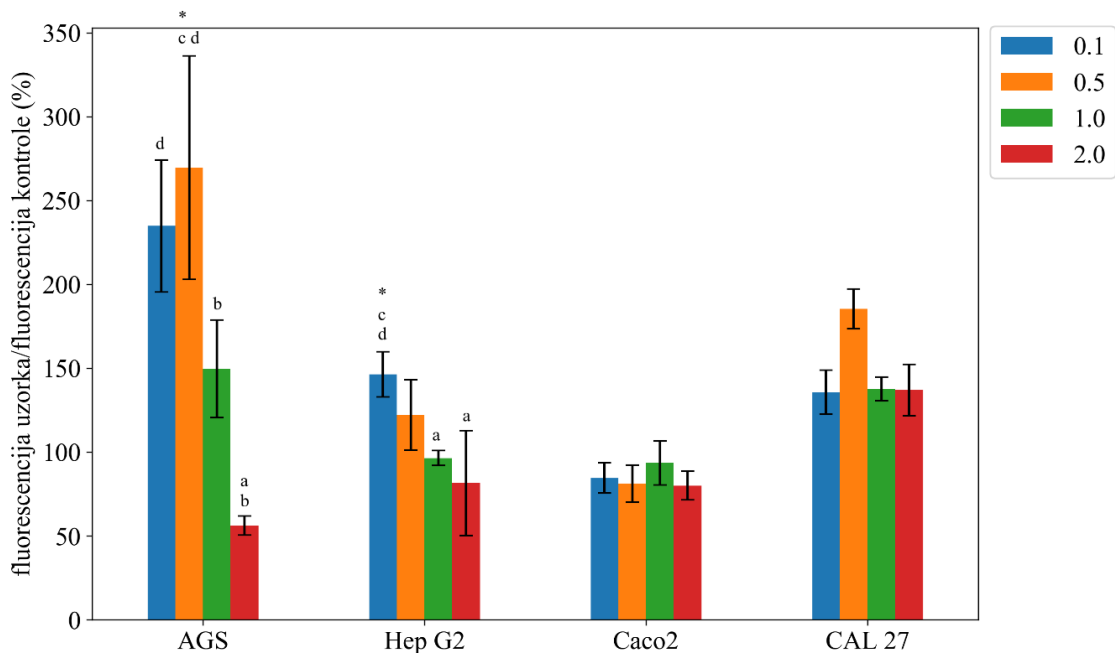
Slika 27. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon sedam dana inkubacije s ligaturama.



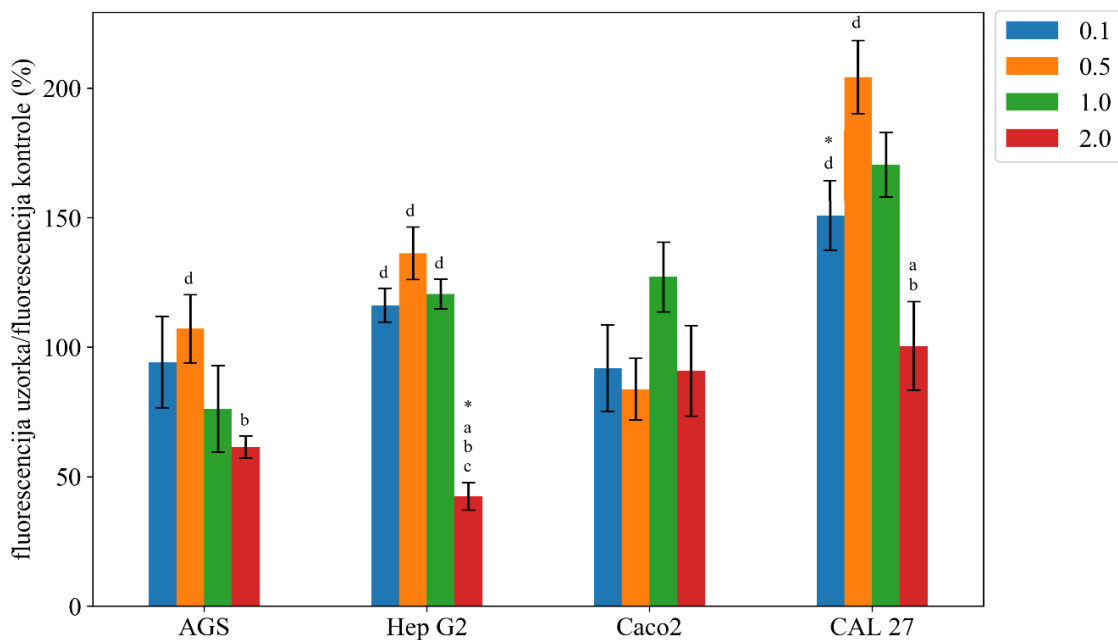
Slika 28. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon četrnaest dana inkubacije s ligaturama.



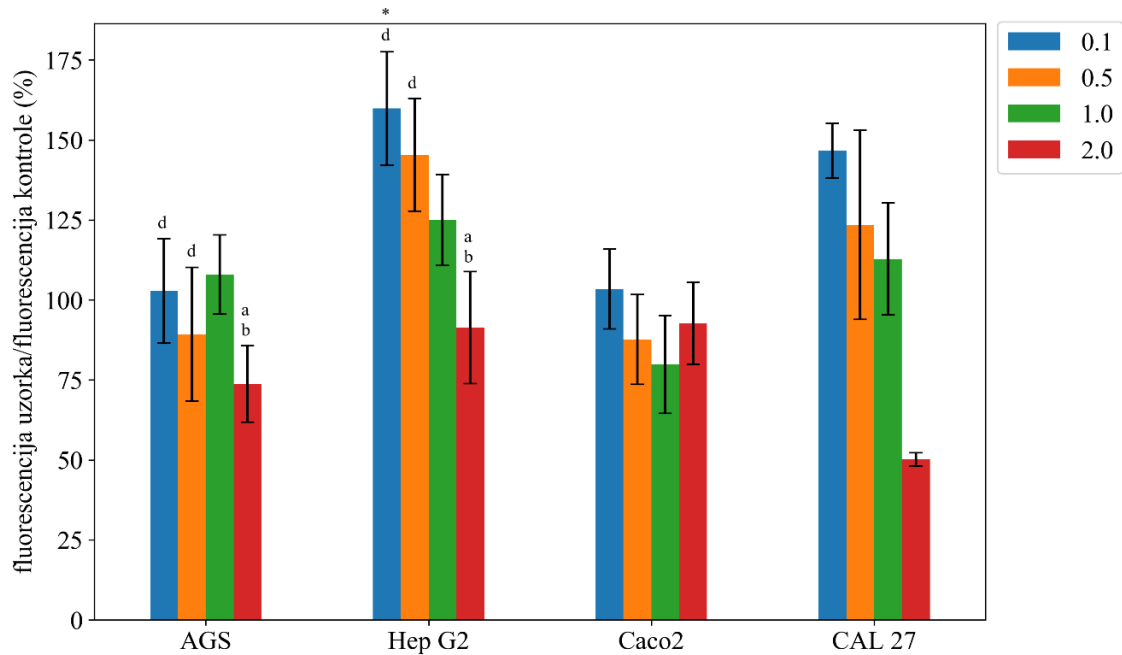
Slika 29. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon tri dana inkubacije s lukovima.



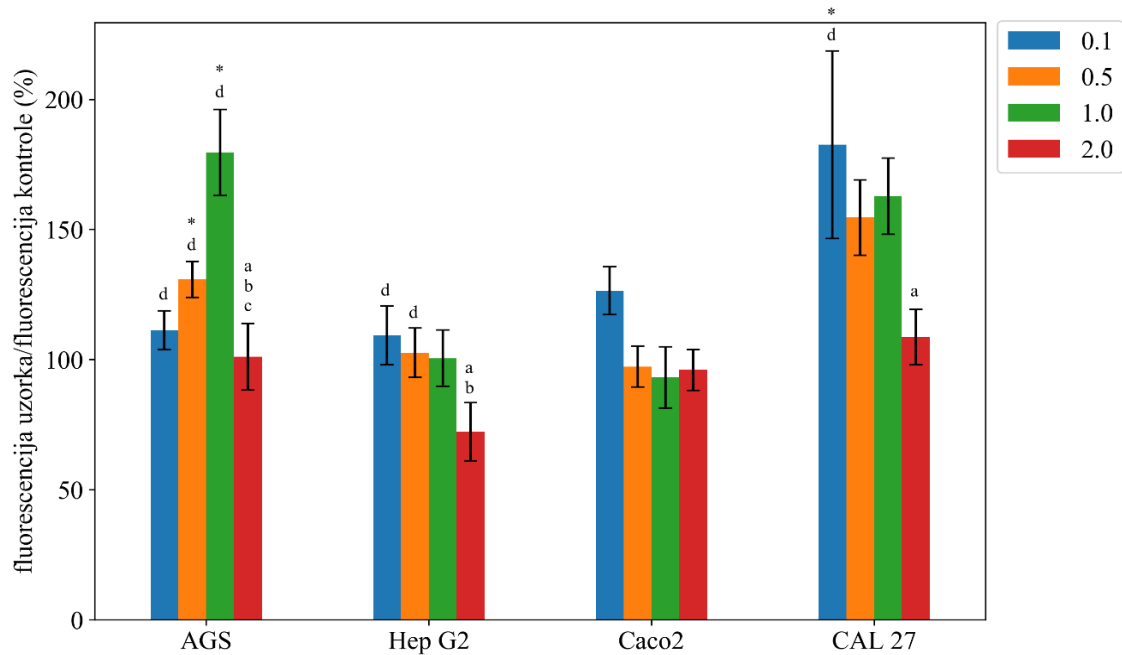
Slika 30. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon sedam dana inkubacije s lukovima.



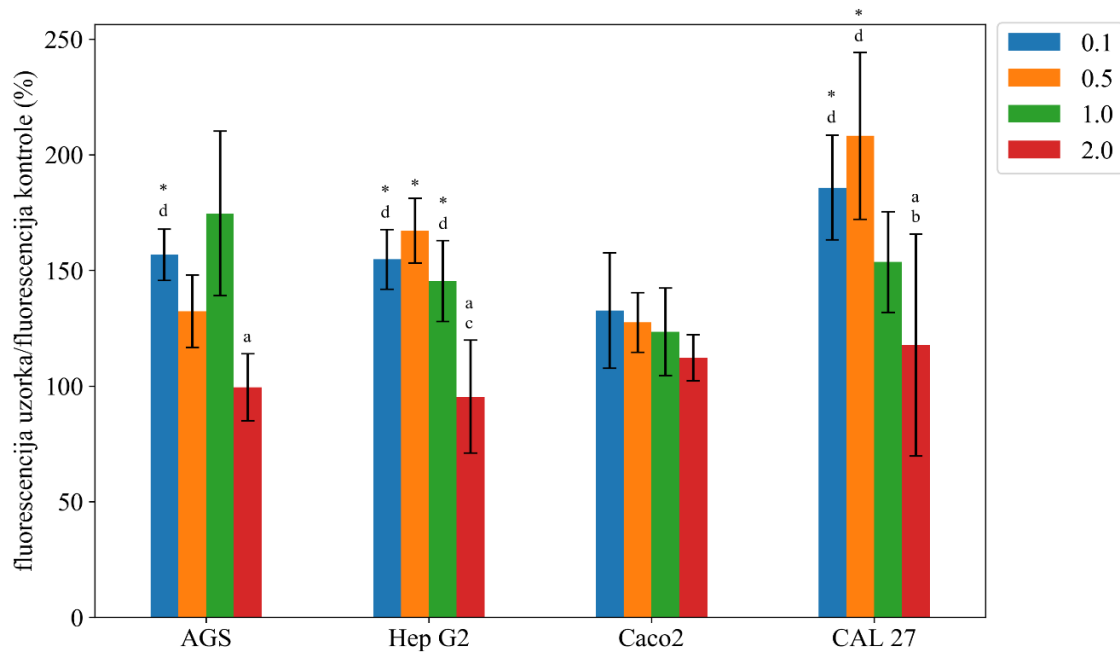
Slika 31. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon četrnaest dana inkubacije s lukovima.



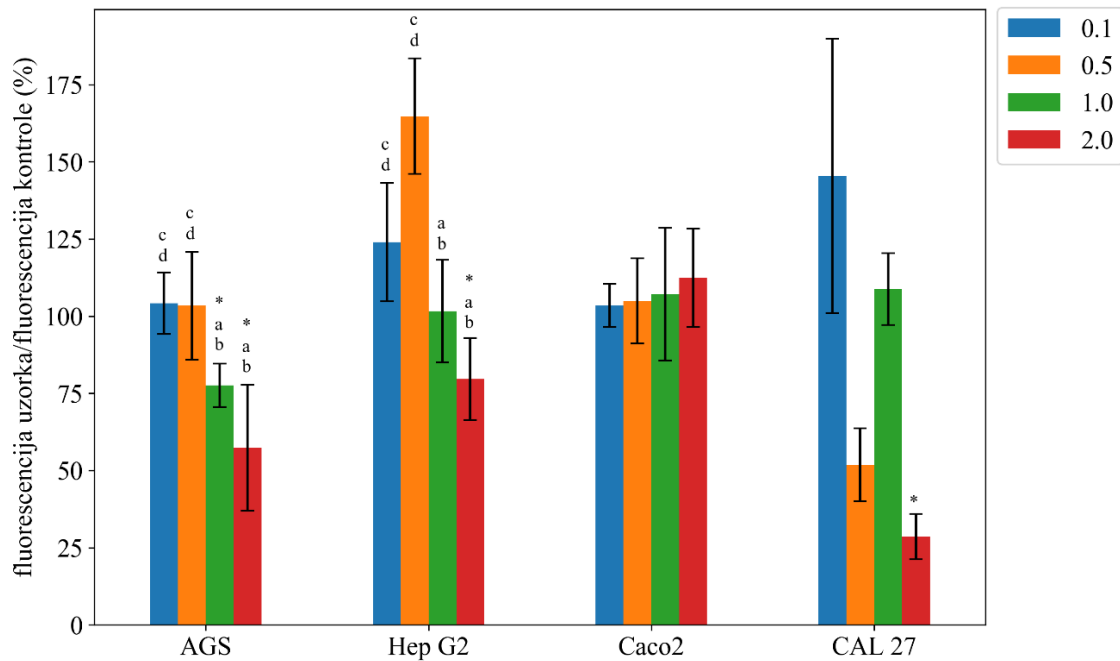
Slika 32. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon tri dana inkubacije s prstenovima.



