

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Zana Jusufi Osmani

**MEHANIZMI ODGOVORA STANICE NA STRES, PROMJENA
MEHANIČKIH I POVRŠINSKIH SVOJSTAVA DENTALNIH
SLITINA IZAZVANIH KOROZIJOM**

Doktorski rad

Rijeka, 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Zana Jusufi Osmani

**MEHANIZMI ODGOVORA STANICE NA STRES, PROMJENA
MEHANIČKIH I POVRŠINSKIH SVOJSTAVA DENTALNIH
SLITINA IZAZVANIH KOROZIJOM**

Doktorski rad

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

Komentorica: doc. dr. sc. Višnja Katić, dr. med. dent.

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Zana Jusufi Osmani

**MECHANISMS OF CELL RESPONSE TO STRESS AND
CHANGES IN MECHANICAL AND SURFACE PROPERTIES
OF DENTAL ALLOYS CAUSED BY CORROSION**

Doctoral thesis

Rijeka, 2025.

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

Komentorica: doc. dr. sc. Višnja Katić, dr. med. dent.

Doktorski rad obranjen je dana_____u/na_____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

Rad ima 128 listova.

UDK:_____

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Analizirati i usporediti otpuštanje iona iz standardnih dentalnih slitina i njihovih hipoalergenih ekvivalenata, te utjecaj nastalih oštećenja (korozijske) na mehanička svojstva i parametre površinske hrapavosti. Analizirati biološki učinak otpuštenih metalnih iona na kvasac kao modelni organizam.

Materijali i metode: U ovom su istraživanju ispitane inačice po dvije usporedne slitine koje se koriste jednakovrijedno: 1.) nepresvučena nikal-titanij (NiTi) i NiTi s prevlakom (NiTi-p); 2.) plemeniti čelik (engl. *stainless steel*, SS) i plemeniti čelik bez nikla; 3.) slitina titanij-molibden (engl. *titanium-molybdenum alloy*, TMA) i slitina kobalt-krom (CoCr). Umjetna je slina pripremljena s dvije pH-vrijednosti, pH 6,6 i pH 5,5, a sva su mjerenja provedena na 5 uzoraka. U medij otpušteni metalni ioni prikupljani su nakon 3, 7, 14 i 28 dana. Mehanička testiranja eksperimentalnih žica nakon perioda eluiranja od 28 dana provedena su nanoindenterom, dok je površina žica analizirana mikroskopom atomskih sila i skenirajućim pretražnim mikroskopom uz energijski disperzivni detektor rendgenskih zraka. Biološki je učinak praćen na kvascu *Saccharomyces cerevisiae* kao modelnom organizmu pomoću promjene vitalnosti kvasca i aktivacije enzima stresnog odgovora (katalaze, superoksid dismutaze 1 i 2 i glutation sintetaze). Analiza podataka provedena je pomoću analize varijance. Rezultati s $p < 0,05$ smatrani su značajnim.

Rezultati: NiTi je oslobodio više Ti i Ni iona u usporedbi s NiTi-p; SS je otpuštao više željeza, kroma i nikla u usporedbi s plemenitim čelikom bez nikla. CoCr oslobađa kobalt u visokoj koncentraciji i niske količine Cr, Ni i molibdena (Mo) u usporedbi s Mo i Ti iz TMA. Otpuštanje metala iz dentalnih ortodontskih slitina *in vitro* bilo je ukupno niže pri pH 6,6 i za hipoalergene ekvivalente u usporedbi sa standardnim dentalnim slitinama. Kombinacija morfoloških i kemijskih analiza (SEM/EDX, ICP) s biološkim testovima (ekspresija antioksidativnih enzima) jasno potvrđuje da oslobađanje iona i korozijska imaju izravnu vezu s oksidativnim odgovorom stanica.

Zaključak: Iako se neki parametri površinske hrapavosti i mehanička svojstva ne mijenjaju značajno djelovanjem pH i ne utječu na klinički rad, eluirani metalni ioni pobuđuju stresni odgovor te je pri odabiru dentalnog materijala važno uz nominalni sastav legure obratiti pozornost i na potencijalno korozivna ponašanja u realnim oralnim uvjetima, gdje pH može značajno varirati. Oslobađanje metala iz dentalnih ortodontskih slitina *in vitro* ukupno je niže za hipoalergene ekvivalente u usporedbi sa standardnim dentalnim slitinama.

Ključne riječi: dentalne slitine; korozijska; ortodoncija; *Saccharomyces cerevisiae*; oksidativni stres; površinska svojstva.

SUMMARY

Research objective: To analyze and compare the release of ions from standard dental alloys and their hypoallergenic equivalents, and the influence of the resulting damage (corrosion) on mechanical properties and surface roughness parameters. To analyze the biological effect of released metal ions on yeast as a model organism.

Materials and methods: In this study, variants of two comparative alloys were tested that were used equally: 1.) uncoated nickel-titanium (NiTi) and coated NiTi (NiTi-p); 2.) stainless steel (SS) and nickel-free stainless steel; 3.) titanium-molybdenum alloy (TMA) and cobalt-chromium alloy (CoCr). Artificial saliva was prepared with two pH values, pH 6.6 and pH 5.5, and all measurements were performed on 5 samples. Metal ions released into the medium were collected after 3, 7, 14 and 28 days. Mechanical testing of the experimental wires after an elution period of 28 days was performed with a nanoindenter. The surface of the wires was analyzed with an atomic force microscope, and using a scanning microscope with an energy dispersive X-ray detector. The biological effect was monitored on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism by means of changes in the vitality of the yeast and the activation of stress response enzymes (catalase, superoxide dismutase 1 and 2 and glutathione synthetase). Data analysis was performed using analysis of variance. Results with $p < 0.05$ were considered significant.

Results: NiTi released more Ti and Ni ions compared to NiTi-p; SS released more iron, chromium and nickel compared to stainless steel without Ni. CoCr releases cobalt in high concentration and low amounts of Cr, Ni and molybdenum (Mo) compared to Mo and Ti from TMA. In vitro metal release from dental orthodontic alloys was overall lower at pH 6.6 and for hypoallergenic equivalents compared to standard dental alloys. Surface roughness parameters and mechanical properties of the alloys studied remain unchanged under the influence of changes in artificial saliva pH. The combination of morphological and chemical analyses (SEM/EDX, ICP) with biological tests (expression of antioxidant enzymes) clearly confirms that ion release and corrosion have a direct relationship with the oxidative response of cells.

Conclusion: Although some surface roughness parameters and mechanical properties do not change significantly with pH and do not affect clinical performance, eluted metal ions induce a stress response, and when selecting a dental material, it is important to pay attention to the nominal alloy composition and potential corrosive behavior in real oral conditions, where pH can vary significantly. In vitro metal release from dental orthodontic alloys is overall lower for hypoallergenic equivalents compared to standard dental alloys.

Keywords: corrosion; dental alloys; orthodontics; *Saccharomyces cerevisiae*; oxidative stress; surface properties.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Dentalni materijali	1
1.2. Korozija	8
1.3. Oksidativni stres	9
1.4. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
2. SVRHA ISTRAŽIVANJA.....	16
3. MATERIJALI I POSTUPCI	17
3.1. Materijali	17
3.1.1. Ortodontske žice	17
3.1.2. Mediji za eluiranje i priprema eluata	17
3.2. Metode	18
3.2.1. Biološki učinak	18
3.2.1.1. Uzgoj kvasca	18
3.2.1.2. Praćenje vitalnosti kvasca	18
3.2.1.3. Ekspresija gena oksidativnog stresa	19
3.2.2. Mjerenja induktivno spregnutom plazmom (engl. <i>inductively coupled plasma</i> , ICP)	22
3.2.3. Mjerenje mehaničkih svojstava nanoindenterom	23
3.2.4. Analiza površine mikroskopom atomskih sila (engl. <i>atomic force microscopy</i> , AFM)	23
3.2.5. Analiza površine skenirajućim elektronskim mikroskopom / energijskom disperzivnom spektroskopijom (engl. <i>scanning electron microscopy</i>	

<i>with energy dispersive spectroscopy, SEM/EDX)</i>	24
3.3. Statistička obrada podataka	24
4. REZULTATI	26
4.1. Biološki učinak	26
4.1.1. Vijabilnost kvasca	26
4.1.2. Rezultati ekspresije gena stresnog odgovora kvasca	28
4.2. Mjerenja induktivno spregnutom plazmom (ICP)	37
4.2.1. Mjerenja induktivno spregnutom plazmom (ICP) u umjetnoj slini	37
4.2.2. Mjerenja induktivno spregnutom plazmom (ICP) na kvaščevoj podlozi	53
4.3. Promjene mehaničkih svojstava	56
4.4. Analiza površine mikroskopom atomskih sila (AFM)	58
4.5. Analiza površine skenirajućim elektronskim mikroskopom / energijskom disperzivnom spektroskopijom (SEM/EDX).....	66
5. RASPRAVA	77
5.1. Biološki učinak	77
5.1.1. Vijabilnost kvasca	77
5.1.2. Analiza ekspresije gena stresnog odgovora kvasca	77
5.2. Analiza rezultata mjerenja induktivno spregnutom plazmom (ICP).....	79
5.2.1. Analiza rezultata mjerenja induktivno spregnutom plazmom (ICP) u umjetnoj slini	79

5.2.2. Analiza rezultata mjerenja induktivno spregnutom plazmom (ICP) na kvaščevoj podlozi	83
5.3. Promjene mehaničkih svojstava	84
5.4. Analiza površine mikroskopom atomskih sila (AFM)	84
5.5. Analiza površine skenirajućim elektronskim mikroskopom / energijskom disperzivnom spektroskopijom (SEM/EDX)	85
6. ZAKLJUČAK	88
7. LITERATURA	89
Popis slika	104
Popis tablica	109
Popis pokrata	110
Životopis	116

1. UVOD

1.1. Dentalni materijali

Normalne su funkcije stomatognatog sustava bitne za zdravlje i psihosocijalno blagostanje svakog čovjeka, a danas se postavljaju sve veći zahtjevi za estetskim i financijski dostupnim stomatološkim zahvatima u cilju postizanja zdravlja [1]. Brojni i različiti umjetni materijali koriste se za obnavljanje izgubljenih, oštećenih ili deformiranih oralnih struktura pod zajedničkim nazivom dentalni materijali [2, 3]. Pri odabiru materijala za primjenu u dentalnoj medicini neophodno je znati da izbor materijala ovisi o brojnim čimbenicima poput korozijskog ponašanja, mehaničkih svojstava uključujući čvrstoću i mogućnost izrade, cijenu i dostupnost, estetske vrijednosti, kao i jedan od najznačajnijih čimbenika, biokompatibilnost. Korozijsko ponašanje metalnih materijala obično je najvažnije svojstvo zbog biokompatibilnosti i citotoksičnosti produkata procesa korozije. S druge strane, iz estetskih je razloga veoma važan faktor i izgled koji treba uzeti u obzir pri odabiru dentalnog materijala. Iako neki od dentalnih materijala imaju dovoljnu otpornost na koroziju, mehanička svojstva su jednako važna pri odabiru istih. Dulje od jednog stoljeća se metali i njihove slitine koriste u stomatološkoj praksi. Općenito, većina metala je dovoljno jaka da izdrži najveće moguće oralne sile, unatoč činjenici da su pokazali iritabilnost ili citotoksičnost kao i korodiranje u oralnoj sredini [4].

Nekad je zlato bilo glavni dentalni materijal zbog prikladne čvrstoće i visoke otpornosti na koroziju, ali je zbog skupoće istisnuto iz upotrebe [2]. Zlatne slitine su veoma cijenjene zbog svoje biokompatibilnosti, što ih čini prikladnim za pacijente koji su osjetljivi na druge metale i zbog toga se i danas koriste pri izradi vrhunskih zubnih nadoknada kao što su krunice i mostovi [5].

Iako nijedan drugi metal ne može izdržati promjenjive oralne uvjete poput zlata, alternativne slitine dostupne na tržištu također posjeduju svojstva koja zadovoljavaju zahtjeve za njihovo korištenje u dentalnoj praksi [4]. Zlatne se prevlake koriste za poboljšanje izgleda mnogih komercijalnih proizvoda, međutim ovaj je plemeniti metal mekan, a kada nastaju mehaničke promjene na površini tada osnovni metal bude izložen i korodira za kratko vrijeme [4]. Danas su najčešće korišteni dentalni materijali metalne slitine kroma (Cr), nikla (Ni), titanija (Ti), željeza (Fe), molibdena (Mo) i kobalta (Co) zbog njihove visoke čvrstoće i dobre otpornosti na koroziju [2, 6]. Slitine kobalta i kroma poznate su po svojoj visokoj čvrstoći i otpornosti na

koroziju, što ih čini idealnima za upotrebu u dentalnoj medicini, posebno kod krunica kao i ortodontskih naprava, te se u tu svrhu i koriste. Osim toga, ove su slitine prikladne za pacijente s alergijama ili osjetljivošću na metale jer su biokompatibilne [7]. Međutim, otkriveno je da slitine kobalta i kroma otpuštaju metalne ione, koji potencijalno mogu povećati oksidativni stres kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* [8]. Slitine nikal-kroma često se koriste u djelomičnim protezama zbog svoje fleksibilnosti i trajnosti, kao i kod ortodontskih naprava. Ove slitine mogu izdržati opterećenja svakodnevne uporabe i otporne su na koroziju, što ih čini prihvatljivim izborom za dentalni materijal [9]. Također je otkriveno da se i kod slitina nikla i kroma, koje se obično koriste u ortodontskim napravama, otpuštaju metalni ioni koji mogu pridonijeti oksidativnom stresu kod *Saccharomyces cerevisiae* [10].