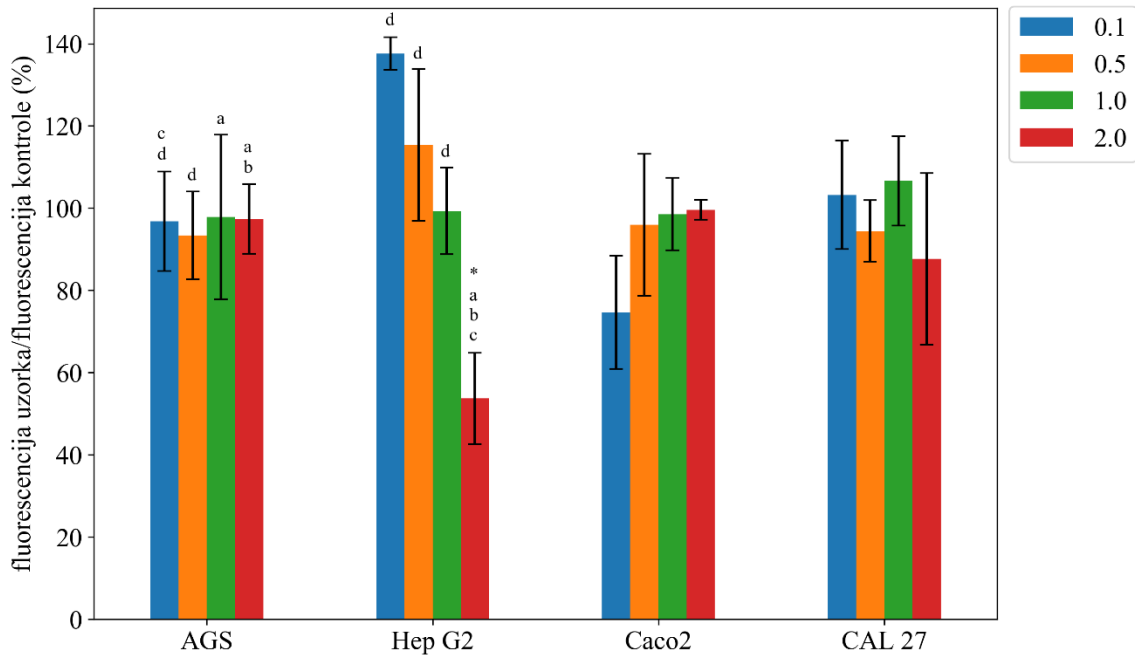
Slika 33. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon sedam dana inkubacije s prstenovima.



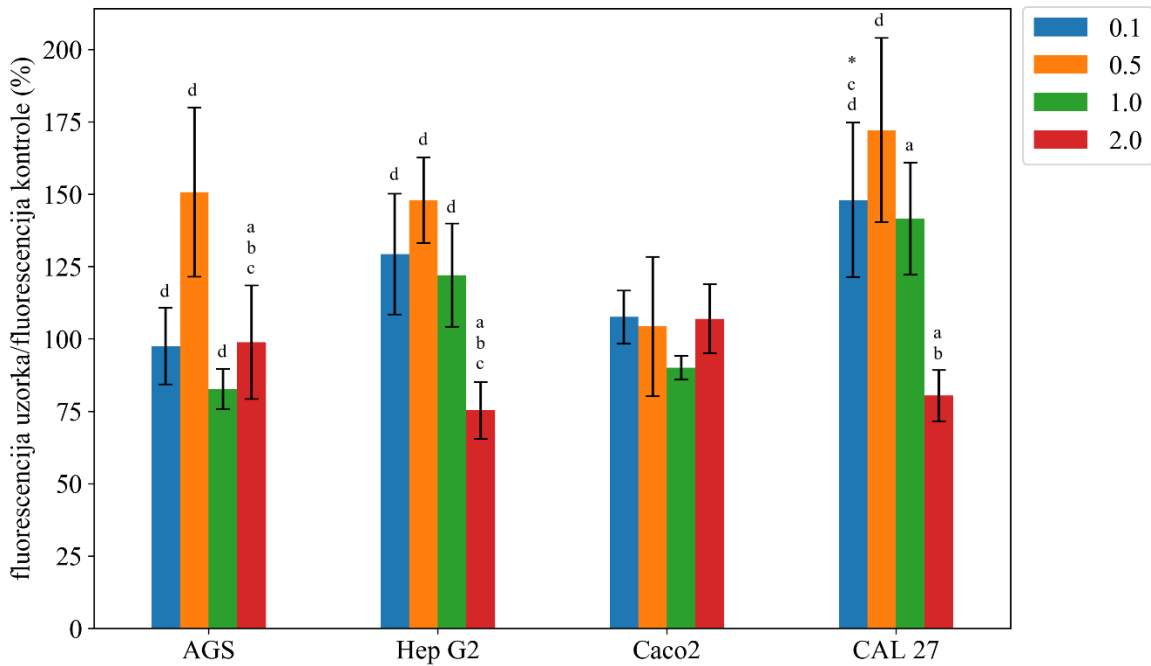
Slika 34. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon četrnaest dana inkubacije s prstenovima.



Slika 35. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon tri dana inkubacije sa svim dijelovima.



Slika 36. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon sedam dana inkubacije sa svim dijelovima.



Slika 37. Omjer fluorescencije uzorka i fluorescencije kontrole nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon četrnaest dana inkubacije sa svim dijelovima.

Iz rezultata je vidljivo kako su Caco2 stanice najmanje osjetljive na prooksidativno djelovanje metala. To bi mogao biti rezultat otpornosti stanica na djelovanje metala, što je vjerojatno s obzirom na rezultate mjerenja citotoksičnosti, koji su također pokazali otpornost Caco2 stanica. Niski omjeri, koji sugeriraju i malo nastalih ROS-ova, pojavljuju se i pri tretmanu CAL 27 stanica otopinama koncentracije 2 puta veće od fiziološke te se može pretpostaviti da su vrijednosti toliko niske zbog malog broja preživjelih stanica u kojima bi uopće moglo nastati slobodnih radikala. Niže koncentracije otopina dobivenih eluacijom bravica tijekom 3 dana izazvale su prooksidacijsko djelovanje u Hep G2 i AGS stanicama, dok su više koncentracije pokazale antioksidacijsko djelovanje. Isto tako, antioksidacijsko djelovanje dokazano je za veće koncentracije otopina bravica dobivenih eluacijom 7 dana na AGS staničnoj liniji. Sličan trend uočen je i nakon tretmana Hep G2 i AGS staničnih linija otopinama ligatura i lukova (7 i 14 dana) gdje se pokazalo da niže koncentracije imaju prooksidativno, a više antioksidativno djelovanje. Na CAL 27 stanicama otopina lukova (14 dana) pokazala je prooksidativno djelovanje. Niže koncentracije otopine prstenova (3 dana) djelovale su prooksidativno na Hep G2 stanice, otopine dobivene nakon 7 dana elucije djelovale su prooksidativno pri nižim koncentracijama na AGS i CAL staničnim linijama (s time da je na CAL 27 stanicama izmjenren i toksični učinak), te je otopina dobivena nakon 14 dana elucije pokazala prooksidativni učinak pri nižim koncentracijama na AGS, HepG2 i CAL 27 stanicama. Metali koji inače najznačajnije utječu na prooksidativnu aktivnost su željezo, krom, bakar te naravno, nikal (Zieniweska i sur., 2020; Spalj i sur., 2012). Kao što je vidljivo u prilogu 1, uzorci s najviše nikla, ali i kobalta, kroma i kadmija, su oni u kojima su stajali prstenovi te oni i pokazuju najveću prooksidativnu aktivnost, koja jača s vremenom inkubacije u slini, baš kao što se i povećava koncentracija metala. Također, s obzirom na to da svi uzorci imaju znatno višu koncentraciju kroma i nikla u odnosu na kontrolu, bilo je očekivano prooksidativno djelovanje svih uzoraka, pogotovo onih s vremenom elucije od 7 i 14 dana, što je i izmjereno.

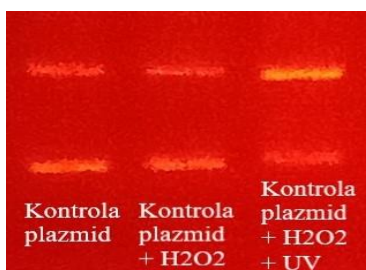
Rezultati dosadašnjih istraživanja prooksidativne aktivnosti metala iz ortodontskih naprava nisu jasni i jednaki, no većinski je primijećeno kako se najveća aktivnost ispoljava u vrlo kratkom početnom periodu ispuštanja iona metala te kako s vremenom ta aktivnost pada, vrlo vjerojatno zbog aktivacije antioksidativnih mehanizama u stanicama (Primožić i sur., 2021; Zieniewska i sur., 2020; Kovač i sur., 2020). To je primjetno i u ovim rezultatima, uz iznimku uzoraka u kojima su stajale ligature, čija prooksidativna aktivnost raste s vremenom u kojem su ligature stajale u slini.

Moguća je povezanost te anomalije s činjenicom da je koncentracija nikla u uzorcima u kojima su stajale ligature i više od 10 puta niža od koncentracije nikla u uzorcima u kojima su stajali prstenovi. Također, opet je bitno napomenuti kako je u ovom istraživanju izloženost stanica uzorcima bila 24 h u kontinuitetu, što ne predstavlja realnu situaciju u organizmu pacijenta, jer u realnoj situaciji dolazi do stalnog ispiranja slinom.

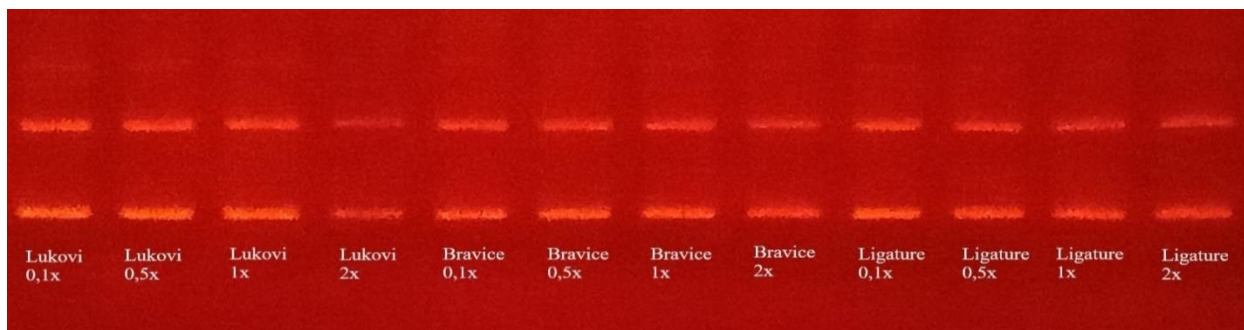
Dosadašnja istraživanja također govore kako je nastajanje ROS-ova, uz to što je kratkotrajno, i lokalizirano te da se lako može kontrolirati i smanjiti vođenjem kvalitetne dentalne higijene i uzimanjem antioksidansa (Primožič i sur., 2021; Zieniewska i sur., 2020; Kovač i sur., 2020).

4.4. ISPITIVANJE PROOKSIDATIVNOG UČINKA NA DNA METODOM LINEARIZACIJE PLAZMIDA ϕ X-174 RF I

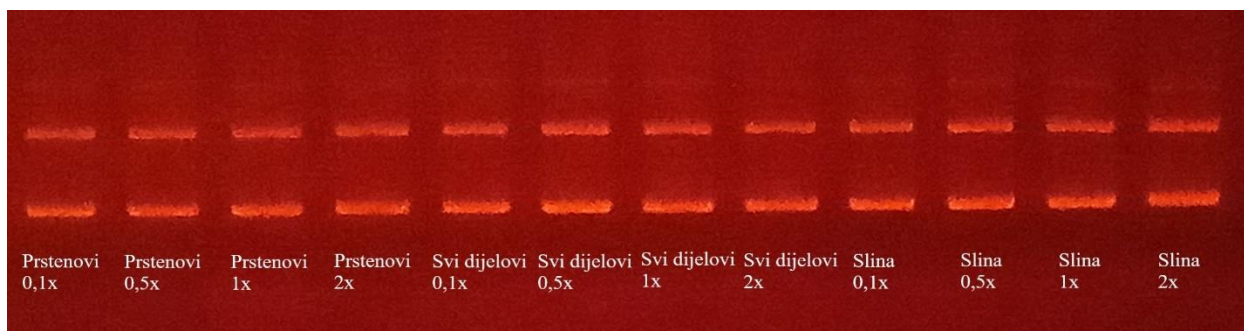
Testirane su sve koncentracije (0,1x, 0,5x, 1x i 2x) otopina dobivenih eluacijom metala iz bravica, lukova, prstenova, ligatura i svih dijelova nakon 3, 7 i 14 dana. Gelovi su prikazani na slikama 38-44, a kako bi se mogao odrediti udio lineariziranog i superzavijenog plazmida, vrpce su obrađene u programu GelAnalyzer. Za svaki uzorak dobivene su po dvije vrijednosti omjera superzavijenog (SC) oblika plazmida i linearnog oblika plazmida. Srednja vrijednost za svaki uzorak korištena je kao podatak za izradu grafova na slikama 45-50.



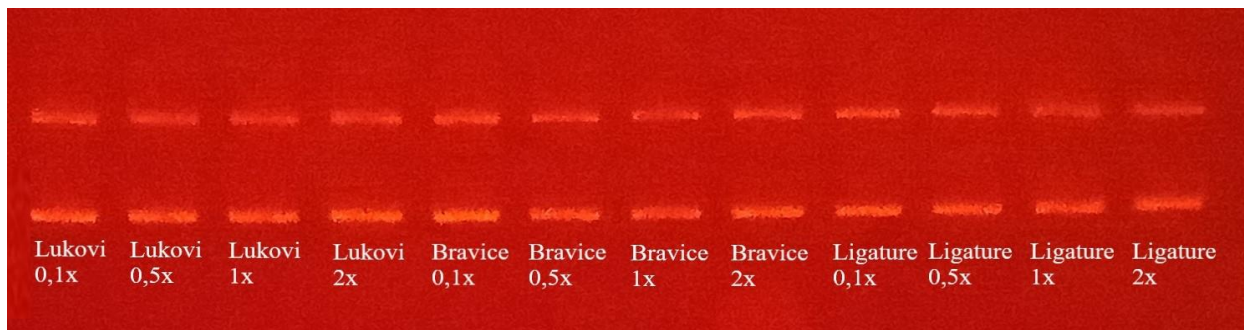
Slika 38. Prooksidacijski učinak na kontrolama.



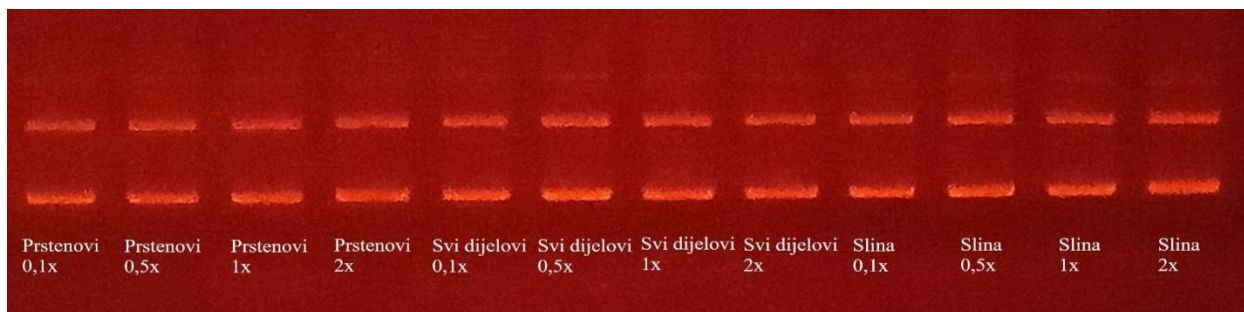
Slika 39. Prooksidacijski učinak ortodontskih naprava nakon 3 dana eluacije u umjetnoj slini.



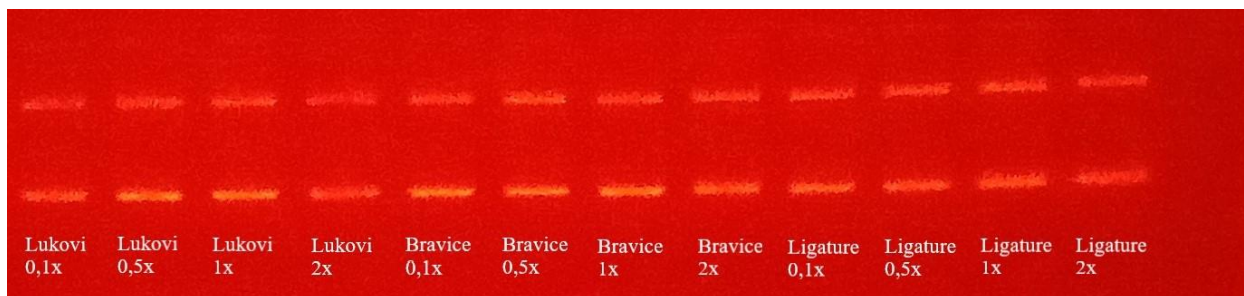
Slika 40. Prooksidacijski učinak ortodontskih naprava nakon 3 dana eluacije u umjetnoj slini.



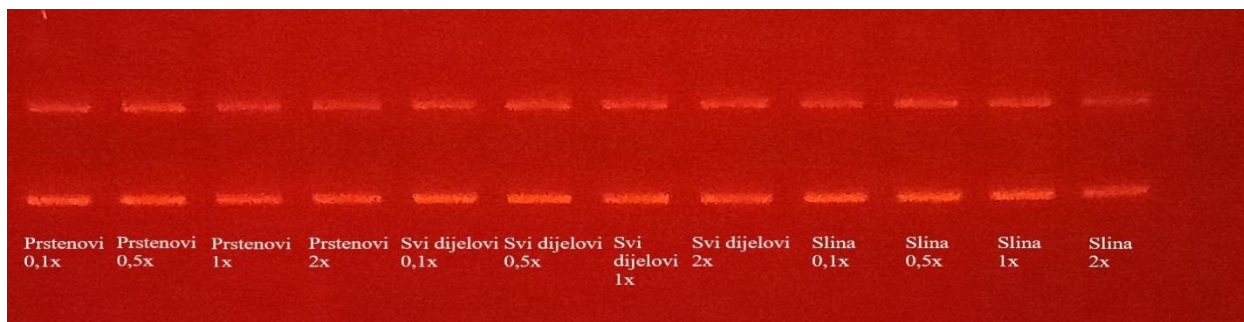
Slika 41. Prooksidacijski učinak ortodontskih naprava nakon 7 dana eluacije u umjetnoj slini.



Slika 42. Prooksidacijski učinak ortodontskih naprava nakon 7 dana eluacije u umjetnoj slini.

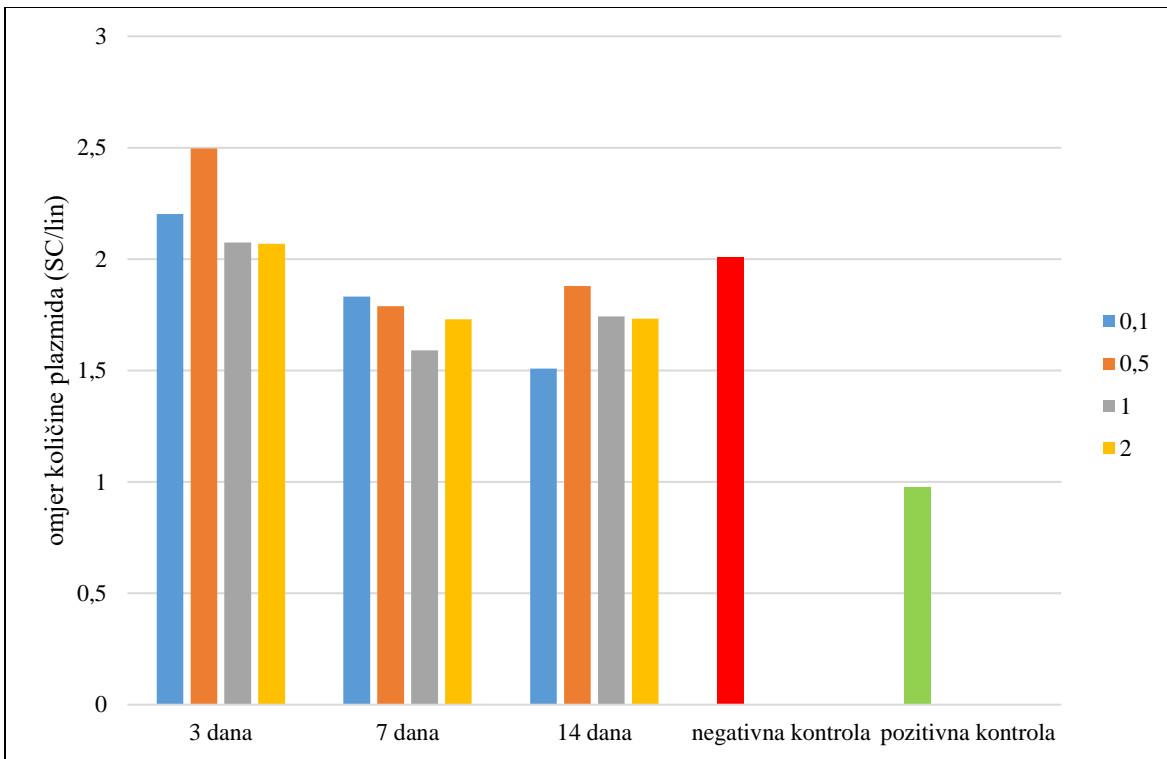


Slika 43. Prooksidacijski učinak ortodontskih naprava nakon 14 dana eluacije u umjetnoj slini.

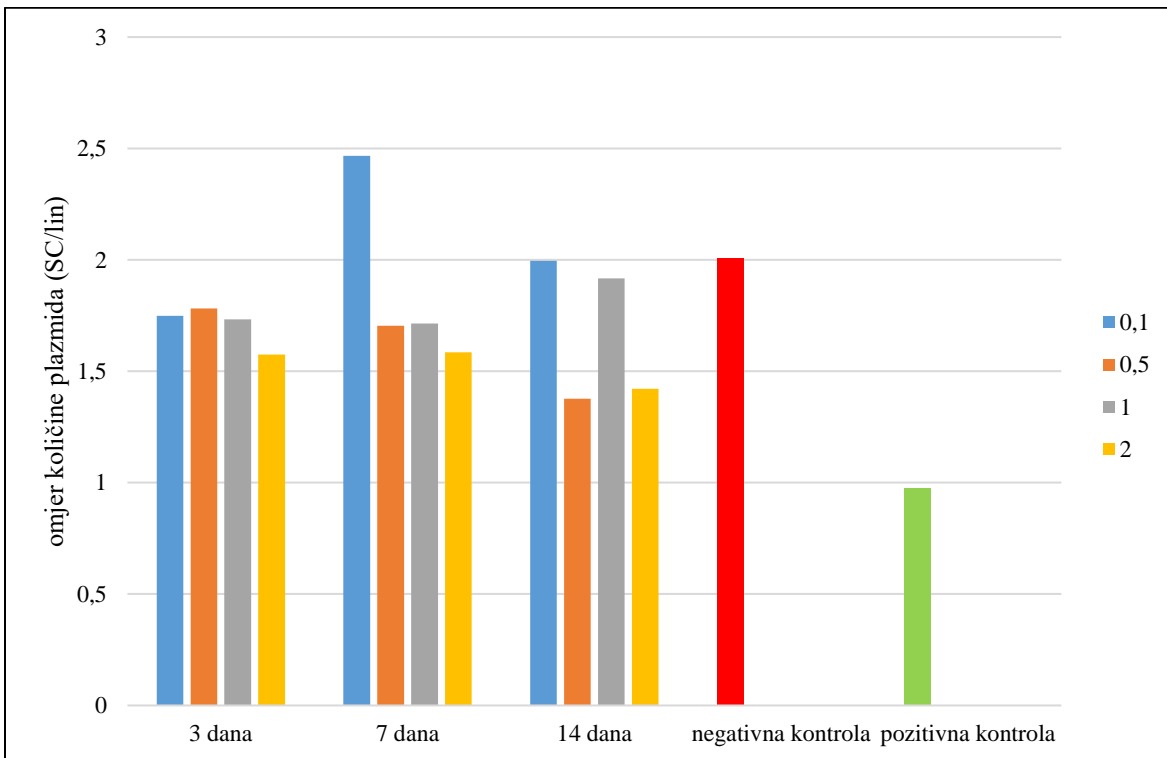


Slika 44. Prooksidacijski učinak ortodontskih naprava nakon 14 dana eluacije u umjetnoj slini.

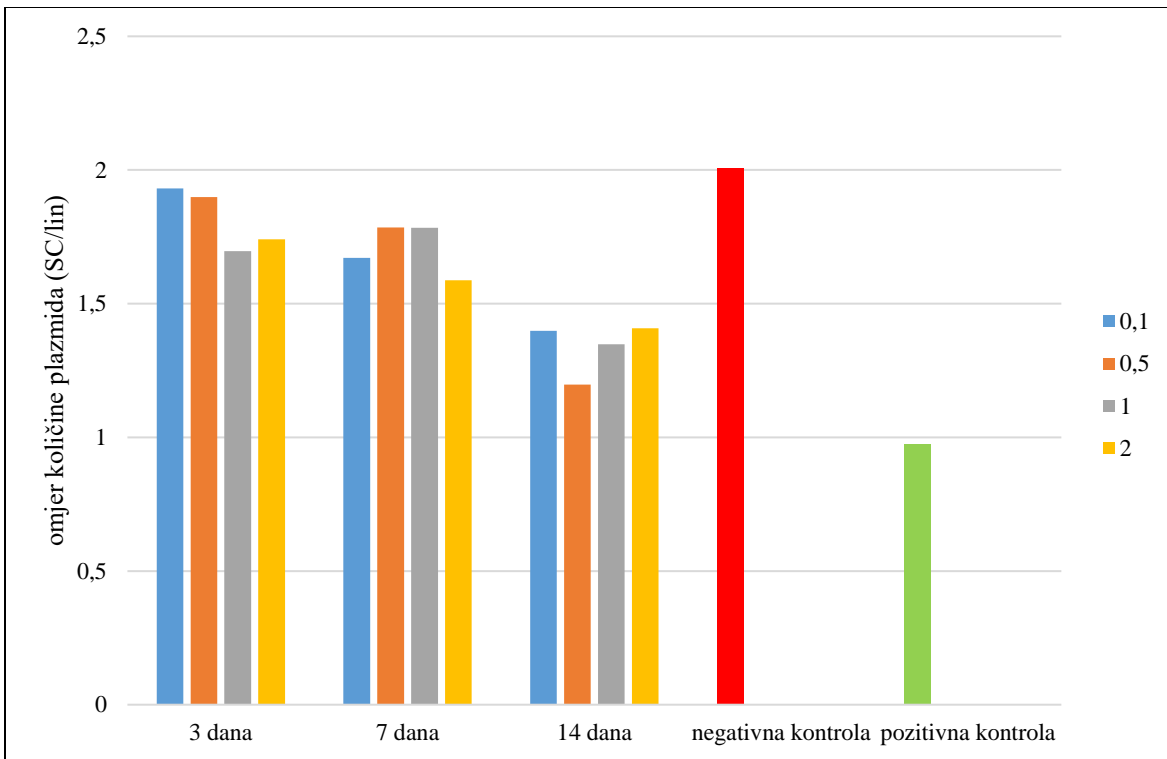
Iz slika je vidljivo kako uzorci nemaju značajnu prooksidativnu aktivnost jer ni jedan uzorak nije rezultirao time da ima toliko više lineariziranog plazmida u odnosu na super zavijeni oblik kao što je to u pozitivnoj kontroli. Iz prikazanih slika teško je uspoređivati jačinu intenziteta superzavijenog i lineariziranog udjela plazmida te je gotovo nemoguće odrediti koji je uzorak imao jače prooksidativno djelovanje. Stoga su vrpce učitane u program GelAnalyzer kako bi se dobili precizni i što objektivniji rezultati te su oni grafički prikazani na slikama 45-50.