Daljnja istraživanja mehanizama kojima ovi metalni ioni induciraju oksidativni stres kod *Saccharomyces cerevisiae* ključna su za razumijevanje implikacija ortodontskih materijala na zdravlje i funkciju stanica [11]. Osim toga, istraživanje potencijalnih strategija za ublažavanje otpuštanja metalnih iona iz ortodontskih naprava i njihovog utjecaja na oksidativni stres u biološkim sustavima mogli bi imati značajne implikacije za poboljšanje biokompatibilnosti dentalnih materijala i poboljšanje ukupnog zdravlja pacijenata [12]. Kako bi se izbjegle potencijalne komplikacije i osigurao uspjeh u ortodontskoj terapiji ili pri izradi protetskih nadoknada, od ključne je važnosti da kliničari pažljivo razmotre svojstva i karakteristike različitih dentalnih slitina [2].

Slitine nehrđajućeg čelika su također dentalni materijali koji se koriste u ortodonciji i koji posjeduju izvanredna mehanička svojstva koja ih čine veoma prikladnima za tretmane ortodontske terapije. Ove slitine imaju čvrstoću i izvrsnu izdržljivost, što im omogućuje izdržati sile i pritiske tijekom ortodontskih tretmana. Mehanička svojstva ovih slitina osiguravaju da ortodontske naprave zadrže svoj oblik i strukturni integritet i na taj način učinkovito i pouzdano završe ortodontsku terapiju [13]. Osim dobrih mehaničkih svojstava, slitine nehrđajućeg čelika su biokompatibilne, što znači da ih ljudsko tijelo dobro podnosi. Ova biokompatibilnost je ključna u ortodonciji jer osigurava da korišteni materijali ne uzrokuju nuspojave ili štete okolnim oralnim tkivima. Biokompatibilna priroda ovih slitina doprinosi sveukupnoj sigurnosti i udobnosti ortodontskog liječenja za pacijente, pružajući na taj način bolje rezultate liječenja i samim tim zadovoljstvo pacijenata. Ove karakteristike, koje posjeduju slitine nehrđajućeg čelika, čine ih dentalnim materijalima izbora u ortodonciji, igrajući temeljnu ulogu u uspjehu ortodontskih tretmana i sveukupnoj dobrobiti pacijenata [14]. Kada je riječ o otpornosti na koroziju koju nude slitine nehrđajućeg čelika, ključnu ulogu imaju ortodontske naprave koje

posjeduju prevlaku zlata i rodija [15]. Ova otpornost osigurava da ortodonske naprave ostanu intaktne i zadrže svoju estetsku privlačnost tijekom ortodonske terapije. Prevlaka također igra značajnu ulogu u sprječavanju alergijskih reakcija kod pacijenata koji mogu biti osjetljivi na osnovu slitine nehrđajućeg čelika, čineći proces liječenja lakšim i ugodnijim po njih [16].

Godinama su slitine nikla i titanija istaknuti materijal u dentalnoj medicini zbog svojih jedinstvenih svojstava i svestrane primjene. Ove slitine posjeduju izvrsna mehanička svojstva, kao elastičnost, što im omogućuje izdržljivost pri značajnim deformacijama bez trajnog oštećenja [17]. Također, ove metalne slitine imaju visoku otpornost na koroziju, biokompatibilnost i nisku osjetljivost na oralno okruženje, što ih čini prikladnima za razne dentalne naprave kao što su ortodonske žice, endodontski instrumenti i implantati. Posljednjih godina provedena su opsežna istraživanja s ciljem poboljšanja učinkovitosti i karakteristika slitina nikla i titanija u dentalnoj medicini [18, 19]. Dok slitine nikla i titanija imaju odgovarajuća svojstva za primjenu u dentalnoj medicini, važan čimbenik pri odabiru ovog materijala je potencijalni problem alergije na nikal kod nekih pacijenata. Alergija na nikal uobičajena je reakcija preosjetljivosti, a neki pojedinci mogu pokazati nepovoljan imunološki odgovor kada su izloženi materijalima koji sadrže nikal, uključujući slitine nikal-titanija koje se koriste u dentalnoj medicini [20]. Kod pacijenta s potvrđenom alergijom na nikal treba razmotriti korištenje alternativnih materijala kako bi spriječili bilo kakve moguće nuspojave. Napredak tehnologije pri površinskim modifikacijama slitina nikla i titanija presvučenih zaštitnom prevlakom može znatno pomoći u smanjenju otpuštanja iona nikla, i na taj način dodatno smanjiti rizik od alergijskih reakcija kod osjetljivih osoba [21]. Istraživanja u području dentalnih materijala imaju za cilj razviti nikal-titanij slitine s još većom biokompatibilnošću i smanjenom razinom otpuštanja iona nikla, čime se rješavaju problemi vezani uz alergijske reakcije na nikal uz istovremeno zadržavanje korisnih svojstava ovih slitina, kao i razvoj alternativnih materijala ili modificiranje postojećih slitina nikal-titanija kako bi se smanjio rizik i pružila sigurnija opcija za pacijente [20].

Slično slitinama nikla i titanija, slitine titanija i molibdena dobile su na značaju i pozornosti u području dentalne medicine zbog svojih izvanrednih svojstava i raznolike primjene. Ove slitine nude visoku čvrstoću, izvrsnu otpornost na koroziju i biokompatibilnost, što ih čini prikladnima pri izradi zubnih implantata, protetskih nadoknada kao i ortodontskih naprava [19]. Razvojem slitina titanij-molibdena, dentalnoj medicini kao i stručnjacima dentalne prakse ponuđeni su alternativni dentalni materijali koji mogu riješiti probleme povezane s alergijom ili osjetljivosti na nikal. S obzirom na prevalenciju alergije na nikal kod nekih pacijenata, uporaba slitina

titanij-molibdena omogućuje uporabu dentalnih materijala sa smanjenim rizikom od alergijskih reakcija. Osim toga, istraživanja u tijeku imaju za cilj dodatno poboljšati biokompatibilnost slitina titanija i molibdena, osiguravajući njihovu prikladnost za široku primjenu kod pacijenata, uključujući i one s osjetljivošću na druge metale [22]. Sa stalnim napretkom u metalurgiji i znanosti o dentalnim materijalima, očekivano je da će slitine titanij-molibdena igrati sve značajniju ulogu u modernoj dentalnoj medicini, nudeći sigurne i pouzdane alternative za pacijente kojima je potrebna dentalna terapija i uporaba ovih dentalnih materijala [23]. Kako istraživanje i razvoj napreduju, slitine titanij-molibdena pridonose napretku dentalnih materijala kao i tehnici njihove izrade [24].

Oralne strukture neprestano su izložene promjenjivom fizičkom i kemijskom okruženju koje uključuje promjene temperature, pH sline, unos hrane i pića i dentalni plak, i pod ovim se okolnostima očekuje korozija metala i njihovih slitina [4]. Laing i sur. [25] primijetili su da je reakcija tkiva proporcionalna količini sastavnih elemenata koji se oslobađaju pri korodiranju metala ili njihove slitine. Velik broj teških metala, poput nikla, kroma i berilija, klasificirano je kancerogenim, opasnim i toksičnim zagađivačima [25]. NiTi slitine su najčešće upotrebljavane slitine, posebno za žice u ortodonciji koje proizvode lagane dugotrajne kontinuirane sile pogodne za pomicanja zuba u početnoj fazi terapije, takozvanoj nivelizacijskoj fazi zbog izbjegavanja neželjene posljedice ortodontskih sila [26]. Dizajn fiksnih ortodontskih naprava može biti složen, omogućujući stvaranje i nakupljanje plaka [28], što rezultira povećanjem učestalosti i ozbiljnosti lezija bijele mrlje povezane s ortodontskim liječenjem [29]. Tipična mjesta zadržavanja plaka su oko žica u obliku luka, bravica (sa žicama u obliku luka uključenim u utore bravice, povezujući sve bravice i cjevčice) i gingive. Vrijednost pH plaka ostaje niska (4,8 ili niža) sve dok je biofilm neporemećen. Protokol i pH sline variraju tijekom dana, a kod bolesnika s povećanim brojem bakterija *S. mutans* češće se javljaju razdoblja sniženog pH sline zbog bakterijske proizvodnje kiseline [30]. Nadalje, u takvih bolesnika razdoblja sniženog pH su duža, odnosno između obroka i tijekom sna [31]. Stoga pH sline najčešće varira u rasponu od niske razine pH zubnog plaka do gotovo neutralnog pH. Površinski oksidni premaz na NiTi žicama uglavnom se sastoji od titanij-dioksida (TiO_2) koji je stabilan u slini (blizu) neutralnog pH, sprječavajući otpuštanje alergena nikla u usnu šupljinu. U sniženom pH sline, TiO_2 pokazuje znakove otapanja; ipak, otpuštanje nikla ostaje ispod praga alergenosti [32]. Premazi od titanijevog nitrida (TiN) na NiTi žicama uvedeni su kako bi se povećala antikorozivna svojstva uobičajenih nepresvučenih NiTi žica [33]. Poboljšanje otpornosti na koroziju primijećeno je u kratkotrajnim testovima uranjanja, ali u produljenom i ponovljenom kontaktu

s fluoriranim sredstvima TiN premaz se otapa i pretvara u TiO₂, također pokazujući korozivno ponašanje [33–35]. U novije vrijeme uveden je bjelkasti premaz od rodija (mješavina plemenitih metala rodija i zlata) na NiTi žice (NiTi-p). Osim što štiti od oslobađanja nikla, djeluje kao visokoestetsko rješenje [36].

S druge strane, mehanička svojstva, koja utječu na mogućnost oblikovanja, otpornost i popustljivost, važna su u opisivanju radnih svojstava žica. Ako su korozijski procesi progresivni, promjene mehaničkih svojstava bit će izraženije [35]. Za klinički rad važno je znati što očekivati od određenih vrsta žica, biti svjestan mogućih problema tijekom izlaganja različitim intraoralnim stanjima [37], i procijeniti značaj nalaza za rizike za ljudsko zdravlje. Zbog estetskih, no i funkcijskih razloga, NiTi žice se u posljednje vrijeme modificiraju raznim prevlakama. Procesom rodiniranja ili nitriranja postižu se bolja estetska svojstva, gdje površina žice ima prevlaku rodija i zlata u debljini od 0,5 µm. Samim se postupkom poboljšavaju mehanička svojstva, povećava čvrstoća, tvrdoća i otpornost na koroziju [27].

Nikal koji se oslobađa iz dentalnih slitina može u određenim slučajevima izazvati alergijsku reakciju, no nije jasno može li izazvati i preosjetljivost [38–41]. Schmalz i Garhammer [42] smatraju da bi relativno visoka učestalost alergije na nikal trebala biti poticaj za zamjenu lijevanih slitina na bazi nikla dostupnom prikladnom alternativnom slitinom. Prethodna istraživanja pokazala su da neki od novih proizvoda na tržištu ne smanjuju površinsku ili opću koroziju, već je povećavaju [43]. Također, u porastu je prevalencija oralnih alergija na metale koji ulaze u sastav raznih dentalnih materijala (od zubnih i ispuna korijenskih kanala, do ortodontskih aparata i protetskih krunica, proteza i implantata) [44]. Opisane su preosjetljivost, alergijske reakcije i simptomi bolesti, odražavajući složene interakcije između različitih komponenti dentalnih materijala, koje su nastale kao posljedica unosa nanočestica, elektromagnetskog zračenja, galvanske korozije i pojedinih genetskih individualnih čimbenika [43, 45]. Primjerice, trenutna uredba Europskog vijeća zabranjuje korištenje dentalnog amalgama za liječenje zubi kod djece mlađe od 15 godina, trudnica i dojilja [46]. Nadalje, zakonodavni okvir Europske unije (EU) bavi se pitanjima korozije metalnih slitina, zahtijevajući ograničenje uporabe vjerojatno kancerogenih, mutagenih i toksičnih za reprodukciju kod ljudi (engl. *cancerogenic, mutagenic, reprotoxic*, CMR) metala, poput nikla, kobalta i kroma, i zahtijeva razvoj novih biomaterijala [47]. Dosadašnja saznanja potvrđuju potrebu za neovisnim ispitivanjem novih materijala na tržištu, kao i opravdanost korištenja jedne ili druge inačice ponuđenih stomatoloških materijala u kliničkom radu, koji doprinose rastućim troškovima liječenja prilikom korištenja skupljih inačica [48, 49].

Promatranje svojstava hrapavosti površine ortodontskih žica važno je za određivanje upotrebe pojedinih vrsta žica u kliničkom radu. Površinske nepravilnosti olakšavaju nakupljanje plaka, smanjuju estetski izgled žice i potiču procese korozije. Nadalje, površinska tekstura i sastav određuju trenje u utorima [28, 33, 35]. Mikroskopija atomskih sila (AFM) je neinvazivna metoda za kvantitativnu i kvalitativnu analizu hrapavosti površine koja omogućuje trodimenzionalni uvid u mikromorfologiju žica. Geometrija stvarne površine toliko je komplicirana da konačan broj parametara ne može pružiti potpuni opis. S povećanim brojem parametara moguće je dobiti točniji opis. Parametri hrapavosti mogu se izračunati ili u dvodimenzionalnom (jedna linija) ili u trodimenzionalnom (za područje površine) obliku. Prethodno je istraživanje pokazalo da su i NiTi i NiTi-p imali povećane parametre hrapavosti površine nakon kliničke uporabe. U usporedbi s NiTi žicama, NiTi-p je pokazala povećane parametre hrapavosti površine čak i u intaktnom stanju [35, 36]. Usporedbom topografije površine žica u obliku luka od nehrđajućeg čelika i NiTi, primijećeno je povećanje hrapavosti za žice u obliku luka NiTi, čak različito kod žica različitih proizvođača [50–52].