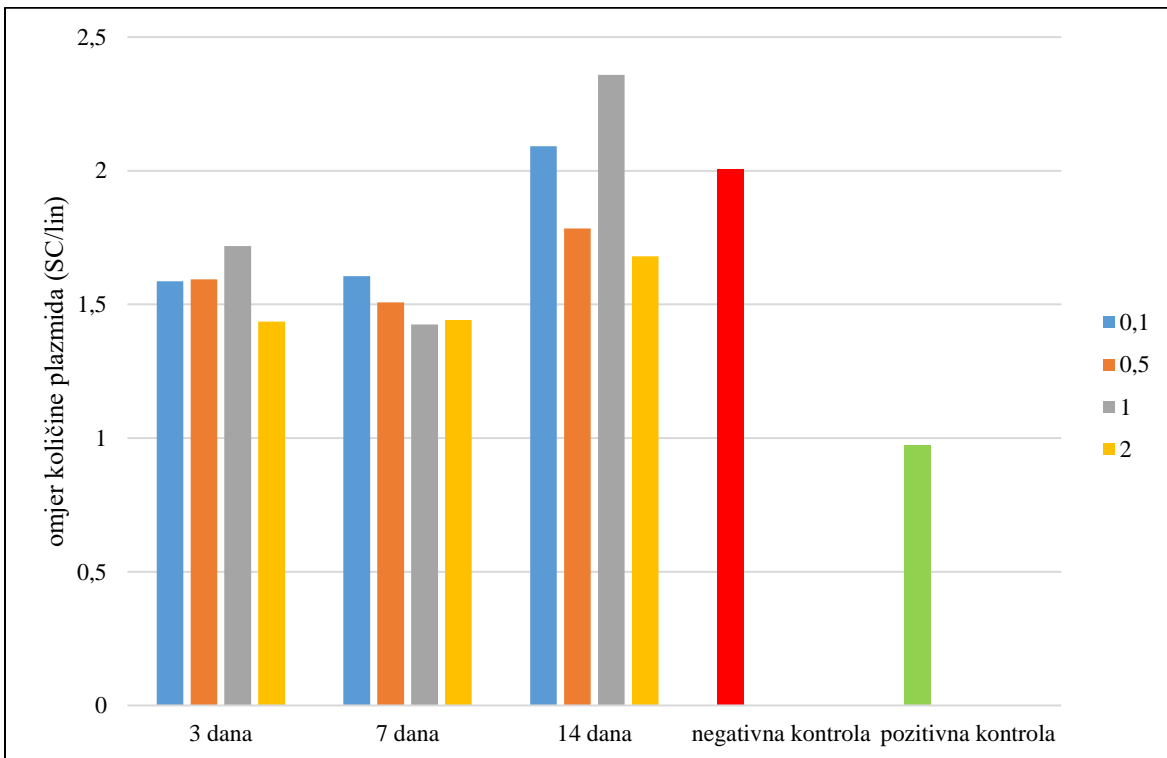
Slika 45. Prooksidativno djelovanje sline nakon elucije ortodontskih lukova.



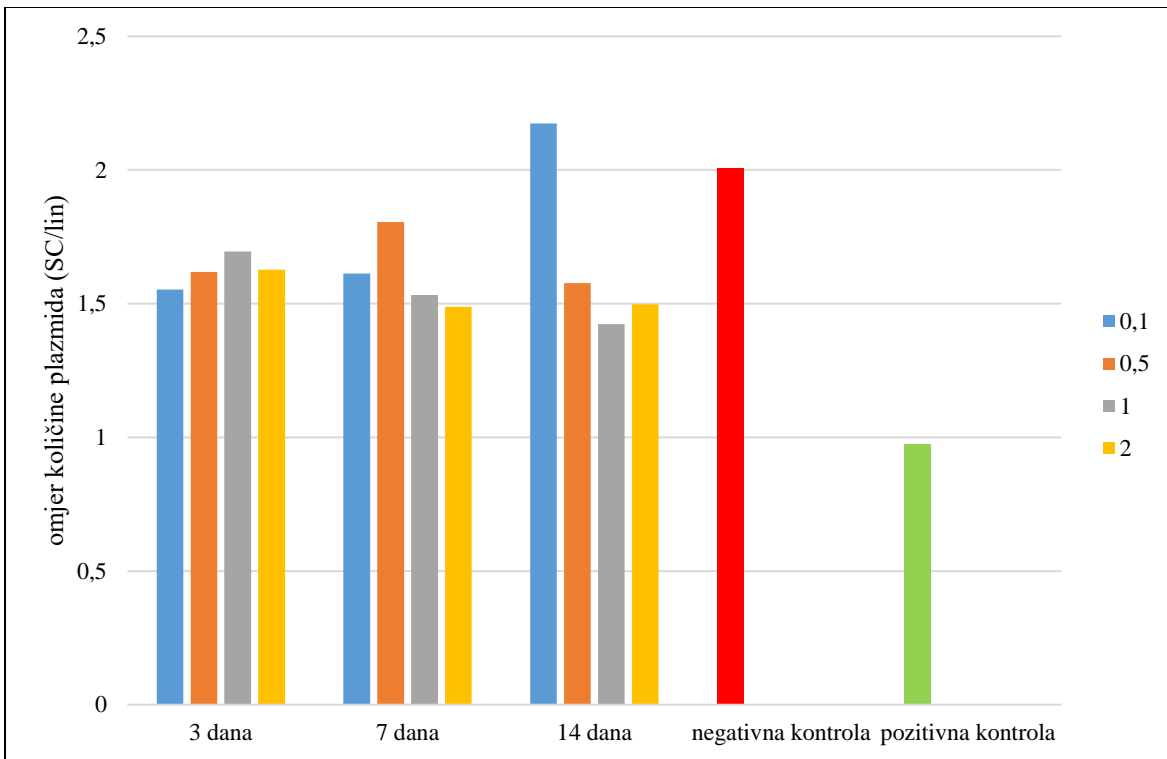
Slika 46. Prooksidativno djelovanje sline nakon elucije ortodontskih bravica.



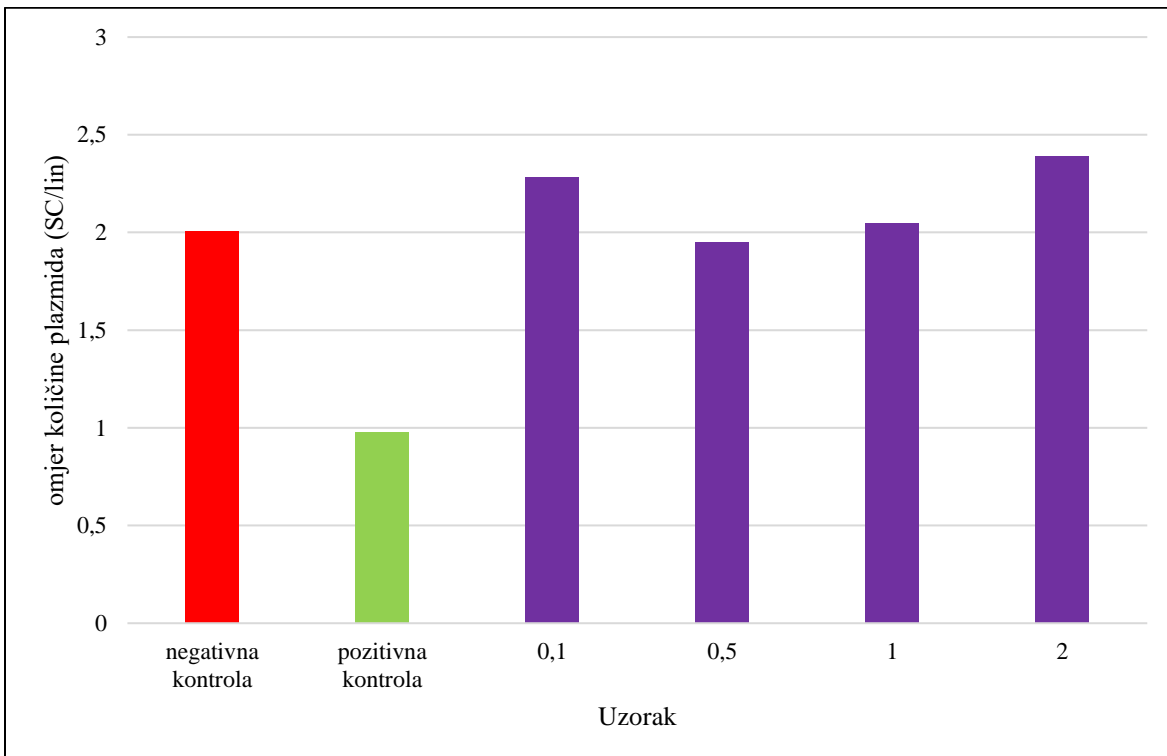
Slika 47. Prooksidativno djelovanje sline nakon elucije ortodontskih ligatura.



Slika 48. Prooksidativno djelovanje sline nakon elucije ortodontskih prstenova.



Slika 49. Prooksidativno djelovanje sline nakon elucije svih ortodontskih dijelova.



Slika 50. Prooksidativno djelovanje sline.

Iz rezultata na slikama 44-49 je vidljivo da gotovo svi uzorci pokazuju blago prooksidativno djelovanje na DNA (manji omjer SC i linearnog oblika plazmida u odnosu na negativnu kontrolu, no veći omjer u odnosu na pozitivnu kontrolu) te da slina ne pokazuje takvo djelovanje, dakle za oštećenja DNA su odgovorni dijelovi ortodontskih naprava, tj. metali koje su ti dijelovi ispustili u slinu. S obzirom na metale u sastavu naprava, koji je vidljiv u prilogu 1, takvi rezultati su i očekivani, jer su i dosadašnja istraživanja potvrdila ulogu prooksidativne aktivnosti metala u nastajanju oštećenja DNA, koristeći metode M13 testa mutacija i sekvencioniranja DNA te metodu linearizacije plazmida (Reid i sur., 1994; Kawanishi i sur., 1994; Toyokuni i Sagripanti, 1992).

Dosadašnja istraživanja pokazala su kako su za oštećenja DNA uzrokovanu ROS-ovima među metalima najveći „krivci“ krom, kadmij, nikal, berilij, arsen te kobalt, bakar i željezo (Bal i Kasprzak, 2002; Reid i sur., 1994; Kawanishi i sur., 1994; Toyokuni i Sagripanti, 1992). Kao što se može vidjeti u prilogu 1., svi ispitani uzorci u ovom radu imaju podjednaku koncentraciju kadmija pa on ne može predstavljati odlučujući faktor u eventualnim razlikama u prooksidativnom učinku.

U slučaju lukova neovisno o koncentracijama, prooksidativno djelovanje pokazuju uzorci u kojima su lukovi stajali 7 i 14 dana, što je u skladu s porastom koncentracije metala s vremenom inkubacije u tim uzorcima.

Što se tiče bravica i uzoraka koncentracije 0,1, prooksidativnu aktivnost jedino pokazuje uzorak u kojemu su bravice stajale 3 dana. Kod većih koncentracija sva 3 uzorka s bravicama pokazuju prooksidativnu aktivnost, što je i očekivano s obzirom na veće koncentracije kobalta, kroma i nikla u njima u odnosu na kontrolu. Prateći trend promjene prooksidativnog djelovanja po danima elucije, može se zaključiti da produljena elucija rezultira povećanim prooksidativnim djelovanjem.

Što se tiče uzoraka s ligaturama, pri dvije niže koncentracije prooksidativno djeluju samo uzorci u kojima su ligature stajale 7 i 14 dana, a pri dvije više koncentracije svi uzorci. To je i očekivano s obzirom na porast koncentracije metala s vremenom inkubacije.

Uzorci s prstenovima koji su pokazali prooksidativnu aktivnost su, pri koncentracijama 0,1 i 1 oni u kojima su prstenovi stajali 3 i 7 dana, a pri koncentracijama 0,5 i 2 svi. S obzirom na

izrazito visoku koncentraciju kobalta, kroma i nikla u uzorcima s prstenovima, očekivana je prooksidativna aktivnost ovih uzoraka. Otopina dobivena elucijom 14 dana pokazuje slabo prooksidativno djelovanje, što se može povezati s blagim padom koncentracije željeza i kroma u tom uzorku u odnosu na eluate od 7 i 14 dana.

U slučaju uzoraka u kojima su bili svi dijelovi naprava, oni koncentracije 0,1 koji pokazuju prooksidativnu aktivnost su uzorci u kojima su dijelovi stajali 3 i 7 dana, a svi uzorci viših koncentracija također pokazuju istu tu aktivnost. Ovakve rezultate može se povezati sa sastavom samih uzoraka. U prilogu 1 vidljivo je da uzorci s inkubacijom od 3 i 7 dana imaju veću koncentraciju nikla i kroma u odnosu na uzorak u kojem su dijelovi bili inkubirani 14 dana te je bilo i za očekivati da će oni imati jači prooksidativni učinak na DNA.

Iz ovih rezultata može se zaključiti da metali izlučeni u slinu u ranom periodu nakon stavljanja ortodontske naprave mogu dovesti do oštećenja DNA, no u maloj količini, jer su omjeri oblika plazmida i dalje bliži negativnoj kontroli nego pozitivnoj te taj omjer ni u kojem uzorku nije manji od 1.

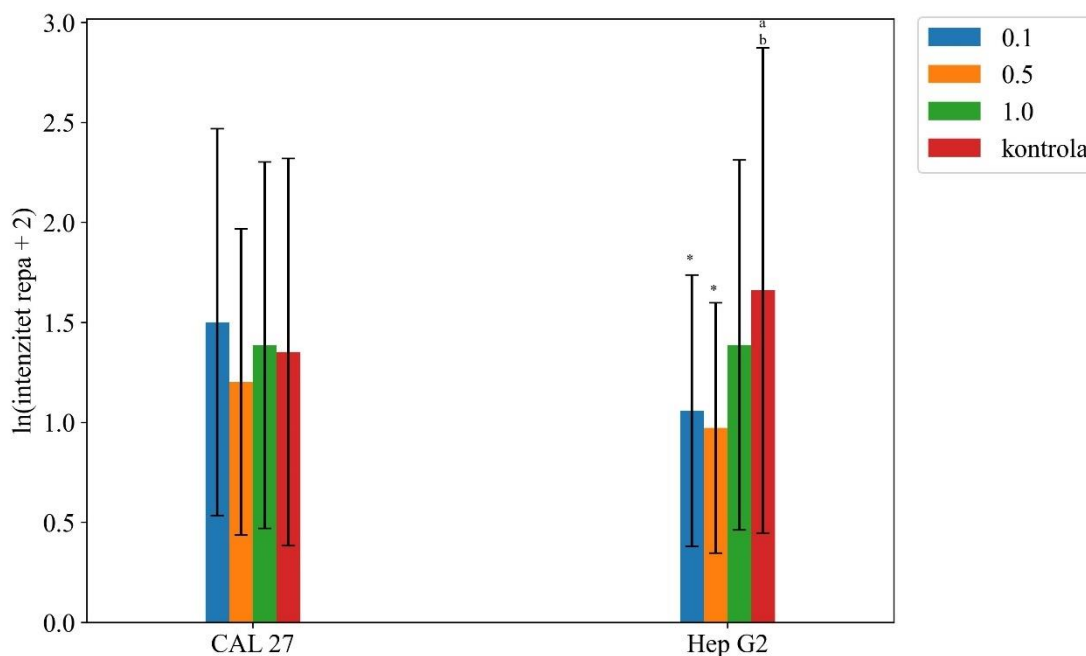
Ukoliko se uspoređuju svi ispitani uzorci, da se zaključiti da su najštetniji uzorci u kojima su ligature stajale 14 dana, bez obzira na koncentraciju, što s obzirom na koncentracije metala u uzorcima nije bilo očekivano, no ne smije se zaboraviti na sinergistički učinak metala koji može biti uzrok povećane prooksidativne aktivnosti u uzorcima (Primožič i sur., 2021). Također, općenito gledano, vidi se kako prooksidativna aktivnost raste s vremenom stajanja dijelova naprava u slini, što je u skladu s porastom koncentracije većine metala u uzorcima, kao što je vidljivo u prilogu 1.

4.5. ISPITIVANJE GENOTOKSIČNOSTI KOMET TESTOM

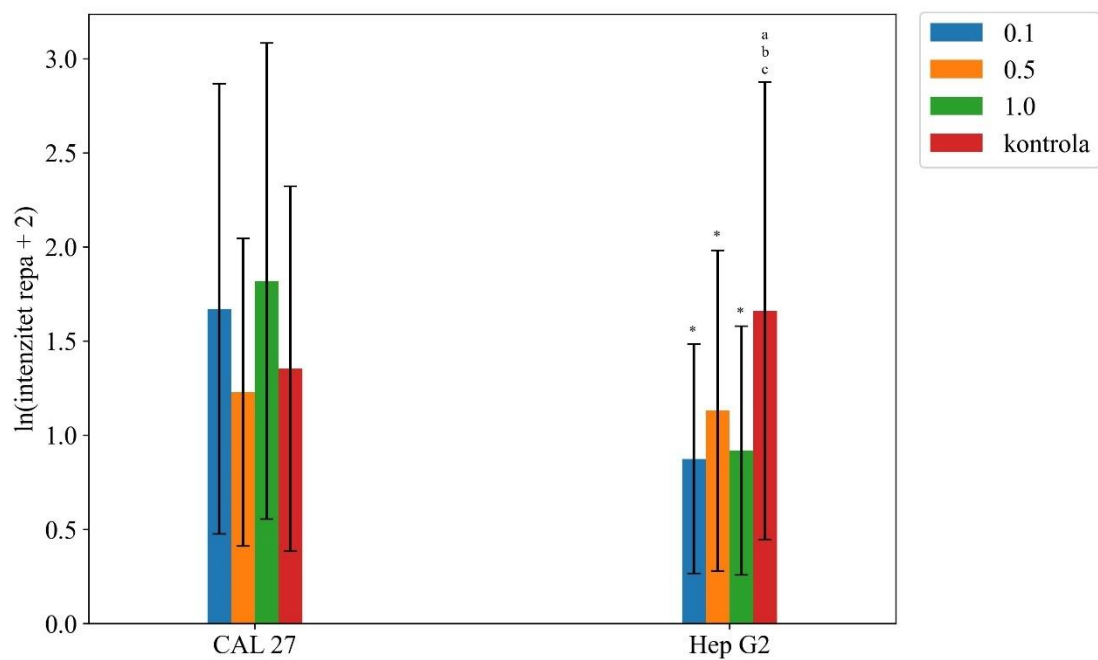
Kao što je već rečeno, za ispitivanje genotoksičnosti komet testom nisu podobni svi uzorci, već samo oni koji pokazuju određenu prooksidativnu aktivnost, ali i rezultiraju preživljenjem stanica većim od oko 80 %. Prema tim parametrima odabrani su određeni uzorci određenih koncentracija te su testirani samo na odgovarajućim staničnim linijama te su rađene kontrole za svaku staničnu liniju (stanice uzgojene u čistom RPMI mediju). Primjetno je da niti jedan uzorak

koncentracije 2 puta nije odabran zbog niskog preživljenja stanica. Također, uzorci iz sva tri vremenska perioda koji su zadovoljili kriterije za komet test su bili samo oni u kojima su stajali prstenovi i svi dijelovi zajedno.

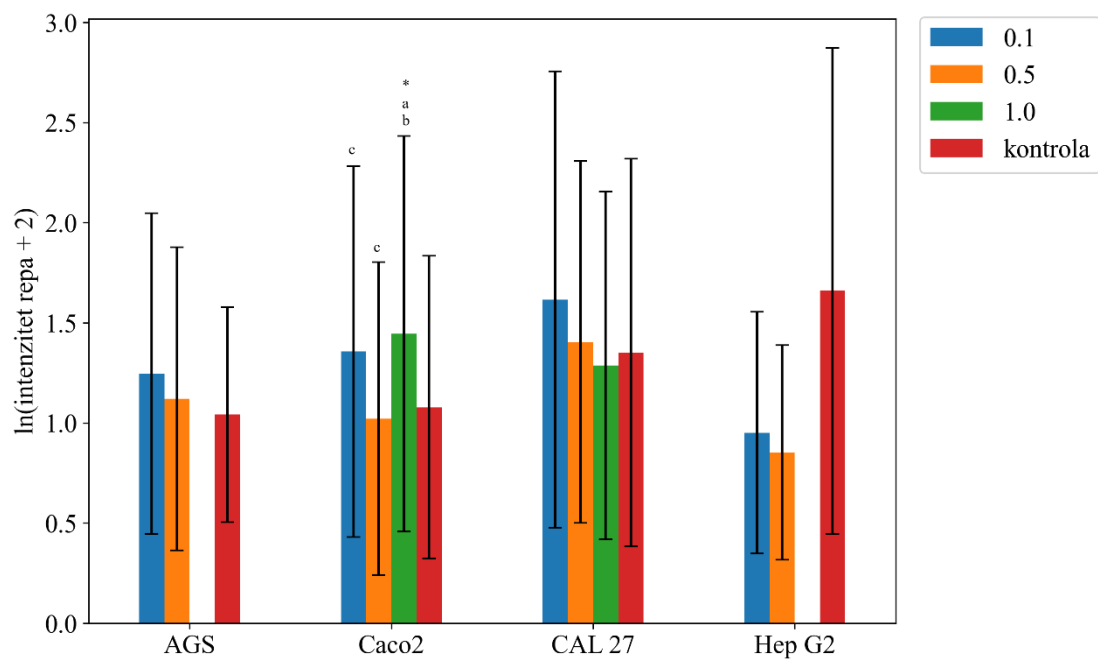
Svaki odabrani uzorak ispitan je na genetičkom materijalu 51 stanice. Iako se može pratiti više parametara, u ovom radu je promatran intenzitet repa, kao što sugeriraju i mnogi radovi fokusirani na razvoj komet testa, jer se parametar smatra najznačajnijim za određivanje genotoksičnosti (Møller i sur., 2020). Dobiveni podaci o intenzitetima repova su normalizirani te je za svaki uzorak izračunata srednja vrijednost za izradu grafova. Rezultati su prikazani na slikama 50-59. Na slikama se prikazuje ovisnost genotoksičnosti uzoraka o koncentraciji uzoraka uz standardne devijacije mjerenja te statistički značajne odnose rezultata, za odabrane stanične linije. Oznake statističke značajnosti su: a – značajno u odnosu na koncentraciju 0,1; b – značajno u odnosu na koncentraciju 0,5; c – značajno u odnosu na koncentraciju 1; * - značajno u odnosu na kontrolu).



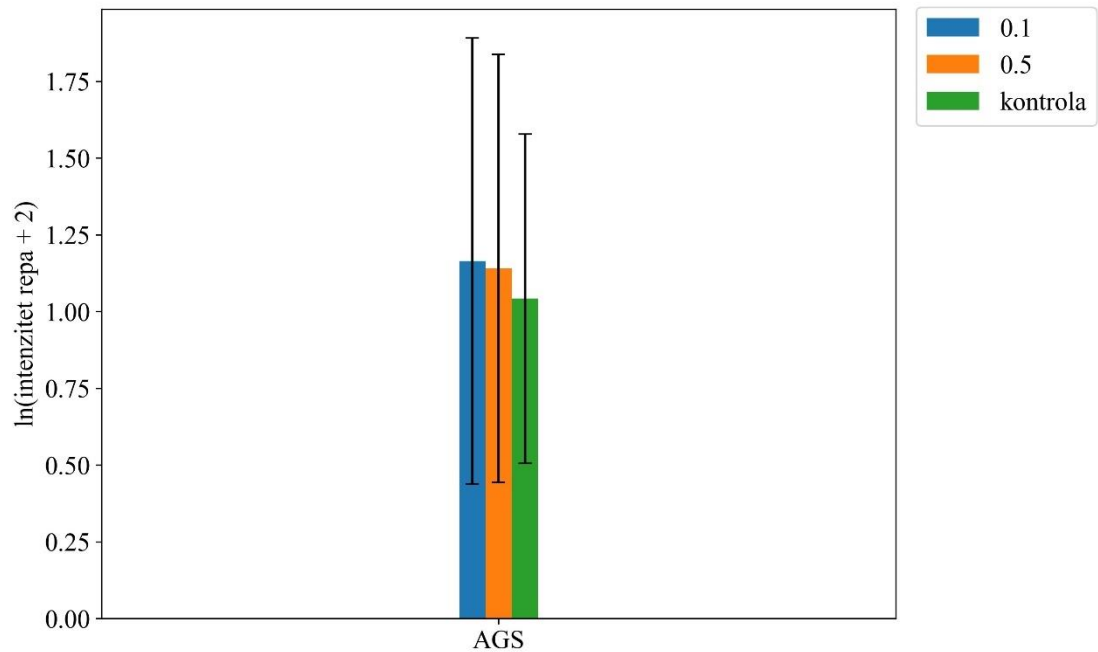
Slika 51. Genotoksičnost nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon tri dana inkubacije s bravicama.