Oblaganje ortodontskih žica provodi se radi utjecaja na njihove površinske karakteristike, a time i na svojstva žica, između ostalog na hrapavost površine [35, 53, 54], debljinu [36], mehanička i frikcijska svojstva [35, 36, 54–60], korozivnost [56], bakterijsku adheziju [53, 61] i stabilnost premaza [55, 62]. Za poboljšanje svojstava površine korištene su različite tehnike premazivanja i obrade materijala. Pritom, nove inačice TMA su još uvijek hrapavije površine, u usporedbi s plemenitim čelikom [63]. Novomodificirane vrste NiTi su pokazale bolja radna svojstva uslijed manje hrapave površine, u usporedbi s TMA, a slično SS žicama [64].

Komercijalno dostupne žice s estetskim premazom polimera uglavnom sadrže teflon ili epoksidnu smolu pripremljenu zračnim raspršivanjem ili elektrostatskom tehnikom [36, 64–67], dok debljina premaza obično doseže $\sim 50\text{ }\mu\text{m}$, što mijenja mehanička svojstva estetske žice u obliku luka zbog smanjenih dimenzija slitina [36, 67]. Štoviše, zabilježene su i estetski presvučene žice u obliku luka presvučene metalnom rodijskom oplatom niske refleksije [65, 68] i anorganskim tvrdim krom karbidom [68]. Topografija površine ortodontskih žica utječe na njihova mehanička svojstva, estetski izgled, korozijsko ponašanje i biokompatibilnost [69–71], zbog čega su potrebna istraživanja promjene površine nakon izlaganja uvjetima sličnima onim u usnoj šupljini.

1.2. Korozija

Korozija je elektrokemijski proces i ovisi o sposobnosti provođenja električne struje, pomoću slobodnih elektrona u metalima ili preko iona u otopini. Korozija i njen utjecaj na trajnost i izgled dentalnih materijala glavni su načini na koje elektrokemija utječe na oralnu dobrobit, dok oni pak, s druge strane, mogu biti toksični i uzrokovati alergijski odgovor na metalne ione koji se oslobađaju korozijom i utječu na obližnja tkiva i ostale organe [4]. Korozija se smatra najvažnijim čimbenikom u odabiru metalnih dentalnih materijala, stoga zaslužuje poseban naglasak i mora se vrednovati u oralnom okruženju koje se stalno mijenja. Iako slitine imaju oksidni sloj koji ih čini otpornima na koroziju, ovi biokompatibilni metalni materijali imaju tendenciju lokalnog korodiranja u promjenjivim uvjetima u oralnom mediju i s vremenom se razgrađuju, oslobađajući metalne ione u usnu šupljinu [38, 39] i na taj način doprinose općoj toksičnosti. Također, zbog čestih mehaničkih opterećenja, novog načina proizvodnje ili novog kemijskog sastava proizvoda, zaštitni se oksidni sloj neprestano narušava, uzrokujući trošenje i trajnu elektrokemijsku koroziju [1, 32–40]. Nadalje, slina promjenjivog pH, produkti bakterijskog biofilma ili refluks želučane kiseline, ali i žvačne i ortodontske sile te sredstva za održavanje oralne higijene utječu na strukturnu i kemijsku stabilnost dentalnih materijala [43–45].

Proces degradacije dentalnih metalnih slitina predmet je *in vitro* istraživanja u kojima se analiziraju različiti parametri i njihovi mogući sinergijski učinci, jer se cjelovita simulacija uvjeta unutar usne šupljine teško postiže zbog složenih intraoralnih procesa [46, 47].

Većina fiksnih ortodontskih naprava izrađena je od metalnih slitina; među najčešće korištenim materijalima su slitine nehrđajućeg čelika (SS), kobalt-kroma (CoCr), nikal-titanija (NiTi) i titanij-molibdena (TMA) [2, 16, 48]. Istovremeno se za svaku od ovih skupina materijala na tržištu nude inačice, koje se reklamiraju kao hipoalergene, ali cjenovno nepovoljnije.

Velik broj istraživanja provedenih na alergijskim kožnim testovima ukazuje na dokaze vezane za alergiju na dentalne slitine, a metal koji pritom ima vodeću ulogu je nikal [16, 38]. Osim nikla, ostale slitine koje se koriste u dentalnoj medicini sadrže i druge potencijalno otrovne metale kao što su kobalt i krom. Otpuštanje metalnih iona rezultat je galvanske reakcije između sline i metala, gdje dolazi do elektrokemijske reakcije i pojava korozije. Nikal oslobođen iz dentalnih slitina može u određenim slučajevima izazvati alergijsku reakciju, međutim nije jasno može li izazvati i preosjetljivost. Dosadašnja su istraživanja pokazala da neki noviji proizvodi

na tržištu ne pokazuju karakteristike smanjivanja površinske i opće korozije, kod nekih je ona čak povećana [1, 32–44], što potvrđuje potrebu neovisnog testiranja novih materijala na tržištu i provjeru opravdanosti korištenja različitih inačica ponuđenih dentalnih materijala u kliničkom radu. Neselektivno prihvaćanje novih proizvoda, bez provjera, može neopravdano i nepotrebno povećati troškove terapije.

1.3. Oksidativni stres

Metalni ioni (npr. Fe, Cr, Ni, Co, Ti i Mo ioni), koji se otpuštaju iz korodiranih dentalnih materijala, prijelazni su metali, sposobni producirati reaktivne kisikove vrste i uzrokovati oksidativni stres. Oksidativni se stres razlikuje od ostalih vrsta stresova, jer njegovi primarni okidači (reaktivni kisikovi spojevi – singletni kisik ($O\bullet$), superoksidni anion ($O_2\bullet^-$), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikal ($OH\bullet$)) mogu nastati u povećanim količinama i tijekom uobičajenih metaboličkih procesa [74]. Analiziranje sastava i potencijalnih štetnih učinaka ovih slitina na poticanje oksidativnog stresa presudno je za osiguravanje njihove sigurnosti i učinkovitosti u kliničkim primjenama. Otpuštanje metalnih iona iz slitina doista može doprinijeti oksidativnom stresu u okolnim tkivima stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS). Ovaj proces ključan je za biokompatibilnost i sigurnost metalnih naprava koje se koriste u kliničkim primjenama u dentalnoj medicini [75].

Reaktivni kisikovi spojevi (ROS) proizvode se različitim mehanizmima u biološkim sustavima, uključujući staničnu respiraciju, enzimske reakcije i čimbenike okoliša. Zanimljivo, dok se ROS često povezuju sa štetnim učincima na stanice i tkiva, nedavne studije otkrile su njihovu ključnu ulogu u staničnoj signalizaciji i homeostazi tkiva. Usto, stvaranje ROS-a nije ograničeno na biološke sustave; također se može pojaviti u kontekstu okoliša. Naprimjer, plimni izvor ROS-a identificiran je u obalnim tlima, gdje izmjenični oksično-anoksični uvjeti pokreću proizvodnju $OH\bullet$, $O_2\bullet^-$ i H_2O_2 . Stvaranje ROS-a, posebice $O_2\bullet^-$, H_2O_2 i $OH\bullet$, složen je proces koji se odvija u različitim biološkim i okolišnim sustavima. Iako ove vrste mogu uzrokovati oksidativni stres i oštećenja, one također igraju bitnu ulogu u staničnom funkcioniranju i procesima u okolišu. Razumijevanje mehanizama stvaranja ROS-a i njihovih različitih utjecaja presudno je za unapređenje našeg znanja u područjima od stanične biologije do znanosti o okolišu [76–79].

Pretjerana proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) doista može nadjačati tjelesnu antioksidacijsku obranu, što dovodi do oksidativnog stresa. Biološki odgovor i sposobnost organizma da neutralizira reaktivne kisikove vrste (ROS) i popravi oksidacijska oštećenja igra ključnu ulogu u određivanju utjecaja oksidativnog stresa izazvanog metalima. Oksidativni stres nastaje kada postoji neravnoteža između proizvodnje ROS-a i tjelesnih antioksidativnih obrambenih mehanizama. Metali mogu pogoršati ovu neravnotežu povećanjem stvaranja ROS-a, nadjačavanjem antioksidansa i ometanjem obrambenih putova [80, 81]. Ovo naglašava složenu ulogu ROS-a u staničnim procesima. Usto, stvaranje ROS-a ima važnu zaštitnu i funkcionalnu ulogu u imunološkom sustavu pokazujući da nije sva proizvodnja ROS-a štetna. Održavanje ravnoteže između proizvodnje ROS-a i antioksidativne obrane ključno je za zdravlje stanica. Kada se ta ravnoteža poremeti, dolazi do oksidativnog stresa uzrokovanog prekomjernom proizvodnjom reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i slobodnih radikala, pri čemu on doista može dovesti do značajnog oštećenja staničnih komponenti, uključujući lipide, proteine i DNK, što može pridonijeti razvoju neurodegenerativnih bolesti, raka i poremećaja povezanih s upalom [82, 83]. Ovo oštećenje može rezultirati aktivacijom višestrukih signalnih putova, faktora rasta, faktora transkripcije i upalnih molekula, što potencijalno dovodi do disfunkcije tkiva i raznih kroničnih bolesti [85].

Međutim, odnos između oksidativnog stresa i stanične funkcije složen je, sa štetnim i potencijalno korisnim učincima ovisno o razini i kontekstu oksidativnih modifikacija. Razumijevanje ovih mehanizama ključno je za razvoj ciljanih intervencija za ublažavanje štetnih učinaka oksidativnog stresa i održavanje stanične homeostaze. [86] Sastav slitine i razumijevanje specifičnih metala prisutnih u njoj doista je ključno za predviđanje njezina potencijala za induciranje oksidativnog stresa, budući da različiti metali pokazuju različite kapacitete za stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i pokreću reakcije na oksidativni stres. Razni metali, esencijalni i neesencijalni, mogu pridonijeti oksidativnom stresu putem različitih mehanizama. Naprimjer, pokazalo se da bakar i natrijev arsenit stimuliraju transkripcijsku aktivnost ovisno o nuklearnom eritroidnom faktoru 2 (Nrf2) u više staničnih linija, što ukazuje na njihov potencijal za induciranje oksidativnog stresa, dok su drugi metali poput kobalta, zlata, željeza, olova, žive, srebra i cinka također pokazali moć aktiviranja Nrf2 u najmanje tri testirane stanične linije [87]. Osim toga, metali poput arsena, kadmija, kroma i nikla klasificirani su kao karcinogena grupa 1 i otkriveno je da izazivaju oksidativni stres, oštećenje DNK i procese stanične smrti [88]. Sposobnost metala da stimuliraju reakcije na oksidativni stres može značajno varirati ovisno o tipu stanice i specifičnom metalu koji je uključen. Naprimjer,

utvrđeno je da se apsolutna veličina aktivacije Nrf2 i relativna snaga različitih metala razlikuju između staničnih linija, naglašavajući složenost oksidativnog stresa izazvanog metalima [87]. Nadalje, dok signalizacija Nrf2 može poslužiti kao zaštitni mehanizam protiv toksičnosti izazvane metalima, produljena izloženost i kontinuirana aktivacija također mogu pridonijeti karcinogenezi izazvanoj metalima [89].

Površinske karakteristike slitine, poput hrapavosti i prevlake, mogu utjecati na oslobađanje metalnih iona i kasnije stvaranje ROS-a. Oslobađanje metalnih iona iz implantiranih metalnih materijala i kasnije stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) doista su pod utjecajem karakteristika površine poput hrapavosti i prevlaka. Površinski oksidni filmovi na metalnim materijalima igraju ključnu ulogu u inhibiciji otpuštanja iona, iako se ti filmovi mogu mijenjati tijekom vremena *in vivo*, no prisutnost prevlake može značajno utjecati na procese razgradnje i otpuštanja iona metalnih materijala [90].

Sposobnost suočavanja s oksidativnim stresom varira tijekom života organizma, od ranog razvoja do odrasle dobi, a pod utjecajem je uvjeta okoline i načina života. Ova varijabilnost antioksidativne obrane i sposobnosti popravka može dovesti do različitih ishoda kao odgovor na oksidativni stres izazvan metalima. Naprimjer, i antioksidativna obrana i sposobnost popravka oksidativnog oštećenja imaju tendenciju opadanja s godinama, pridonoseći povećanoj ranjivosti na oksidativni stres kod starijih organizama. Utjecaj oksidativnog stresa izazvanog metalima nije ujednačen među pojedincima ili populacijama. Sposobnost tijela da neutralizira ROS i popravi oksidacijska oštećenja je dinamična, pod utjecajem čimbenika kao što su dob, uvjeti okoliša i genetske varijacije. Ova varijabilnost naglašava važnost razmatranja razlika na razini pojedinaca i populacije kada se procjenjuju učinci oksidativnog stresa izazvanog metalima kod ljudi i divljih životinja [91].

Metalni ioni oslobođeni iz ortodontskih slitina doista mogu dovesti do oksidativnog stresa u biološkim sustavima, što je dokazano u nekoliko studija. Simulirani sastavi ortodontske slitine koji sadrže ione Fe, Ni, Cr, Co, Ti i Mo pokazali su se citotoksičnim u visokim koncentracijama (1000 μM) i induciraju stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama kvasca [92]. Slično tome, značajno povećanje koncentracije Ni u slini i Ti u mokraći primijećeno je kod pacijenata 3 – 6 mjeseci nakon postavljanja ortodontskog aparata [93]. Zanimljiva je činjenica da stanični odgovori na ove metalne ione variraju. Dok su Ti, Zr, Hf, Nb, Ta, Cr, Ru i Si pokazali izvrsnu staničnu proliferaciju, elementi poput V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu i Zn pokazali su jaku citotoksičnost prema stanicama sličnim osteoblastima [94]. Dodatno, otkriveno je da ioni Co^{2+} induciraju

oksidativni stres i mitohondrijsku disfunkciju u makrofagima, potencijalno pridonoseći upalnim odgovorima u periprostetskim tkivima [95].

U pokušaju smanjivanja utjecaja otpuštenih iona na stanične procese predložena je uporaba antioksidansa tijekom ortodontskog liječenja, kako bi pomogla u ublažavanju potencijalnih negativnih učinaka oksidativnog stresa izazvanog metalnim ionima [96].

Postoje ograničeni podaci o specifičnim kombinacijama ovih metalnih iona i njihovom zajedničkom utjecaju na oksidativni stres. Interakcija između metalnih iona i oksidativnog stresa je složena, s različitim metalima koji različito doprinose staničnom redoks statusu. Iako su pojedinačni metalni ioni opsežno proučavani, njihove specifične kombinacije i zajednički utjecaj na oksidativni stres nisu u tolikoj mjeri, nudeći ograničene podatke. Metalni ioni poput kobalta, kroma, bakra i željeza mogu povećati proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), što dovodi do oksidativnog stresa [97]. Međutim, učinci mogu varirati ovisno o specifičnom metalu i njegovoj koncentraciji. Naprimjer, studija o implantatima kuka metal na metal otkrila je da povećane razine iona kobalta i kroma nisu bile povezane sa značajnim oštećenjem oksidativnim stresom u plazmi pacijenata. To je u suprotnosti s općim shvaćanjem da ovi metali izazivaju oksidativni stres, naglašavajući složenost interakcija metalnih iona u biološkim sustavima. [98]

Mikroorganizmi su pogodni za proučavanje oksidativnog stresa na biokemijskom, molekularnom i staničnom nivou jer je priroda stresnih čimbenika, kao i oksidativnim stresom uzrokovana šteta na nukleinskim kiselinama, proteinima i lipidima jako slična u svim tipovima organizama [74]. Njihova prikladnost proizlazi iz nekoliko ključnih čimbenika, od kojih je jedan od najvažnijih genetska manipulacija, jer se mnogi mikroorganizmi lako genetski manipuliraju, olakšavajući proučavanje specifičnih gena i putova uključenih u reakcije na oksidativni stres. Genetska manipulacija mikroorganizama doista se pokazala vrijednim alatom za proučavanje reakcija na oksidativni stres i povezanih putova. Posebno se *Saccharomyces cerevisiae* pokazao kao optimalan modelni organizam za takve studije zbog svoje genetske sposobnosti i visokog stupnja homologije s ljudskim genomom. Ovaj model kvasca omogućuje jednostavne genetske manipulacije, olakšavajući istraživanje višestrukih procesa povezanih s oksidativnim stresom [99]. Mikroorganizmi također pokazuju usporedive stanične odgovore na oksidativni stres kao viši organizmi, uključujući proizvodnju antioksidansa i mehanizme popravka DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*). Uz to što mikroorganizmi dijele slične reakcije na oksidativni stres kao i viši organizmi, oni također nude jedinstvene prednosti kao izvori

antioksidansa. Antioksidansi temeljeni na mikrobima su netoksični, nekancerogeni i biorazgradivi u usporedbi sa sintetičkim alternativama i mogu se brzo proizvesti u kontroliranim uvjetima. To ih čini potencijalno vrijednima za različite primjene, uključujući ljudsko zdravlje i industrijsku uporabu [100].

1.4. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* posjeduje efikasne mehanizme za uklanjanje toksičnosti raznovrsnih metala i može preživjeti različite stresne uvjete, što ga čini idealnim modelnim organizmom za proučavanje mehanizama odgovora na stres izazvan metalima. Izlaganje kvasca *S. cerevisiae* ionima metala (kao što su Fe i Ni) dovodi do stvaranja slobodnih radikala i izazivanja oksidativnog stresa. Kvasac na oksidativni stres reagira, kod manjih koncentracija ROS-a adaptacijski, kod većih uključivanjem raznih antioksidacijskih mehanizama, dok kod jako velikih koncentracija dolazi do apoptoze ili nekroze [101]. Zbog svoje snažne sposobnosti detoksikacije različitih metala i podnošenja različitih stresnih uvjeta služi kao izvrstan modelni organizam za istraživanje mehanizama odgovora na stres izazvan metalima. *S. cerevisiae* značajno je pridonio razumijevanju temeljnih procesa kao npr. razvrstavanje proteina u vakuoli, funkcija mitohondrija i putovi odgovora na oštećenje DNK [102]. Kada je izložen metalnim ionima poput željeza (Fe) i nikla (Ni), *S. cerevisiae* doživljava stvaranje slobodnih radikala, što dovodi do oksidativnog stresa. Ioni metala poput željeza (Fe) i nikla (Ni) doista mogu izazvati oksidativni stres kod *Saccharomyces cerevisiae* stvaranjem slobodnih radikala. U studiji koja simulira sastave ortodontske slitine, divlji tip *S. cerevisiae* i dva mutanta (Δ Sod1 i Δ Ctt1) bili su izloženi metalnim smjesama koje su sadržavale ione Fe, Ni, Cr, Co, Ti i Mo [92]. Rezultati su pokazali da su pri visokim koncentracijama (1000 μ M) ove mješavine metala bile citotoksične i inducirale stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i oksidativno oštećenje stanica kvasca. Zanimljiva je činjenica da se, iako Fe i Ni mogu doprinijeti oksidativnom stresu, njihovi mehanizmi djelovanja razlikuju. Željezo, kao redoks-aktivan metal, može izravno sudjelovati u redoks reakcijama, stvarajući superoksidne anionske radikale i druge ROS. Nikal se, s druge strane, smatra neredoks metalom ili metalom sa slabim redoks potencijalom, ali može izazvati oksidativni stres iscrpljivanjem glutaciona i vezanjem na sulfhidrilne skupine proteina. [103]. Čini se da ozbiljnost oksidativnog stresa ovisi o koncentraciji, pri čemu veće koncentracije iona metala uzrokuju značajnija oštećenja [92].

Jedna od glavnih molekula antioksidansa u stanicama *S. cerevisiae* je glutathion (GSH), koji neutralizira mnoge metale i metaloide [104]. Tim reakcijama dolazi do smanjenja citosolnog GSH, a posljedično i do narušavanja aktivnosti enzima ovisnih o GSH, kao što su glutathion peroksidaze, glutathion S-transferaze i glutaredoksini.

Velike koncentracije ROS-a mogu aktivirati različite antioksidativne mehanizme kao što su enzimski antioksidansi, uključujući superoksid dismutazu (SOD), katalazu (CAT) i glutathion peroksidazu (GPx), koji igraju ključnu ulogu u zaštiti stanica od oksidativnog stresa. Ovi enzimi rade zajedno kako bi neutralizirali štetne reaktivne kisikove vrste (ROS) i održali staničnu redoks ravnotežu [105]. Katalaza, superoksid dismutaza 1 i 2 (SOD1 i SOD2) i glutathion sintetaza igraju ključnu ulogu u zaštiti stanica od oksidativnog stresa. Ovi su enzimi dio staničnog antioksidativnog obrambenog sustava, neutralizirajući zajedno reaktivne kisikove vrste (ROS) i održavajući staničnu redoks ravnotežu. Katalaza se primarno nalazi u peroksisomima i njena je uloga katalizirati razgradnju vodikovog peroksida (H_2O_2) u vodu i kisik, štiteći na taj način stanice od štetnih učinaka visokih koncentracija H_2O_2 . Ekspresija katalaze se može pojačati kao odgovor na izloženost vodikovom peroksidu. Superoksid dismutaza 1 (SOD1), kao bakar-cink superoksid dismutaza, prvenstveno citosolna, katalizira dismutaciju superoksidnih radikala ($O_2^{\bullet-}$) u vodikov peroksid i molekularni kisik i igra presudnu ulogu u zaštiti stanica od oštećenja izazvanih superoksidom. Superoksid dismutaza 2 (SOD2), kao manganov superoksid dismutaza, smještena u mitohondrijima, također katalizira dismutaciju superoksidnih radikala koji su osobito važni za zaštitu mitohondrija od oksidativnog oštećenja kao prva linija obrane protiv mitohondrijskih ROS [106]. Glutathion sintetaza katalizira posljednji korak u biosintezi glutathiona, kao ključni antioksidans i redukcijsko sredstvo u stanicama, pomažući u održavanju staničnog redoks stanja i štiteći od oksidativnog stresa. Neizravno podupire funkciju glutathion peroksidaze, kao još jednog važnog antioksidativnog enzima. Ovi enzimi djeluju usklađeno kako bi zaštitili stanice od različitih oblika oksidativnog stresa; SOD1 i SOD2 pretvaraju superoksidne radikale u vodikov peroksid, katalaza pretvara vodikov peroksid u vodu i kisik, a glutathion, kojeg proizvodi glutathion sintetaza, djeluje kao opći antioksidans i podržava druge antioksidativne enzime. Ekspresiju i aktivnost ovih enzima reguliraju različiti transkripcijski faktori koji reagiraju na stres, uključujući Yap1 i Skn7 u kvascima [107]. Njihovo koordinirano djelovanje ključno je za održavanje zdravlja stanica u uvjetima oksidativnog stresa.

Kvasci su razvili sofisticirane mehanizme za odgovor na oksidativni stres, uključujući i enzimske i neenzimske antioksidativne sustave. Ovi odgovori regulirani su konzerviranim

transkripcijskim faktorima kao što su Yap1 i Skn7, koji reguliraju ekspresiju antioksidativnih enzima SOD, katalaze i glutathion peroksidaze [106, 107]. Zanimljivo je da različiti oksidativni stresori mogu izazvati različite reakcije. Naprimjer, liječenje parakvatom prvenstveno povećava ekspresiju SOD, dok vodikov peroksid pojačava ekspresiju katalaze [106]. Prilagodba na oksidativni stres usko je povezana s redoks promjenama komponenti antioksidativne obrane [109].

Glutathion (GSH) je najzastupljeniji intracelularni tiol niske molekularne težine u stanicama i tkivima, koji igra ključnu ulogu u brojnim staničnim procesima. Djeluje kao glavni antioksidans, regulirajući funkciju proteina, sintezu DNK, ekspresiju gena, staničnu proliferaciju i staničnu signalizaciju [110]. Zanimljivo je da stanice raka pokazuju više razine glutathiona kako bi se nosile s povećanim oksidativnim stresom, što daje prednost rastu i otpornost na kemoterapijske agense. Međutim, smanjenje GSH kao jedinstvene terapijske strategije bilo je uglavnom neučinkovito u usporedbi s kombinatornim pristupima [111]. Nasuprot tome, nedostatak GSH pridonosi oksidativnom stresu. Homeostaza glutathiona ključna je za zdravlje i funkciju stanica. Njegovu sintezu regulira aktivnost γ -glutamylcistein sintetaze, dostupnost cisteina i inhibicija GSH povratnom spregom [112]. Manipulacija staničnim razinama GSH kroz različite strategije, poput primjene prekursora cisteina ili estera glutathiona, može imati terapijski potencijal za razne poremećaje. Međutim, složena uloga glutathiona u različitim staničnim procesima i bolesnim stanjima zahtijeva daljnja istraživanja kako bi se razvile učinkovite terapijske strategije [113].

Mitochondriji su središnja organela za proizvodnju ROS-a i brojnih drugih štetnih reaktivnih spojeva [114], i svaka će se promjena na mitohondrijima reflektirati na rad cjelokupne stanice [115]. Vrlo visoke koncentracije ROS-a također mogu izazvati programirane stanične smrti (apoptozu) ili nekrozu stanice. Indukcija apoptoze uključuje složene signalne putove, često posredovane mitohondrijima, koji djeluju kao "čuvari" apoptoze i efektori stanične nekroze [118]. Teško stanično oštećenje može dovesti do nepovratne stanične smrti kroz različite mehanizme. Oštećenje DNA, ishemijsko-reperfuzijska ozljeda i intracelularna ionska deregulacija neki su od ključnih čimbenika koji mogu potaknuti ireverzibilnu staničnu smrt. Kada je oštećenje ozbiljno i nepopravljivo, stanice mogu doživjeti različite oblike regulirane stanične smrti, uključujući apoptozu, nekrozu, autofagiju, mitotičku katastrofu, piroptozu i nekroptozu [119, 120].

2. SVRHA ISTRAŽIVANJA

U ovom su istraživanju ispitane inačice po dvije usporedne slitine koje se koriste jednakovrijedno u pojedinim fazama ortodontske terapije: 1.) nepresvučena NiTi i NiTi s prevlakom; 2.) plemeniti čelik i plemeniti čelik bez nikla; 3.) slitina TMA i slitina Co-Cr. Cilj ovog istraživanja je utvrditi i usporediti otpuštanje iona standardnih dentalnih slitina i njihovih hipoalergenih ekvivalenata.

Cilj je ispitati postoji li pozitivna korelacija između stresnog odgovora kvasca na tretman iscrpinama metalnih iona i promjena mehaničkih i površinskih svojstava dentalnih slitina.

Specifični ciljevi: izmjeriti otpuštene ione, mehanička svojstva (čvrstoća i Youngov modul elastičnosti), površinska svojstva, utvrditi vrstu stresnog odgovora kvasca. Hipoteza je da će hipoalergene slitine otpuštati manje metalnih iona u kiseloj i neutralnoj umjetnoj slini, u usporedbi sa standardnim dentalnim slitinama otpustiti manje iona, manje promijeniti mehanička i površinska svojstva te izazvati niže razine odgovora na oksidativni stres.

Svrha je dati preporuke za kliničku upotrebu slitina koje su otpornije na koroziju i promjenu mehaničkih i površinskih svojstava te izazivaju manji oksidativni stres.