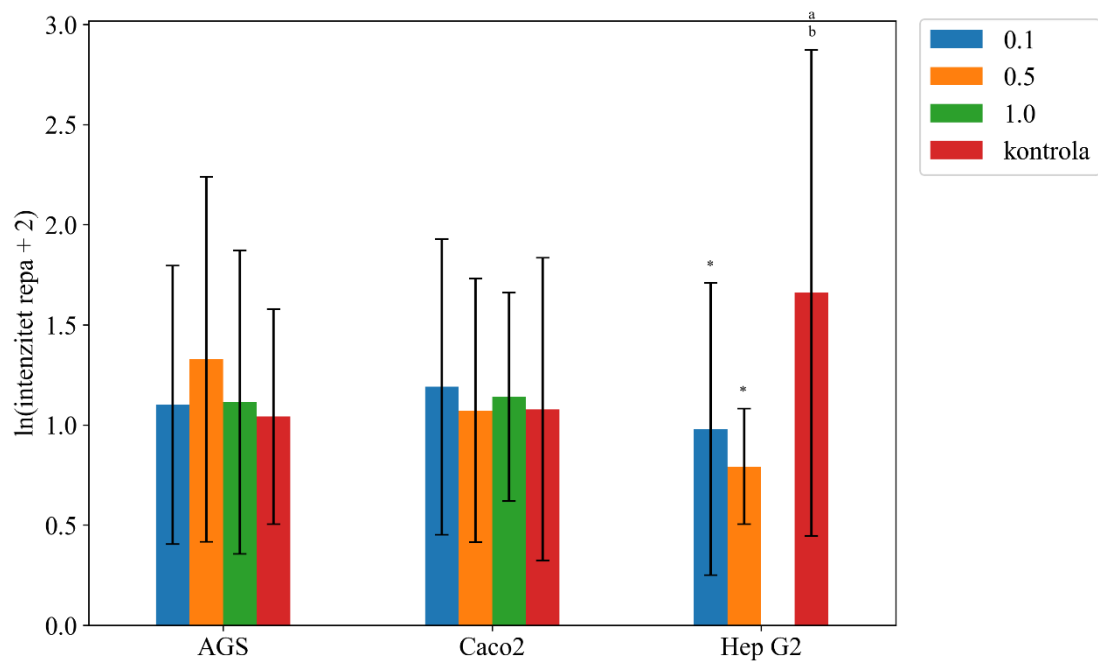
Slika 52. Genotoksičnost nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon četrnaest dana inkubacije s ligaturama.



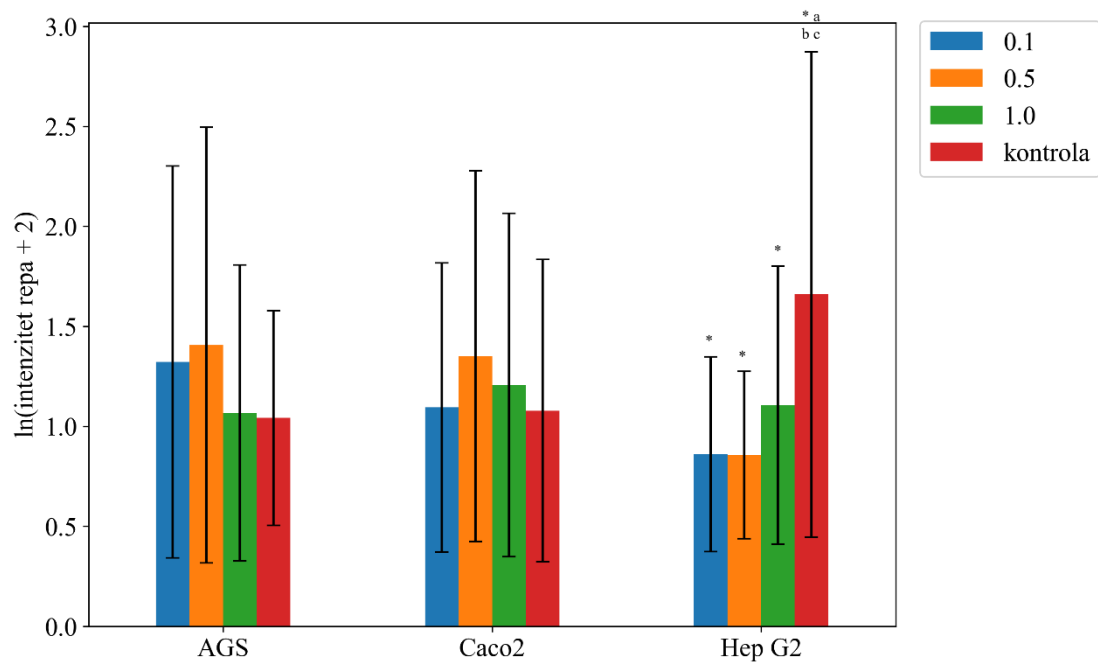
Slika 53. Genotoksičnost nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon tri dana inkubacije s lukovima.



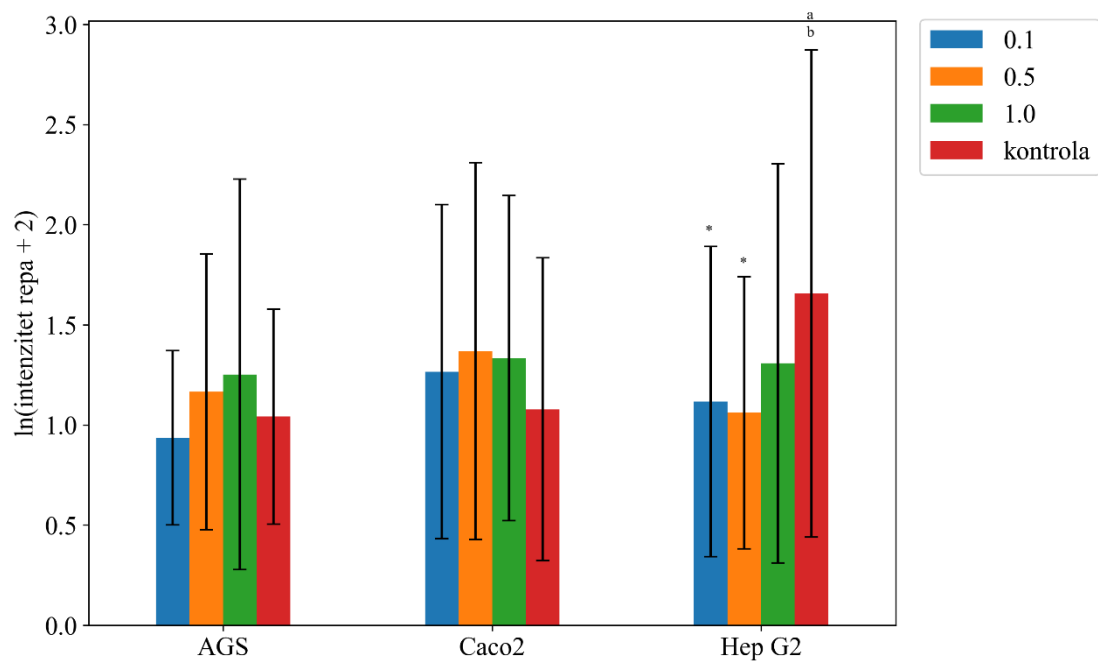
Slika 54. Genotoksičnost nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon sedam dana inkubacije s lukovima.



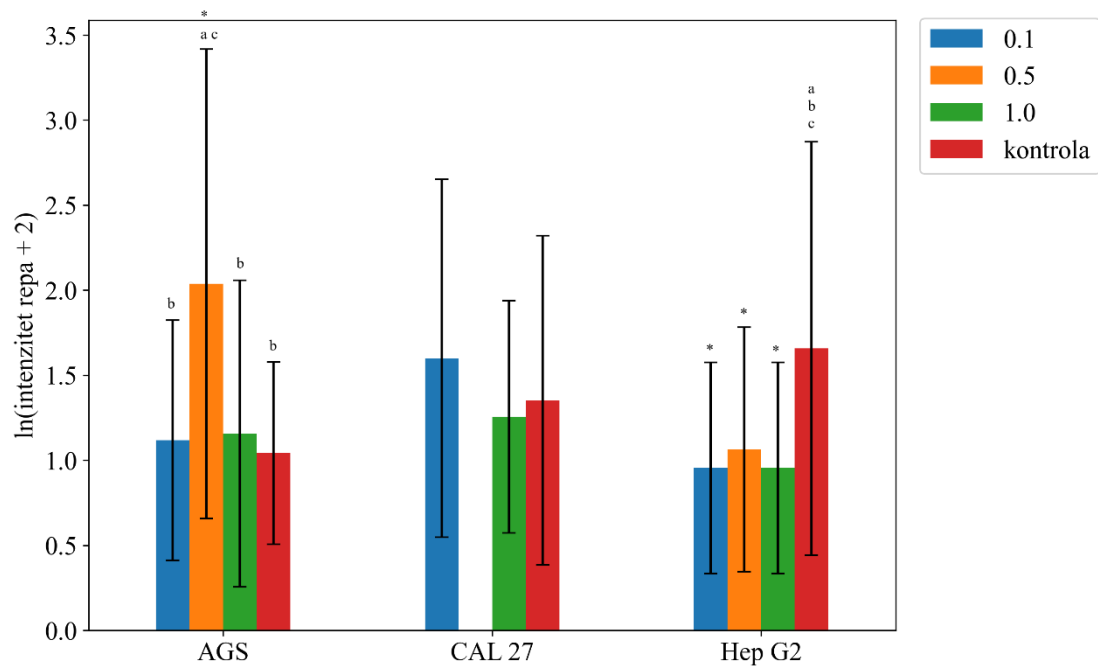
Slika 55. Genotoksičnost nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon tri dana inkubacije s prstenovima.



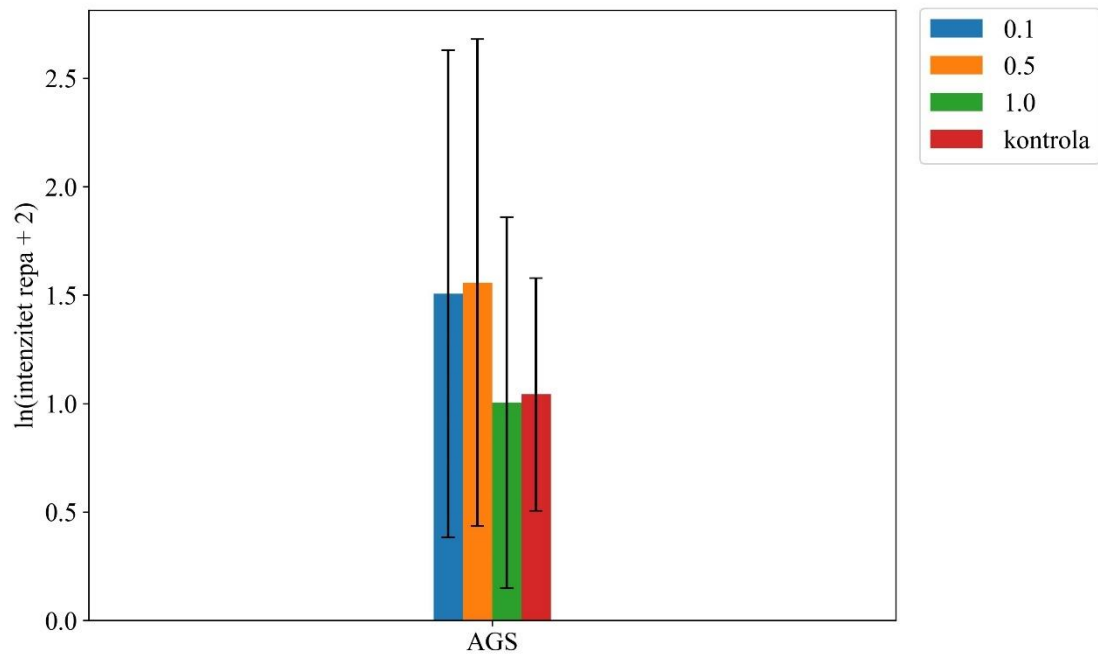
Slika 56. Genotoksičnost nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon sedam dana inkubacije s prstenovima.



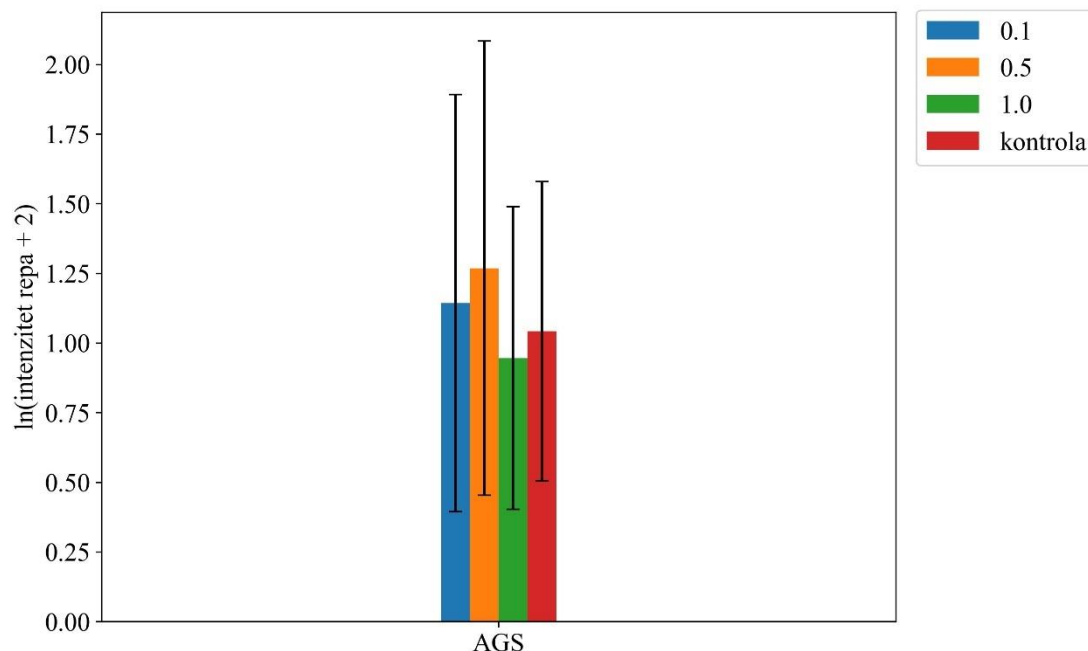
Slika 57. Genotoksičnost nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon četrnaest dana inkubacije s prstenovima.



Slika 58. Genotoksičnost nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon tri dana inkubacije sa svim dijelovima.



Slika 59. Genotoksičnost nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon sedam dana inkubacije sa svim dijelovima.



Slika 60. Genotoksičnost nakon tretmana s otopinama umjetne sline nakon četrnaest dana inkubacije sa svim dijelovima.

Dosadašnje provedene *in vitro* studije uglavnom za genotoksičnost ortodontskih naprava smatraju „krivima“ kadmij, krom i nikal, dok dijelovi s titanom često uopće ne pokazuju toksičnost (Karlina i sur., 2016; Gonçalves i sur., 2014; Ortiz i sur., 2011; Tomakidi i sur., 2000). Statistički značajnu genotoksičnost u odnosu na kontrolu u ovim rezultatima pokazuju samo uzorak s lukovima inkubiranim 3 dana, koncentracije 1x na Caco2 staničnu liniju te uzorak sa svim dijelovima inkubiranim 3 dana na AGS staničnu liniju koncentracije 0,5x. Ti uzorci imaju povećanu koncentraciju nikla i kroma u odnosu na kontrolu te na iste uzorke inkubirane 7 i 14 dana, pa je genotoksičnost bila i očekivana. Uzorak inkubiran sa svim dijelovima 3 dana ima i 9 puta više aluminija u odnosu na kontrolu, koji isto doprinosi genotoksičnosti (Francisco i sur., 2021). Također, sinergističko djelovanje metala može dovesti do povećane genotoksičnosti uzoraka (Primožič i sur., 2021). Uzorci s prstenovima imaju i do 100 puta veću koncentraciju nikla i kroma pa je očekivana izrazita genotoksičnost tih uzoraka, no rezultati to ne pokazuju. Moguće je da je došlo do aktivacije mehanizma popravka DNA u stanicama te zbog toga nisu vidljive posljedice djelovanja metala na DNA (Hafez i sur., 2011).

Na rezultatima uzoraka s prstenovima i svim dijelovima naprave, kod kojih su ispitani svi vremenski periodi, primjetan je i rast vrijednosti genotoksičnosti uzoraka određenih koncentracija s vremenskim periodom stajanja dijelova u slini. Ta proporcionalnost pogotovo je primjetna na uzorcima u kojima su dijelovi stajali 3 i 7 dana, dok 14. dan uglavnom pokazuje stagnaciju ili blagi pad vrijednosti. Kao što je vidljivo u prilogu 1, koncentracija određenih metala, poput nikla i kroma, koji djeluju genotoksično, pada 14. dan u odnosu na 7. dan inkubacije, te je sukladno tome i logičan pad vrijednosti genotoksičnosti u 14. danu inkubacije. To je u skladu s dosad provedenim istraživanjima, koja, kao što je već rečeno, također pokazuju da genotoksičnost raste s vremenskim periodom izlaganju metalu, no isto tako kako dugoročno onda opet pada (Kishore i sur., 2021; Karlina i sur., 2016).

Ono što je zanimljivo primijetiti jest to da niti jedan uzorak testiran na Hep G2 stanicama ne pokazuje veću genotoksičnost u odnosu na kontrolu, što je vjerojatno posljedica toga da su se u stanicama aktivirali mehanizmi popravka DNA. S druge strane, stanice jetre su bogate na proteinima koji imaju afinitet vezanja različitih metala te na taj način dolazi do smanjenja koncentracije metala u slobodnoj formi koji bi mogli izazvati genotoksični učinak. Također, očekivano jest da uzorci najveće koncentracije, one jednake realnoj fiziološkoj, pokazuju najveću genotoksičnost, no na slikama je vidljivo kako tome nije tako, stoga je moguće zaključiti kako su te koncentracije izazvale štetu, ali da su se aktivirali mehanizmi popravka DNA u stanicama (Kishore i sur., 2021; Hafez i sur., 2011). Takvi rezultati mogli bi biti ohrabrujući jer se opet može zaključiti kako genotoksičnost metala iz ortodontskih naprava nije tolika da se ljudski organizam ne može „obraniti“ od nje.

Neka provedena istraživanja genotoksičnosti također su rezultirala zaključkom da postoji određen genotoksični efekt metala iz ortodontskih naprava na ljudske stanice poput HGFA, Hep G2 i HOC staničnih linija i stanica oralne sluznice *in vivo* (Loyola-Rodriguez i sur., 2020; Martín-Cameán i sur., 2015b; Hafez i sur., 2011), iako su različita istraživanja pokazala pomalo kontradiktorne rezultate. To je objašnjivo time što sami rezultati testova genotoksičnosti ovise o broju faktora, poput specifičnosti naprave i njenih dijelova, sastava naprava, proizvođača naprava koje se testiraju, veličini uzoraka, vremenskom periodu iz kojeg se uzimaju uzorci, metodi testiranja te o tome provodi li se istraživanje *in vivo* ili *in vitro* (Martín-Cameán i sur., 2015b).

U konačnici može se sumirati da vrijeme elucije ortodontskih naprava utječe na sastav sline. Sukladno tome, javljaju se i različiti biološki efekti na stanice koje su izložene djelovanju takvih eluata.

Najosjetljivije stanice bile su CAL 27 na koje je većina eluata djelovala toksično u cijelom koncentracijskom rasponu neovisno o vremenu elucije. Posljedice citotoksičnog učinka manifestirale su se i na prooksidacijsko djelovanje, koje zbog povećane toksičnosti nije moglo biti detektirano na ovim stanicama.

Otopina lukova dobivena nakon 3 dana elucije stimulirala je proliferaciju Hep G2 stanica, dok prooksidacijsko djelovanje nije izmjereno.

Na AGS staničnoj liniji određeno je da niže koncentracije (0,1x i 0,5x) bravica (3 dana), ligatura (7 i 14 dana), prstenova, te eluat svih dijelova izazivaju prooksidacijsko djelovanje, dok više koncentracije eluata istih tih dijelova (1x i 2x) imaju antioksidacijsko djelovanje.

Korištenjem plazmida kao biološkog test sustava uočeno je blago prooksidacijsko djelovanje eluata svih naprava, no taj je učinak bio vrlo mali u odnosu na negativnu kontrolu i puno slabiji u odnosu na pozitivnu kontrolu.

Genotoksični učinak nije dokazan. Stanice jetre su pokazale puno niže vrijednosti intenziteta repa nakon tretmana s eluatima u odnosu na pozitivnu kontrolu ukazujući na aktivaciju protektivnih mehanizama.

S obzirom na sve navedeno, može se zaključiti da metali prisutni u eluatima ne izazivaju trajne promjene na genetički materijal stanica te je njihova primjena sigurna.

5. ZAKLJUČAK

Nakon provedenih ispitivanja citotoksičnosti, prooksidativne aktivnosti i genotoksičnosti metala koje u slinu ispuštaju ortodontske naprave u periodu do 2 tjedna zaključeno je:

1. Vrijeme elucije ortodontskih naprava utječe na sastav sline te se mogu izmjeriti različiti biološki efekti na stanicama.

2. Većina eluata djelovala je toksično u cijelom koncentracijskom rasponu neovisno o vremenu elucije na CAL 27 stanice. Sukladno tome, prooksidacijsko djelovanje nije moglo biti detektirano na ovim stanicama primjenom DCFDA metode. Otopina lukova dobivena nakon 3 dana elucije stimulirala je proliferaciju HepG2 stanica, dok prooksidacijsko djelovanje nije izmjereno. Na AGS staničnoj liniji određeno je da niže koncentracije (0,1 i 0,5 x) bravica (3 dana), ligatura (7 i 14 dana), prstenova, te eluat svih djelova izazivaju prooksidacijsko djelovanje, dok više koncentracije eluata istih ortodontskih naprava (1 i 2x) imaju antioksidacijsko djelovanje. Na CaCo2 stanicama nije dokazano citotoksično ni prooksidacijsko djelovanje.
3. Na plazmidu ϕ X-174 RF I uočeno je blago prooksidacijsko djelovanje eluata svih naprava, no taj je učinak bio vrlo mali u odnosu na negativnu kontrolu i puno slabiji u odnosu na pozitivnu kontrolu.
4. Genotoksični učinak nije dokazan.
5. Metali prisutni u eluatima ne izazivaju trajne promjene na genetički materijal stanica te je njihova primjena sigurna.

6. LITERATURA

Alansari, R. A., Faydhi, D. A., Ashour, B. S., Alsaggaf, D. H., Shuman, M. T., Ghoneim, S. H., Linjawi, A. I., Marghalani, H. Y., Dause, R. R. (2019) Adult Perceptions of Different Orthodontic Appliances. *Patient. prefer. adherence.*, **13**, 2119–2128. doi: 10.2147/PPA.S234449

Alsulami, R. N. (2016) Oxidation of nucleic acids: chemistry of pyrene quinone and development of dihydrodioxins as dna photooxidizing agents (doktorska disertacija), Graduate College, Bowling Green State University, Ohio, Sjedinjene Američke Države.

Amadi, C. N., Offor, S. J., Frazzoli, C., Orisakwe, O. E. (2019) Natural antidotes and management of metal toxicity. *Environ. sci. pollut. r.*, **26**(18), 18032–18052. doi: 10.1007/s11356-019-05104-2

Ametek, <<https://www.ametekmetals.com/markets/medical>>. Pristupljeno 31. ožujka 2021.

Asri, R., Harun, W., Samykano, M., Lah, N., Ghani, S., Tarlochan, F., Raza, M. R. (2017) Corrosion and surface modification on biocompatible metals: A review. *Mat. sci. eng. C-Mater.*, **77**, 1261–1274. doi: 10.1016/j.msec.2017.04.102

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2021), <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/chromium/physiologic_effects_of_chromium_exposure.html>. Pristupljeno 19. svibnja 2021.

Bal, W., Kasprzak, K. S. (2002). Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. *Toxicol. lett.*, **127**(1-3), 55–62. doi: 10.1016/s0378-4274(01)00483-0

Britannica (2019), <<https://www.britannica.com/technology/alloy>>. Pristupljeno 12. travnja 2021.

Cunha, A. S., Castillo, W. O., Takahashi, C. S., Kuchler, E. C., Segato, R., da Silva, L., Romano, F. L., Matsumoto, M., Nelson-Filho, P. (2018) Genotoxic and cytotoxic effects of Haas appliance in exfoliated buccal mucosa cells during orthodontic treatment. *Angle. orthod.*, **88**(5), 590–595. doi: 10.2319/101117-687.1

DesMarais, T. L., Costa, M. (2019) Mechanisms of Chromium-Induced Toxicity. *Curr. Opin. Toxicol.*, **14**, 1-7. doi: 10.1016/j.cotox.2019.05.003

Downarowicz, P., Mikulewicz, M. (2017) Trace metal ions release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells by in vivo studies: A literature review. *Adv. clin. exp. med.*, **26**(7), 1155–1162. doi: 10.17219/acem/65726

Durgo, K. (2020) Kemijski spojevi u okolišu (Nastavni materijali za predmet Ekogenetičke studije, studij Molekularna biotehnologija), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Francisco, L.F.V., Baldivia, D.d.S., Crispim, B.d.A., Klafke, S.M.F.F., Castilho, P.F.d., Viana, L.F., Santos, E.L.d., Oliveira, K.M.P.d., Barufatti, A. (2021) Acute Toxic and Genotoxic Effects of Aluminum and Manganese Using In Vitro Models. *Toxics*, **9**, 153. doi: 10.3390/toxics9070153

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. doi: 10.3390/ijerph17030679

Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., Catalano, A. (2020) The Effects of Cadmium Toxicity. *Int. j. env. res. pub. he.*, **17**(11), 3782. doi: 10.3390/ijerph17113782

Godwill, E.A., Ferdinand, P.U., Nwalo N. F., Unachukwu, M. (2019) Mechanism and Health Effects of Heavy Metal Toxicity in Humans. U: Poisoning in the Modern World-New Tricks for an Old Dog (Karcioglu, U. i Arslan, B., ured.), Intechopen, London, str. 1-23.

Gonçalves, T. S., Menezes, L. M., Trindade, C., Machado, M., Thomas, P., Fenech, M., Henriques, J. A. (2014) Cytotoxicity and genotoxicity of orthodontic bands with or without silver soldered joints. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.*, **762**, 1-8. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.01.011

Hafez, H. S., Selim, E. M., Kamel Eid, F. H., Tawfik, W. A., Al-Ashkar, E. A., Mostafa, Y. A. (2011) Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: a longitudinal in-vivo study. *Am. j. orthod. dentofac.*, **140**(3), 298–308. doi: 10.1016/j.ajodo.2010.05.025

Hanawa T. (2012) Research and development of metals for medical devices based on clinical needs. *Sci. technol. adv. mat.*, **13**(6), 064102. doi: 10.1088/1468-6996/13/6/064102

Heravi, F., Ramezani, M., Poosti, M., Hosseini, M., Shajiei, A., Ahrari, F. (2013) In Vitro Cytotoxicity Assessment of an Orthodontic Composite Containing Titanium-dioxide Nanoparticles. *J. Dent. Res.*, **7**(4), 192–198. doi: 10.5681/joddd.2013.031

Holleman, A. F., Wiberg, E. (2001) *Inorganic Chemistry*, Academic Press, San Diego.

ICAWG – International Comet Assay Work Group., <<https://www.icawg.com/comet-assay>>. Pristupljeno 2. srpnja 2021.

International Union of Pure and Applied Chemistry (2005) *Nomenclature of Inorganic Chemistry (IUPAC Recommendations 2005)*, Cambridge (UK).