3. MATERIJALI I POSTUPCI

3.1. Materijali

3.1.1. Ortodontske žice

Testirani su komercijalno dostupni ortodontski lukovi:

1. NiTi slitina (NiTi) (sastava Ni 50,4 %; Ti 49,6 %) – BioForce Sentalloy® (Dentsply GAC, New York, SAD);
2. NiTi slitina s prevlakom od zlata i rodija (NiTi-p; RhNiTi) – High Aesthetic® (Dentsply GAC, New York, SAD);
3. Slitina plemenitog čelika (SS) (Cr 18 – 20 %, Ni 8 – 10,5 %, ostatak Fe) ® – Remanium® (Dentaurum, Ispringen, Germany);
4. Slitina plemenitog čelika (SS bez Ni) (Mn 16 – 20 %, Cr 16 – 20 %, Mo 1,8 – 2,5 %, ostatak Fe) – Noninium® (Dentaurum, Ispringen, Germany);
5. Slitina CoCr (CoCr) (sastav Ni 14 – 16 %, Cr 19 – 21 %, Mo 6 – 8 %, Co 38 – 42 %) – Elgiloy® (Dentaurum, Ispringen, Germany);
6. Slitina TiMo (TMA) (Mo 11,5 %, Ti 78 %) – Rematitan® Special (Dentaurum, Ispringen, Germany).

3.1.2. Mediji za eluiranje i priprema eluata

Korištena su dva medija za eluiranje – umjetna slina i kvašćeva podloga.

Umjetna slina pripremljena je od: 1,5 g/l KCl, 1,5 g/l NaHCO₃, 0,5 g/l KSCN, 0,9 g/l mliječne kiseline. pH-vrijednosti su prilagođene mliječnom kiselinom oponašajući neutralnu oralnu okolinu (pH 6,6) i onu kod osoba s lošom oralnom higijenom (pH 5,5) [56].

Kvašćeva podloga je otopina glukoze (20 g/dm³), peptonske vode (20 g/dm³) i kvašćevog ekstrakta (10 g/dm³). Također je pripremljena u dvije pH-vrijednosti, pH 5,5 i pH 6,6, i korištena za uzgoj kvasca za ispitivanje biološkog učinka eluiranih metalnih iona.

Sva su mjerenja provedena na 5 uzoraka (tehničkih replika) po vrsti ispitivanog ortodontskog luka u kombinaciji s različitim pH umjetne sline, prema provedenoj *power* analizi prethodnih istraživanja [45].

Za pripremu eluata korišteno je pola ortodontskog luka (žice) svake vrste (oko 7 cm) na koji je dodan 1 mL pripremljenog medija po cm luka (ukupno 7 mL). Epruvete s uzorcima su autoklavirane na 121 °C, 15 minuta, a nakon toga inkubirane na 37 °C kroz period 3, 7, 14 i 28 dana. Nakon svakog vremenskog perioda odvajani su eluati u kojima je mjerena količina otpuštenih metalnih iona te ortodontski lukovi koji su isprani destiliranom vodom, osušeni i spremljeni za daljnje analize.

3.2. Metode

3.2.1. Biološki učinak

3.2.1.1. Uzgoj kvasca

U ovom istraživanju korišten je soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303 (MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3-52 trp1-1 ade2-1), auksotrofan za histidin te zbog te mutacije ograničenog rasta na podlogama s metalnim ionima. Za svaki metal treba mu određena pH-vrijednost (optimalno 5,5 – 6,6 za većinu metalnih iona) i do određenih koncentracija [11].

U svim pokusima korištena je kvašćeva podloga u koju su eluirani metalni ioni 28 dana (na tresilici, na 37 °C) pri dvije pH-vrijednosti, pH 5,5 i pH 6,6.

Scale-up sistemom pripremljene stanice kvasca *S. cerevisiae* rasle su 22 h (na tresilici, 200 okr/min), odnosno do postizanja rane stacionarne faze na prethodno priređenim iscrpinama ortodontskih žica u kvašćevu podlogu. Obična, netretirana podloga služila je kao kontrolni, referentni uzorak. Vrijeme potrebno za ulazak u ranu stacionarnu fazu određeno je eksperimentalno, preko krivulja rasta za svaku vrstu iscrpine i obje pH-vrijednosti. Svaka je iscrpina, zbog specifičnog sastava eluiranih metalnih iona, različito djelovala na rast kvasca, ali je vrijeme od 22 sata bilo dovoljno da na svim tim eksperimentalnim podlogama kvasac uđe u ranu stacionarnu fazu.

3.2.1.2. Praćenje vitalnosti kvasca

Vitalnost kvasca praćena je preko promjene broja stanica, odnosno porasta broja stanica nakon rasta na eksperimentalnim podlogama. U svakom je uzorku izmjereno početni broj stanica kvasca, uz početnu konc. 6×10^6 st/mL. Uzgoj kvasca na podlogama nastavlja na tresilici (200 okr/min) na 28 °C / 22 sata. Nakon pokusa, u svim uzorcima ponovno je mjeren broj stanica

brojačem stanica *Luna-FL*TM (Logos Biosystems, Anyang-si, Južna Koreja) te računat porast broja stanica u odnosu na početni broj. Tim se uređajem osim ukupnog broja stanica mjerila i njihova veličina te je moguće dobiti i histogram raspodjele veličine poraslih stanica. Pokus je izvođen u najmanje četiri biološke replike po svakom uzorku.

3.2.1.3. Ekspresija gena oksidativnog stresa

Analiza ekspresije glutation sintetaze 1 (GSH1), superoksid dismutaze 1 i 2 (SOD1 i SOD2) te katalaze (CTT1) provedena je na svim skupinama uzoraka. Kao referentni gen korištena je glikoamilaza specifična za sporulaciju (SGA1).

Sam postupak ima nekoliko koraka: izolacija RNA (engl. *ribonucleic acid*), reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.

Izolacija RNA iz uzoraka kvasca tretiranog iscrpinama eksperimentalnih žica izvedena je *TRIzol Reagent* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Litva), prema protokolu proizvođača. Kvasac je pripremljen prema postupku opisanom u prethodnom poglavlju (3.2.1.2.) uz dodatan korak prevođenja tretiranih stanica kvasca u sferoplaste. Za to je korišten postupak opisan u radu Čanadi Jurešić i Blagović, 2011 [122] uz korištenje zimolijaze. Reagens *TRIzol* dodan je na pripremljene sferoplaste od svake vrste tretiranih stanica. Svaki je uzorak pripreman u četiri biološke replike.

Sam postupak izolacije RNA ima nekoliko koraka – taloženje RNA, ispiranje i otapanje taloga te određivanje čistoće i mjerenje koncentracije RNA. Čistoća je određivana omjerom $A_{260/280\text{nm}}$ i analizom na agaroznom gelu. Onečišćeni i uzorci s omjerom $A_{260/280\text{nm}} > 1,9$ su korišteni u daljnjem postupku reverzne transkripcije.

Reverzna transkripcija odrađena je prema postupku proizvođača koristeći *Maxima H Minus Reverse Transcriptase kit* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Litva). cDNA (engl. *complementary deoxyribonucleic acid*) je pripremana iz RNA uzoraka zadovoljavajuće čistoće korištenjem *Maxima H minus* reverzne transkriptaze. Nakon tretmana RNazom, ukupna RNA obrnuto je prepisana oligo(dT)₁₈ i nasumičnim heksamerima. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 20 µL sadržavala je 2 µg ukupne RNA i 4 µL *Master Mix*a, a za uspješnu reakciju bilo je potrebno reakcijsku smjesu voditi kroz temperaturni režim. Nakon pripreme smjese na ledu, smjesa je inkubirana na 25 °C, 10 minuta, pa na 50 °C, 25 minuta, te završna reakcija na 85 °C, 5 minuta. Takva, tzv. “*first strand DNA*” ili prva sintetizirana DNA nakon završene reakcije pohranjena je na -20 °C. Za kontrolu reverzne transkripcije korištene su dvije kontrole:

no RT (engl. *no reverse transcriptase*), za procjenu kontaminacije uzorka genomskom DNA i tzv. NTC (engl. *no template control*) kojom se provjerava čistoća korištenih reagensa.

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu provedena je na *Applied Biosystems® 7300 Real-Time PCR* (engl. *Polymerase Chain Reaction*) uređaju koristeći *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Litva), prema protokolu proizvođača. Za svaku je reakciju korišteno 5 ng/μL cDNA. PCR reakcijska smjesa, ukupnog volumena 20 μL, sadržavala je 10 μL *PowerUp SYBR Green-a*, 5 μL cDNA pojedinog uzorka, 2 μL smjese početnica gena/enzima od interesa i 3 μL ddH₂O (engl. *double distilled H₂O*). Svi su uzorci rađeni u duplikatu. Uz enzime oksidativnog stresa GSH, CTT, SOD1 i SOD2 korištena je SGA1 kao endogeni kontrolni gen (detalji korištenih početnica navedeni u tablici 2.). Početnice su prethodno istestirane te im je određena optimalna koncentracija.

Korišten je sljedeći qPCR (engl. *quantitative Polymerase Chain Reaction*) protokol:

Tablica 1. Primijenjeni qPCR protokol

	Ciklus 1 × 1 ponavljanje	Ciklus 2 × 1 ponavljanje	Ciklus 3 × 40 ponavljanja	
	Korak 1	Korak 1	Korak 1	Korak 2
Temperatura / °C	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Vrijeme zadržavanja / min	2 minute	2 minute	15 sekundi	1 minuta

Tablica 2. Karakteristike korištenih početnica gena oksidativnog stresa (sekvenca, talište, veličina te udjel GC baza)

Gen	Sekvenca početnica (l: 0' - primer left -4' r: 0' - primer left -4')	Temp. (°C)	Veličina (broj baza)	%GC (udjel baza)
GSH1	l: TGGGCTCCAGGTCTGTCC	71	18	67
Glutation sintetaza 1	r: GCAACACCTCTTTCCTTCGG	70	20	55
SOD1	l: GCCTGTGGTGTCATTGGTCTA	71	21	52
Superoksid dismutaza 1	r: GTTCGCCCCGCAATGTGATAG	70	20	55
SOD2	l: GCAGTTTGGCAGTCTGGAC	70	19	58
Superoksid dismutaza 2	r: AATTGGTTCTCTGCCTGGTG	68	20	50
CTT1 katalaza	l: GAGACGCTATTAAGTTTCCCGT	69	22	45
	r: AGAACGGAATCATTAGAAGGCT	68	22	41
SGA1	l: GAACGTTTCATTCCACTTGCA	67	21	43
Glikoamilaza specifična za sporulaciju	r: CCATTTCGCAGGGTCCACTAA	70	20	55

Na kraju *SYBR-green* PCR reakcije mjerena je i disocijacijska krivulja (krivulja taljenja). Ovom je analizom provjerena specifičnost i kvaliteta amplifikacije DNA, razlikovanjem između specifičnih i nespecifičnih produkata na temelju njihovih točaka taljenja. Krivulja je generirana povećanjem temperature od 55 °C do 95 °C u malim koracima i praćenjem intenziteta

fluorescencije u svakom koraku. Kako se dsDNA (engl. *double stranded deoxyribonucleic acid*) denaturira (topi), fluorescencija se smanjuje. Dijagram je stoga stvoren koristeći negativnu prvu derivaciju intenziteta fluorescencije u funkciji temperature. Za svaki se amplikon (gen od interesa) mora vidjeti jedan karakterističan oštar vrh na temperaturi taljenja (T_t) i samo su rezultati takvih analiza uzeti u daljnju obradu.

Količina PCR produkta u idealnim uvjetima udvostručit će se na kraju svakog ciklusa tijekom faze eksponencijalne amplifikacije, što iznosi 2^n , gdje je n broj ciklusa. Kvantifikacija početnih vrijednosti u qPCR testu temeljena je na broju ciklusa potrebnih da intenzitet fluorescencije dosegne prag postavljen automatski ili ručno u logaritamskoj fazi pojačanja. Taj tzv. ciklusni prag (C_T) je potreban za sve metode kvantifikacije. Softver koji upravlja qPCR opremom automatski analizira i računa C_T vrijednost, a ta je vrijednost korištena u kvantificiranju dobivenih eksperimentalnih podataka. Korištena je relativna kvantifikacijska metoda prema Livaku ($2^{-\Delta\Delta CT}$). U toj se metodi vrijednosti gena od interesa prvo normaliziraju prema endogenom kontrolnom genu, a onda računaju prema referentnom (kontrolnom) uzorku ($\Delta\Delta CT$). Dobivena razlika uvrštava se u formulu $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.2.2. Mjerenja induktivno spregnutom plazmom (engl. *inductively coupled plasma, ICP*)

Otpušteni ioni metala (vrsta i koncentracija) određivani su u eluatima šest vrsta ortodontskih žica, sastava navedenog pod točkom 3.1.1. Eluati metalnih iona u umjetnu slinu, pri pH 5,5 i 6,6 pripremani su prema prethodnim istraživanjima [56]. Uzorci slitine potopljani su u 10 mL sterilne umjetne sline (1 cm uzorka slitine / 1 mL umjetne sline) na razdoblje od 3, 7, 14 i 28 dana, na 37 °C i uz umjereno tresenje na mehaničkoj tresilici (100 o/min). Kao negativna kontrola poslužili su uzorci sline bez slitina. Sastav sline je opisan pod točkom 3.1.2.

Oslobađanje iona zabilježeno je pomoću induktivno spregnute plazma-masene spektrometrije (engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) (Agilent Technologies 7800, Santa Clara, SAD), svi su uzorci zakiseljeni s 1 kapi koncentrirane HNO_3 , prije ubrizgavanja u spektrometar. Kao rezultati analize dobiveni su metalni ioni čija je količina izražena masenom koncentracijom ($\mu g/l$). U ovom radu, otpuštanje metala izraženo je u $\mu g/cm^2$, kako bi se omogućila bolja procjena aspekta biokompatibilnosti prevođenjem eksperimentalnih rezultata u kliničke uvjete, kako su opisali Arndt i sur. [123]. Ovako prikazani podaci omogućuju izračunavanje prosječnog dnevnog ispuštanja za npr. dvije žice (za gornji i donji zubni niz,

ukupne dužine 28 cm), očekivanog u kliničkim uvjetima, za osobe dobre (pH 6,6) ili loše oralne higijene (pH 5,5); ili u bilo kojoj drugoj kliničkoj situaciji u vezi s vrstom i dimenzijama žica.

3.2.3. Mjerenje mehaničkih svojstava nanoindenterom

Nakon završetka eksperimenta s otpuštanjem iona iz umjetne sline, po 3 uzorka svake vrste žice i iz oba pH sline su sačuvani za provođenje mehaničkih testiranja.

Mjerenja tvrdoće nanoindentiranja (H_{IT}) i Youngovog modula (E_{IT}) provedena su *Keysight G200 Nanoindenterom* (rezolucija sile: 50 nN, rezolucija utiskivanja: 0,01 nm) prema standardu ISO (engl. *International Organization for Standardization*) 14577; korišten je Berkovich vrh od 20 nm. Mjerenja su provedena utiskivanjem u uzorku 4×4 točke s vršnim opterećenjem vršnom silom od 100 mN (dubina utiskivanja od $\sim 2 \mu\text{m}$). Vrijeme učitavanja bilo je 10 s, nakon čega je uslijedilo vršno vrijeme zadržavanja od 1 s i dopuštene stope pomaka od 0,2 nm/s.

3.2.4. Analiza površine mikroskopom atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM)

Nakon završetka eksperimenta s otpuštanjem iona iz umjetne sline, po 1 uzorak svake vrste žice i iz oba pH sline su sačuvani za provođenje mehaničkih testiranja.

Mikroskop atomskih sila (AFM) korišten je za opisivanje površinske morfologije uzoraka i mjerenje aritmetičke srednje hrapavosti površine R_a , srednje kvadratne (RMS) hrapavosti R_q i maksimalne visine neravnina R_z . AFM mjerenja u kontaktnom načinu provedena su korištenjem *Nanosurf Easyscan 2 Controller Atomic Force Microscopy* (AFM), Liestal, Switzerland. Mjerenja na površinama od $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$ kontrolirana su putem softvera *NanoScope* instrumenta; ovaj je softver također korišten za izravnavanje mjernih podataka, filtrirajući nagib sonde u odnosu na površinu uzorka. Korištene su sonde visoke razlučivosti SNL-10 (AFM, Liestal, Switzerland) s radijusom vrha Si od 2 nm, montirane na trokutastu konzolu Si_3N_4 debljine $0,6 \mu\text{m}$ (s krutošću na savijanje od 0,12 N/m).

3.2.5. Analiza površine skenirajućim elektronskim mikroskopom / energijskom disperzivnom rendgenskom spektroskopijom (engl. *scanning electron microscopy with energy dispersive spectroscopy*, SEM/EDX)

Površina svih eksperimentalnih ortodontskih žica, nakon završenog pokusa, proučavana je pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM (engl. *scanning electron microscopy*),

Jeol JSM-7800F, Tokio, Japan) prikupljanjem sekundarnih elektrona s naponom ubrzanja elektronskog snopa od 10 kV i radnom udaljenosti od 10 mm. Energijska disperzivna rendgenska (engl. *energy dispersive X-ray spectroscopy*, EDX) spektroskopija (*X-Max 80*, Oxford Instruments, Abingdon, UK) u SEM-u korištena je za proučavanje elementarnog sastava reprezentativnih uzoraka s naponom ubrzanja snopa od 12 kV. Svaka je eksperimentalna ortodontska žica mjerena na tri površinska mjesta, s najmanje tri dodatna EDX spektroskopska ispitivanja. Svaki ispitivani element je standardiziran pomoću standarda (za aluminij se koristi Al_2O_3 , za argon Ar(V), za kalcij wollastonit, za ugljik vitamin C, za klor NaCl, za krom Cr, za bakar Cu, za željezo Fe, za magnezij MgO, za mangan Mn, za nikal Ni, za fosfor GaP, za kisik i za silicij SiO_2 , za kalij KBr, za rodij Rh, i za natrij albit).

3.3. Statistička obrada podataka

Podaci su statistički obrađeni, ovisno o raspodjeli dobivenih podataka. Provjera normalnosti distribucije i homogenosti varijance unutar skupina provedena je pomoću *Skewnessa*, Kurtosisa i Kolmogorov-Smirnovljevog testa. Za podatke koji slijede normalnu distribuciju korišteni su parametrijski testovi, analiza varijance (ANOVA) i *Turkey's post-hoc test*. Za podatke koji ne slijede normalnu distribuciju korišteni su neparametrijski testovi, Kruskal-Wallis test i Mann-Whitney test. Za procjenu povezanosti korištena je Pearsonova ili Spearmanova korelacija, ovisno o distribuciji podataka. Vrijednosti $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnim.

Za rezultate ICP u umjetnoj slini kao temeljna analiza korištena je mješovita analiza varijance, tj. analiza varijance gdje je kao faktor unutar entiteta (*withinsubjects*) korišteno vrijeme, a kao faktori između entiteta (*betweensubjects*) korišteni su vrsta žice i pH.

Analize su rađene zasebno za svaku vrstu iona, a u usporedbama su komparirani parovi žica NiTi i NiTi-p, SS i SS bez nikla te CoCr i TMA.

Sve obrade podataka napravljene su korištenjem programskog paketa R 4.3.1. (R Core Team, 2023) [124].

U analizama su korišteni sljedeći paketi: *Tidyverse* (Wickhametal, 2019) za manipulaciju podataka, *reflexR* (Rajter, 2022) za deskriptivne analize, *rstatix* (Kassambara, 2023) za analize razlika, *flextable* (Gohel&Skintzos, 2023) za izradu tablica te *ggpubr* za izradu grafičkih prikaza [126–130].

Kao osnovni test normaliteta distribucija korišten je Shapiro-Wilk test. U slučajevima odstupanja od normalne distribucije izračunate su zakrivljenost (*skewness*) i spljoštenost (kurtosis) distribucija te su za referentne vrijednosti uzete 3 za spljoštenost i 7 za zakrivljenost prema preporukama Kline (2016, pp72) [125].

Analize podataka napravljene su korištenjem analize varijance koja omogućuje testiranje razlika.

Dva su temeljna razloga za korištenje ovog testa u odnosu na analizu korelacija. Iz pozicije analiza razlika među entitetima (*betweensubjects*), što su u ovom slučaju vrsta žice i pH-vrijednost, ANOVA daje mogućnost testiranja glavnih efekata i interakcija. Iako je to u načelu moguće i korištenjem korelacijskog pristupa, rezultati su primarno ekvivalentni, ali bi prilikom testiranja korelacijama bilo potrebno raditi strože korekcije zbog multiplog testiranja. Drugi razlog je testiranje efekata unutar entiteta (*withinsubjects*) što su u ovom nacrtu vremenske točke. Analizom korelacija ovdje bismo testirali podudarnosti u variranju, ali ne i pomak u aritmetičkoj sredini. Primjerice, ako bismo testirali korelaciju Ti iona za NiTi vrstu žice uz pH 5,5 u vremenskoj točki 3 i 7 dana, korelacija od npr. 0,600 bi nam govorila da onaj uzorak koji je u prvom mjerenju otpuštao najviše iona u točki 3 dana otpušta najviše iona i u točki 7 dana, ali ne bismo imali informaciju o tome koliki je pomak u aritmetičkoj sredini.

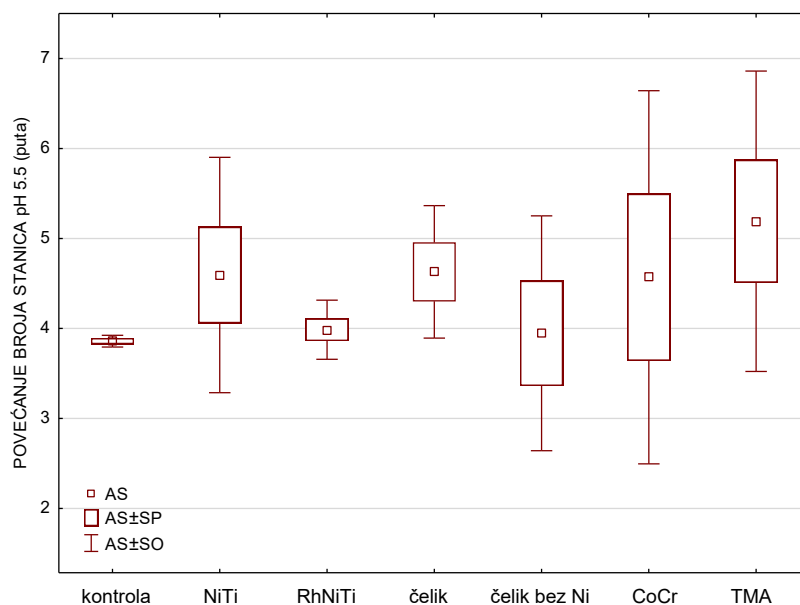
Drugim riječima, temeljem vrste nacrta, kako se radi o kategorijalnim nezavisnim varijablama te o mjernim zavisnim varijablama s ponovljenim mjerenjima, pristup analize varijance ima prednost nad korelacijskim zbog informativnosti i primjerenosti u analizi ponovljenih mjerenja.

4. REZULTATI

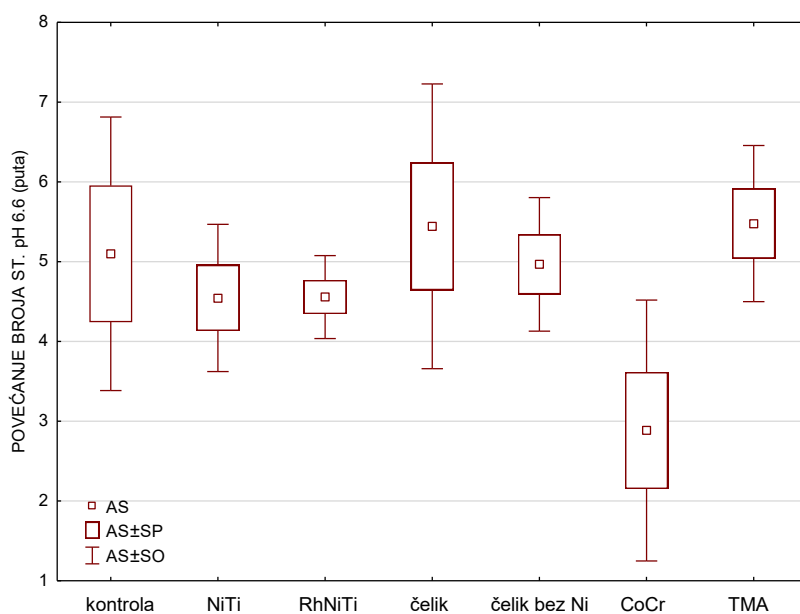
4.1. Biološki učinak

4.1.1. Vijabilnost kvasca

Rezultati određivanja povećanja broja stanica poraslih na mediju s eluiranim metalnim ionima prikazani su sl. 1. pri a) pH 5,5 i b) pH 6,6. Iako su rezultati statistički ispitani, nema statistički značajnih promjena u porastu broja stanica među uzorcima, niti se zamjećuje značajna razlika kod promjene pH (Kruskal-Wallis test višestruke usporedbe).



a)

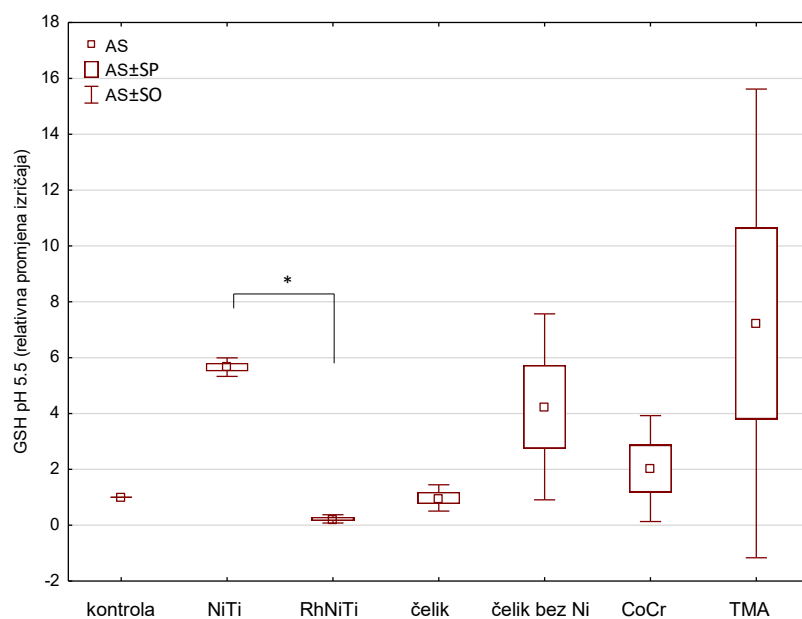


b)

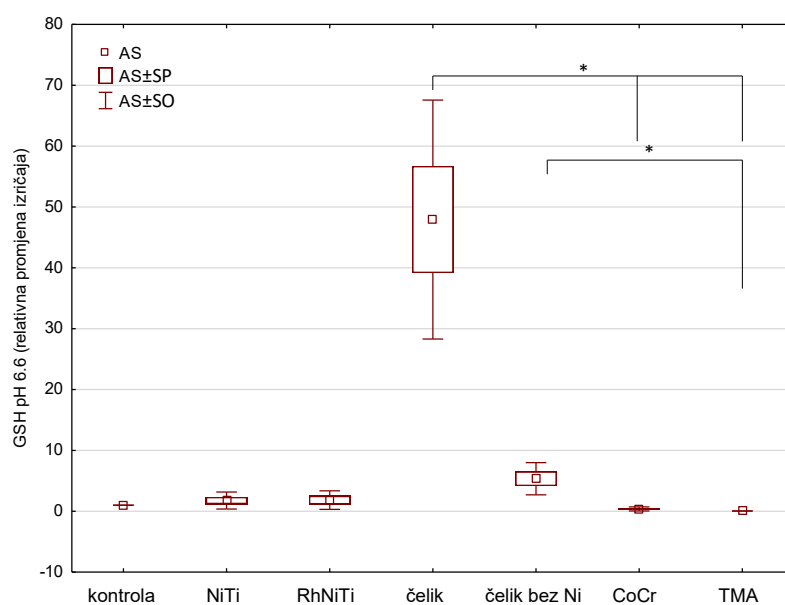
Slika 1. Povećanje broja stanica pri a) pH 5,5 i b) pH 6,6. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (AS), aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška ($AS \pm SP$) te aritmetička sredina i standardno odstupanje ($AS \pm SO$).