Jeevan Dental Clinic (2019), <<http://www.jeevandental.com/latest-update/different-types-of-b/18>>. Pristupljeno 31. ožujka 2021.

Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., et al. (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 1–6. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030

Karlina, I., Amtha, R., Oetomo Roeslan B., Zen, Y. (2016) The Release of Total Metal Ion and Genotoxicity of Stainless Steel Brackets: Experimental Study Using Micronucleus Assay. *Indones. Biomed. J.*, **8**(2), 97-102. doi: 10.18585/inabj.v8i2.193

Kawanishi, S., Inoue, S., Yamamoto, K. (1994). Active oxygen species in DNA damage induced by carcinogenic metal compounds. *Environ.health perspect.*, **102**(3), 17–20. doi: 10.1289/ehp.94102s317

Kishore, S., A., S. F., Siva, S. (2021) Evaluation of Nickel Release in Blood and Periodontal Tissue with the Use of NiTi Wires, Bands and Brackets in Orthodontics - A Systematic Review. *J. Evol. Med. Dent. Sci.*, **10**(20), 1539-1546. doi: 10.14260/jemds/2021/321

Kovač, V., Poljšak, B., Primožič, J., Jamnik, P. (2020) Are Metal Ions That Make up Orthodontic Alloys Cytotoxic, and Do They Induce Oxidative Stress in a Yeast Cell Model?. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(21), 7993. doi: 10.3390/ijms21217993

Leyssens, L., Vinck, B., Van Der Straeten, C., Wuyts, F., Maes, L. (2017) Cobalt toxicity in humans-A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology*, **387**, 43–56. doi: 10.1016/j.tox.2017.05.015

Li, W., Zhou, J., Xu, Y. (2015) Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices. *Biomed. rep.*, **3**(5), 617–620. doi: 10.3892/br.2015.481

Loyola-Rodríguez, J. P., Lastra-Corso, I., García-Cortés, J. O., Loyola-Leyva, A., Domínguez-Pérez, R. A., Avila-Arizmendi, D., Contreras-Palma, G., González-Calixto, C. (2020) *In Vitro* Determination of Genotoxicity Induced by Brackets Alloys in Cultures of Human Gingival Fibroblasts. *J. toxicol.*, **2020**, 1467456. doi: 10.1155/2020/1467456

Martín-Cameán, A., Jos, A., Cameán, A. M., Solano, E., Iglesias-Linares, A. (2015b) Genotoxic and cytotoxic effects and gene expression changes induced by fixed orthodontic appliances in oral mucosa cells of patients: a systematic review. *Toxicol. mech. method.*, **25**(6), 440–447. doi: 10.3109/15376516.2015.1062951

Martín-Cameán, A., Jos, Á., Mellado-García, P., Iglesias-Linares, A., Solano, E., Cameán, A.M. (2015a) In vitro and in vivo evidence of the cytotoxic and genotoxic effects of metal ions released by orthodontic appliances: A review. *Environ. Toxicol. Phar.*, **40**(1), 86-113. doi: 10.1016/j.etap.2015.05.007

Mikulewicz, M., Chojnacka, K., Kochanowska, I., Dziewicka, A., Janeczek, M., Cieplik, J., Chrószcz, A. (2013) Cytotoxicity of nickel ions for human osteoblasts in the context of orthodontic treatment in humans and animals. *Turki. J. Vet. Anim. Sci.*, **47**(2), 164–169. doi: 10.3906/vet-1112-34

Møller, P., Azqueta, A., Boutet-Robinet, E., Koppen, G., Bonassi, S., Milić, M., Gajski, G., Costa, S., Teixeira, J. P., Costa Pereira, C., Dusinska, M., Godschalk, R., Brunborg, G., Gutzkow, K. B., Giovannelli, L., Cooke, M. S., Richling, E., Laffon, B., Valdiglesias, V., Basaran, N., ... Langie, S. (2020) Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nat. protoc.*, **15**(12), 3817–3826. doi: 10.1038/s41596-020-0398-1

Mortimer, C. E. (1975) *Chemistry: A Conceptual Approach*, 3. izd., Van Nostrand Company, New York.

Olive, P., Banáth, J. (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.*, **1**, 23–29. doi: 10.1038/nprot.2006.5

Ortiz, A. J., Fernández, E., Vicente, A., Calvo, J. L., Ortiz, C. (2011). Metallic ions released from stainless steel, nickel-free, and titanium orthodontic alloys: toxicity and DNA damage. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, **140**(3), 115–122. doi: 10.1016/j.ajodo.2011.02.021

Paustenbach, D. J., Tvermoes, B. E., Unice, K. M., Finley, B. L., Kerger, B. D. (2013) A review of the health hazards posed by cobalt. *Crit. Rev. Toxicol.*, **43**(4), 316–362. doi: 10.3109/10408444.2013.779633

Poliklinika Orthonova, <<http://poliklinika-orthonova.com/en/orthodontic-appliances/>>. Pristupljeno 31. ožujka 2021.

Primožič, J., Poljšak, B., Jamnik, P., Kovač, V., Canadi Jurešić, G., Spalj, S. (2021) Risk Assessment of Oxidative Stress Induced by Metal Ions Released from Fixed Orthodontic Appliances during Treatment and Indications for Supportive Antioxidant Therapy: A Narrative Review. *Antioxidants*, **10**, 1359. doi: 10.3390/antiox10091359

Proffit, W. R., Fields, H. M., Sarver, D. M. (2009) Ortodoncija, 4. izd. (preveli Laptor Varga, M. i sur.), Naklada Slap, Zagreb.

Rafati Rahimzadeh, M., Rafati Rahimzadeh, M., Kazemi, S., Moghadamnia, A. A. (2017) Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian j. intern. med.*, **8**(3), 135–145. doi: 10.22088/cjim.8.3.135

Reid, T. M., Feig, D. I., Loeb, L. A. (1994). Mutagenesis by metal-induced oxygen radicals. *Environ. health perspect.*, **102**(3)57–61. doi: 10.1289/ehp.94102s357

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J. L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. protoc.*, **3**(7), 1125–1131. doi: 10.1038/nprot.2008.75

Russell, A. M., Lee, K. L. (2005) Structure–Property Relations in Nonferrous Metals, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.

Spalj, S., Mlacovic Zrinski, M., Tudor Spalj, V., Ivankovic Buljan, Z. (2012) In-vitro assessment of oxidative stress generated by orthodontic archwires. *Am. j. orthod. dentofac.*, **141**(5), 583–589. doi: 10.1016/j.ajodo.2011.11.020

Sun, H., Brocato, J., Costa, M. (2015) Oral Chromium Exposure and Toxicity. *Curr. environ. health rep.*, **2**(3), 295–303. doi: 10.1007/s40572-015-0054-z

Tomakidi, P., Koke, U., Kern, R., Erdinger, L., Krüger, H., Kohl, A., Komposch, G. (2000) Assessment of acute cyto- and genotoxicity of corrosion eluates obtained from orthodontic

materials using monolayer cultures of immortalized human gingival keratinocytes. *J. orofac. orthop.*, **61**(1), 2–19. doi: 10.1007/BF02340928

Toyokuni, S., Sagripanti, J. L. (1992). Iron-mediated DNA damage: sensitive detection of DNA strand breakage catalyzed by iron. *J. inorg. biochem.*, **47**(3-4), 241–248. doi: 10.1016/0162-0134(92)84069-y

Vandjelovic, N., Zhu, H., Misra, H.P., Zimmerman, R.P., Jia, Z. , Li, Y. (2012) EPR studies on hydroxyl radical-scavenging activities of pravastatin and fluvastatin. *Mol. Cell. Biochem.*, **364**(1-2), 71-77. doi: 10.1007/s11010-011-1206-6

Wang, X., Roper, M. G. (2014) Measurement of DCF fluorescence as a measure of reactive oxygen species in murine islets of Langerhans. *Anal. Methods*, **6**(9), 3019–3024. doi:10.1039/c4ay00288a

Westphalen, G. H., Menezes, L. M., Prá, D., Garcia, G. G., Schmitt, V. M., Henriques, J. A., Medina-Silva, R. (2008) In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. *Genet. mol. res.*, **7**(4), 1259–1266. doi: 10.4238/vol7-4gmr508

Zieniewska, I., Maciejczyk, M., Zalewska, A. (2020) The Effect of Selected Dental Materials Used in Conservative Dentistry, Endodontics, Surgery, and Orthodontics as Well as during the Periodontal Treatment on the Redox Balance in the Oral Cavity. *Int. j. mol. sci.*, **21**(24), 9684. doi: 10.3390/ijms21249684

7. PRILOZI

7.1. Prilog 1. - Kemijska analiza otopina umjetne sline u kojima su određeno vrijeme stajali dijelovi fiksnih ortodontskih naprava, koncentracije metala izražene u $\mu\text{g L}^{-1}$.

Kako bi se znalo koji su dijelovi stajali u slini i koliko dugo, uzorci su označeni, no za lakše označavanje korišteni su brojevi. Oznake su: 1 – lukovi 3 dana; 2 – lukovi 7 dana; 3 – lukovi 14 dana; 4 – bravice 3 dana; 5 – bravice 7 dana; 6 – bravice 14 dana; 7 – ligature 3 dana; 8 – ligature 7 dana; 9 – ligature 14 dana; 10 – prstenovi 3 dana; 11 – prstenovi 7 dana; 12 – prstenovi 14 dana; 13 – sve 3 dana; 14 – sve 7 dana; 15 – sve 14 dana.

Uzorak:	slina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Metal:																
Li	0,56	0,63	0,37	0,70	0,63	0,64	0,59	0,60	0,20	0,85	0,90	0,62	1,14	0,76	1,19	0,53
Be	<0.002	0,13	0,10	0,06	0,13	0,12	0,08	0,14	0,11	0,10	0,06	0,05	0,04	0,13	0,12	0,12
Rb	28,0	29,0	69,6	66,8	28,8	31,3	67,5	29,0	68,8	72,9	29,9	70,0	66,6	29,8	30,9	71,4
Mo	0,72	1,17	7,90	1,04	7,39	8,12	6,87	3,17	3,10	3,03	8,46	10,7	11,8	10,4	9,88	9,24
Cd	0,61	0,67	0,75	0,70	0,69	0,73	0,70	0,66	0,72	0,75	0,72	0,77	0,71	0,71	0,75	0,76
Sn	0,098	0,056	0,102	0,086	<0.002	0,011	0,005	0,045	0,035	0,022	<0.002	0,058	0,023	<0.002	<0.002	<0.002
Cs	0,005	0,005	0,013	0,012	0,011	0,016	0,009	0,005	0,010	0,017	0,013	0,016	0,017	0,007	0,007	0,016
Tl	0,04	0,04	0,59	0,56	0,04	0,05	0,56	0,04	0,57	0,61	0,04	0,57	0,53	0,04	0,05	0,59
Pb	2,98	0,89	2,19	6,75	0,14	4,53	2,40	0,86	4,77	4,92	0,27	679	2,58	0,15	18,4	1,69
Bi	0,011	0,002	0,008	0,035	0,001	0,010	0,009	0,001	0,007	0,023	0,003	0,025	0,004	0,014	0,007	0,008
U	0,079	0,059	0,057	0,051	0,039	0,045	0,031	0,065	0,052	0,039	0,006	0,019	0,012	0,021	0,023	0,017
Al	4,16	8,23	23,1	215	4,98	24,3	15,1	7,09	27,7	27,5	3,43	24,4	11,1	36,7	11,8	18,3
Ca	257	216	317	531	208	252	574	260	296	347	484	573	359	222	357	332
Ti	0,82	32,0	21,3	7,02	0,74	0,93	0,76	1,05	1,02	25,4	0,34	0,65	0,34	23,7	22,8	10,4
V	0,15	0,16	0,18	0,19	0,46	0,48	0,43	0,31	0,32	0,32	1,09	1,61	1,68	0,64	0,62	0,58
Cr	0,09	7,88	0,81	4,84	10,3	9,90	9,21	5,15	5,36	4,29	569	723	411	18,4	15,5	8,22
Mn	1,34	1,46	7,22	7,01	27,9	27,2	31,6	22,5	29,1	31,4	100	157	177	50,4	47,5	58,2
Fe	3,72	5,74	10,4	11,3	232	272	147	138	122	128	929	2387	1143	276	246	146
Co	0,03	0,03	0,56	0,06	2,33	2,44	2,23	0,60	0,56	0,61	19,78	29,0	29,7	3,11	2,89	3,03
Ni	1,02	199	271	38,6	70,3	71,3	64,3	15,8	14,2	15,3	864	1295	1457	507	440	138
Cu	1,28	1,25	0,61	1,39	11,4	11,5	12,2	2,75	5,19	4,02	29,6	25,8	27,3	12,8	13,8	14,1
Zn	14,4	7,33	26,3	42,9	19,9	15,0	38,7	8,34	26,5	36,8	21,3	40,7	44,3	8,54	31,0	28,6
Sr	4,84	5,30	5,82	6,38	5,27	5,50	6,07	5,11	5,65	6,60	5,79	6,56	5,50	5,32	5,79	6,16
Sb	0,08	0,12	0,65	0,81	0,15	0,60	0,72	0,13	0,83	0,66	0,48	0,37	0,61	0,17	0,84	0,63
Ba	0,95	1,18	5,04	7,75	1,23	2,09	4,45	1,12	4,47	15,7	0,53	4,56	1,63	0,99	3,97	3,52
As	0,08	0,06	0,10	0,09	0,07	0,10	0,09	0,06	0,03	0,10	0,26	0,35	0,40	0,12	0,11	0,09
Se	0,10	<0.002	<0.002	0,31	0,08	0,18	0,03	0,04	0,48	0,18	<0.002	<0.002	0,07	0,07	0,05	0,09

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Suzana Oresić

ime i prezime studenta