4.1.2. Rezultati ekspresije gena stresnog odgovora kvasca

Na sl. 2. prikazani su rezultati analize ekspresije glutathion sintetaze pri a) pH 5,5, odnosno b) pH 6,6 potaknute eluiranim metalnim ionima iz eksperimentalnih žica (NiTi, RhNiTi, čeličnih, čeličnih bez nikla, CoCr te TMA). Rezultati su izraženi kao relativna promjena izričaja tog enzima prema kontroli, izračunata $\Delta\Delta CT$ metodom, prema Livaku. Statistička značajnost provjerena je Kruskal-Wallis testom višestruke usporedbe ($p < 0,05$), a statistički značajna razlika među testiranim žicama naznačena *.



a)



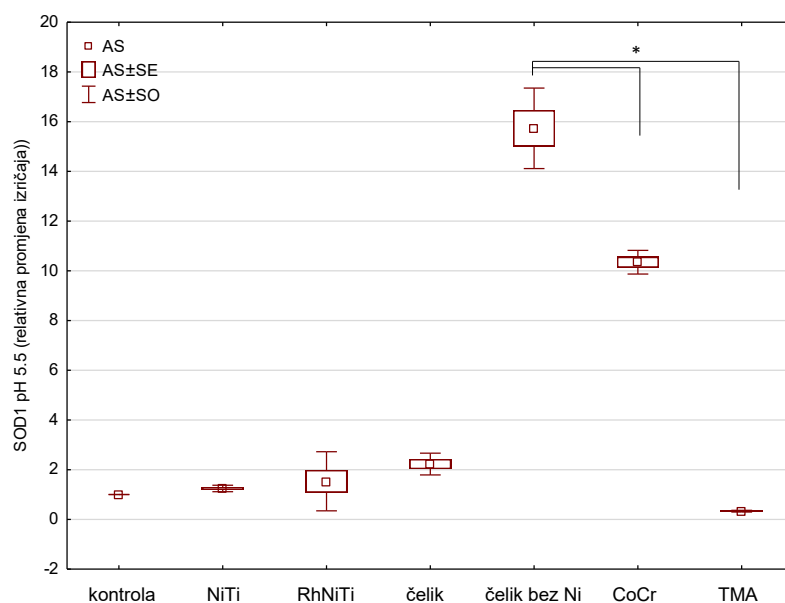
b)

Slika 2. Relativna promjena izričaja glutation sintetaze (GSH) pri a) pH 5,5 i b) pH 6,6. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (AS), aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška ($AS \pm SP$) te aritmetička sredina i standardno odstupanje ($AS \pm SO$). * Statistički značajna razlika među naznačenim uzorcima (Kruskal-Wallis test višestruke usporedbe ($p < 0,05$)).

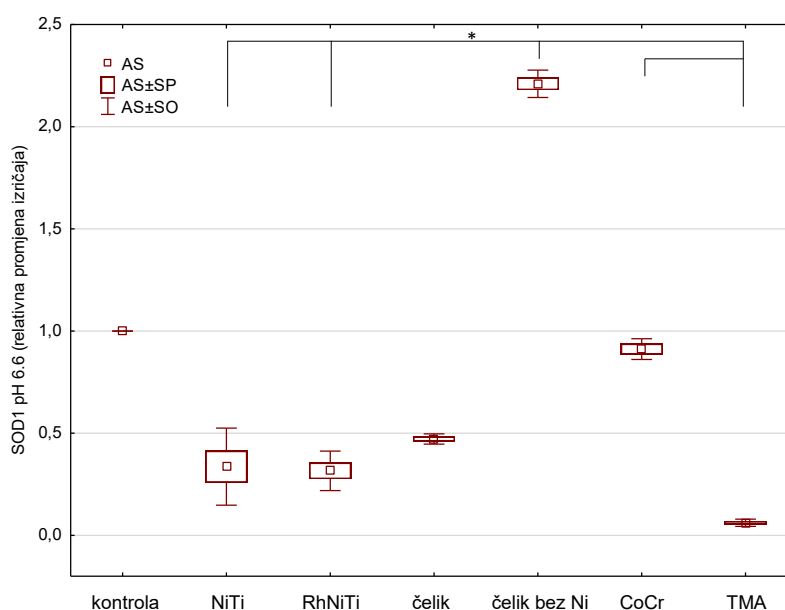
Podaci prikazani na sl. 2. ukazuju na to da različite vrste žica izazivaju varijabilnu ekspresiju GSH u zavisnosti od pH-vrijednosti. Isto tako, ista vrsta žice pokazuje različite obrasce ekspresije GSH pri različitim pH uvjetima. Naprimjer, TMA žica najviše eksprimira GSH pri pH 5,5, dok pri pH 6,6 pokazuje najveću supresiju.

Titanij u kombinaciji s niklom (NiTi), pri pH 5,5 inducira ekspresiju GSH gotovo šest puta više u odnosu na kontrolu, dok je pri pH 6,6 taj efekt smanjen na samo 1,8 puta veću ekspresiju u odnosu na kontrolu. Međutim, kada je nikal presvučen rodijem (RhNiTi), pri pH 6,6 ekspresija GSH je veća nego u kontroli, dok pri pH 5,5 dolazi do smanjenja (0,2 puta u odnosu na kontrolu, što je gotovo 30 puta manje u odnosu na uzorak bez rodijeve prevlake). Čelične žice pokazuju ekspresiju GSH na nivou kontrolne grupe pri pH 5,5, dok je pri pH 6,6 ekspresija GSH značajno povećana i najveća među svim testiranim žicama. Čelične žice bez nikla imaju sličnu ekspresiju GSH kod oba pH (4,2 naprama 5,3) ukazujući da mogući uzrok povećanja ekspresije tog enzima nije u udjelu iona Ni.

Na sl. 3. prikazani su rezultati analize ekspresije superoksid dismutaze 1 pri a) pH 5,5, odnosno b) pH 6,6 potaknute eluiranim metalnim ionima iz eksperimentalnih žica (NiTi, RhNiTi, čeličnih, čeličnih bez nikla, CoCr te TMA). Rezultati su izraženi kao relativna promjena izričaja tog enzima prema kontroli, izračunata $\Delta\Delta CT$ metodom, prema Livaku. Statistička značajnost provjerena je Kruskal-Wallis testom višestruke usporedbe ($p < 0,05$), a statistički značajna razlika među testiranim žicama naznačena *.



a)

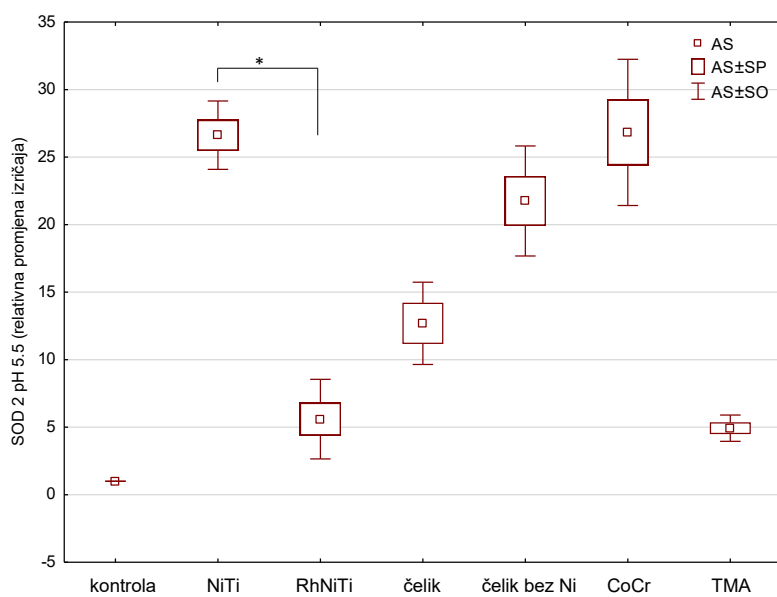


b)

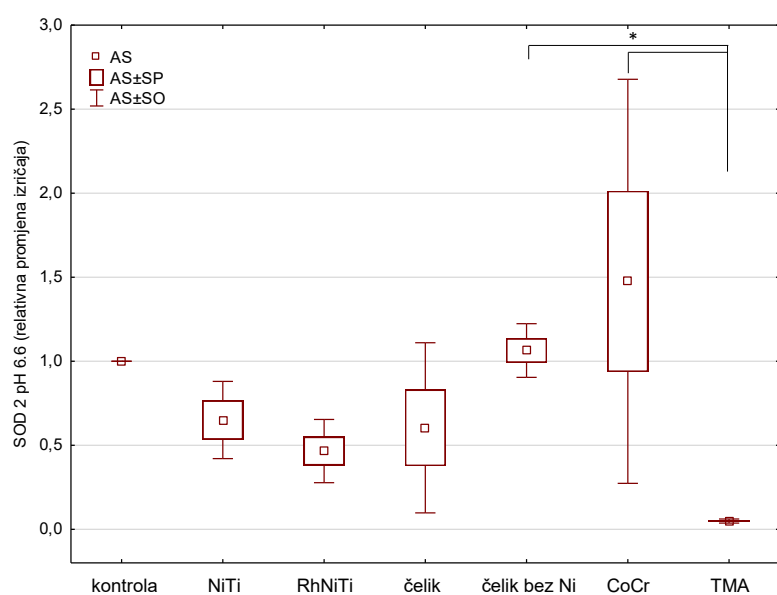
Slika 3. Relativna promjena izričaja superoksid dismutaze 1 pri a) pH 5,5 i b) pH 6,6. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (AS), aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška (AS $\pm$ SP) te aritmetička sredina i standardno odstupanje (AS $\pm$ SO). * Statistički značajna razlika među naznačenim uzorcima (Kruskal-Wallis test višestruke usporedbe ($p < 0,05$)).

Podaci prikazani na sl. 3. ukazuju da metalni ioni otpušteni pri pH 5,5 značajno više induciraju ekspresiju SOD1 od onih pri pH 6,6. Kod oba pH, najveća je ekspresija kod čelične žice bez nikla, iako se radi o sedam puta većoj ekspresiji tog enzima kod pH 5,5, u odnosu na pH 6,6. Slično je i s CoCr žicom, gdje je ukupna ekspresija niža nego kod čelične žice bez nikla, ali je ekspresija čak i 11 puta veća kod pH 5,5 u odnosu na pH 6,6. Kod svih ostalih žica kod pH 6,6 ekspresija SOD1 je utišana.

Na sl. 4. prikazani su rezultati analize ekspresije superoksid dismutaze 2 pri a) pH 5,5, odnosno b) pH 6,6 potaknute eluiranim metalnim ionima iz eksperimentalnih žica (NiTi, RhNiTi, čeličnih, čeličnih bez nikla, CoCr te TMA). Rezultati su izraženi kao relativna promjena izričaja tog enzima prema kontroli, izračunata $\Delta\Delta CT$ metodom, prema Livaku. Statistička značajnost provjerena je Kruskal-Wallis testom višestruke usporedbe ($p < 0,05$), a statistički značajna razlika među testiranim žicama naznačena *.



a)



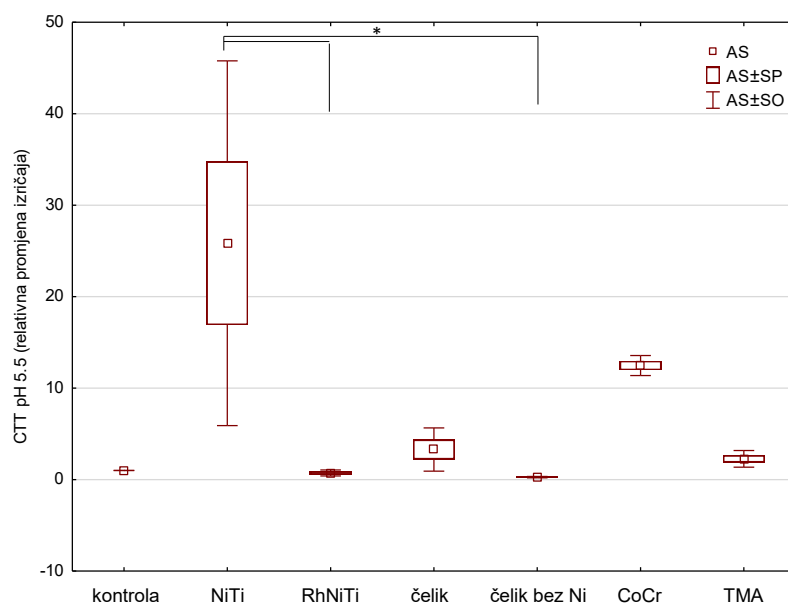
b)

Slika 4. Relativna promjena izričaja superoksid dismutaze 2 pri a) pH 5,5 i b) pH 6,6. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (AS), aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška ($AS \pm SP$) te aritmetička sredina i standardno odstupanje ($AS \pm SO$). * Statistički značajna razlika među naznačenim uzorcima (Kruskal-Wallis test višestruke usporedbe ($p < 0,05$)).

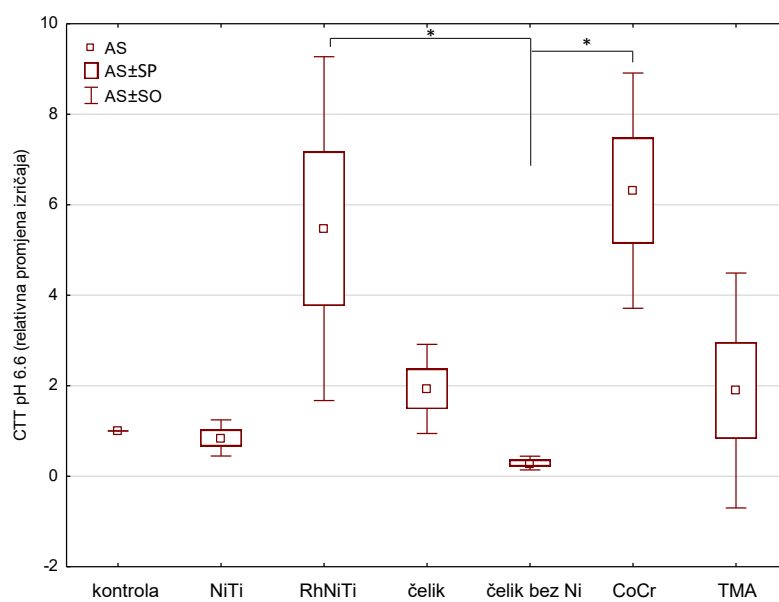
Vrlo slično kao i kod SOD1, i kod SOD2 metalni ioni otpušteni pri pH 5,5 izazivaju puno jači genski odgovor (sl. 4.). Kod svih je vrsta žica ekspresija SOD2 značajno povećana pri pH 5,5, s najvećim i gotovo jednakim vrijednostima kod NiTi i CoCr žice (gotovo 27 puta više u odnosu na kontrolu). Prevlaka rodija je značajno (više od 5 puta) smanjila ekspresiju tog enzima, a slično je dobiveno i za TMA u odnosu na CoCr žicu.

Kod pH 6,6 samo je kod CoCr žice vrijednost viša od kontrole, ali je kod TMA gotovo u potpunosti utišana.

Na sl. 5. prikazani su rezultati analize ekspresije katalaze pri a) pH 5,5, odnosno b) pH 6,6 potaknute eluiranim metalnim ionima iz eksperimentalnih žica (NiTi, RhNiTi, čeličnih, čeličnih bez nikla, CoCr te TMA). Rezultati su izraženi kao relativna promjena izričaja tog enzima prema kontroli, izračunata $\Delta\Delta CT$ metodom, prema Livaku. Statistička značajnost provjerena je Kruskal-Wallis testom višestruke usporedbe ($p < 0,05$), a statistički značajna razlika među testiranim žicama naznačena *.



a)



b)

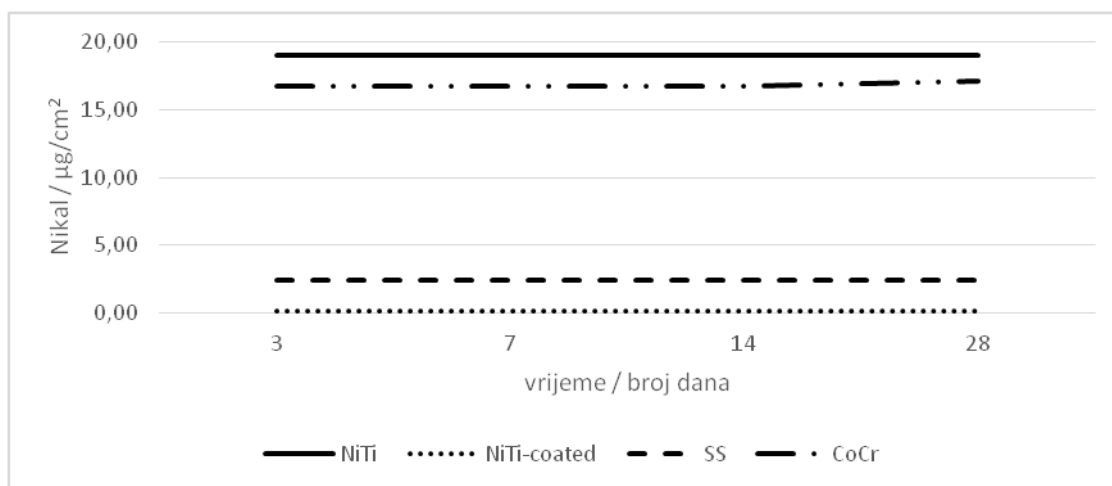
Slika 5. Relativna promjena izričaja katalaze pri a) pH 5,5 i b) pH 6,6. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (AS), aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška (AS $\pm$ SP) te aritmetička sredina i standardno odstupanje (AS $\pm$ SO). * Statistički značajna razlika među naznačenim uzorcima (Kruskal-Wallis test višestruke usporedbe ($p < 0,05$)).

Iz podataka prikazanih sl. 5. može se primijetiti da jedino kod ovog enzima (katalaze) ima za veći broj eksperimentalnih žica više značajnih povećanja ekspresije pri pH 6,6 (gotovo jednako kao i pri pH 5,5, iako s različitim intenzitetom ekspresije). Zanimljivo je da je rodijem presvučena žica izazvala veću ekspresiju CTT u odnosu na nepresvučenu inačicu. Ioni iz CoCr su općenito kod pH 6,6 izazvali najveću ekspresiju tog enzima (šest puta u odnosu na kontrolu). Pri pH 5,5 ioni iz CoCr su još i više ekspimirali taj enzim (12,5 puta u odnosu na kontrolu). Najveću ekspresiju CTT-a kod pH 5,5 izazvali su ioni iz NiTi žice (gotovo 26 puta više u odnosu na kontrolu).

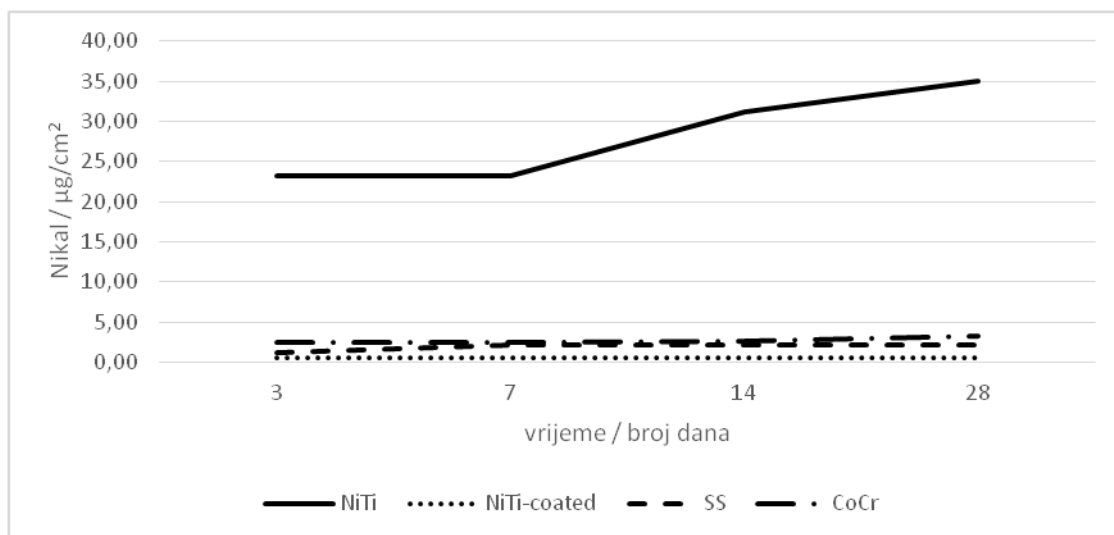
4.2. Mjerenja induktivno spregnutom plazmom (ICP)

4.2.1. Mjerenja induktivno spregnutom plazmom (ICP) u umjetnoj slini

Rezultati za oslobađanje nikla prikazani su na sl. 6. i 7. Pri nižem pH, najviše nikla je otpušteno iz NiTi i CoCr, dok je pri pH 6,6, ponovno, najviše nikla otpušteno iz NiTi, dok su ostale slitine pokazale minimalno otpuštanje. Vrijedi napomenuti da je pri pH 5,5 oslobađanje iona bilo najveće u prvoj vremenskoj točki, a kasnije je bilo minimalno ili ispod detekcije za sve slitine, pa je ustvari izmjerena količina rezultat otpuštanja upravo u prva 3 dana. Pri pH 6,6 bilježi se početno povećano oslobađanje, koje se ponovno povećalo nakon 14 dana uranjanja kod NiTi. Više nikla oslobođeno je pri pH 6,6, vjerojatno zbog korozije pukotina uzrokovane površinskim nepravilnostima. Tamo gdje nije bilo varijabilnosti između vremenskih točaka, daljnje statističke analize nisu mogle biti provedene za sve promatrane slitine.

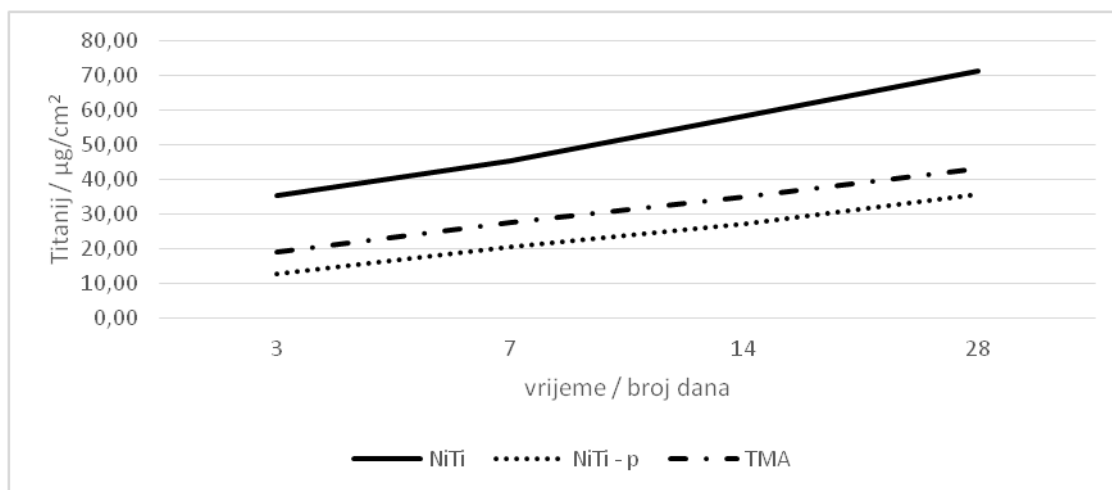


Slika 6. Otpuštanje nikla iz analiziranih uzoraka pri pH 5,5.

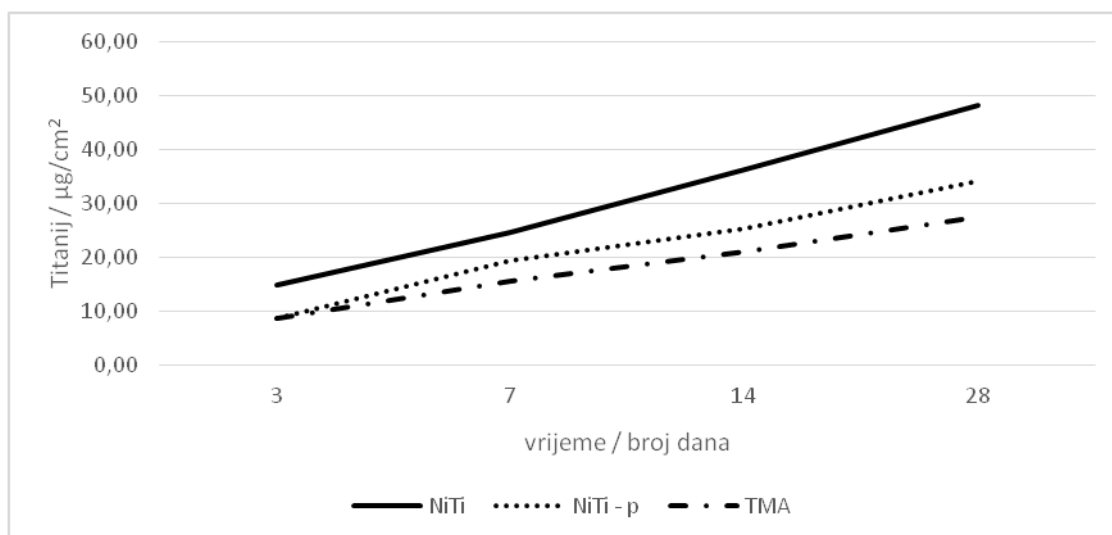


Slika 7. Otpuštanje nikla iz analiziranih uzoraka pri pH 6,6.

Sl. 8. i 9. prikazuju oslobađanje titanija iz promatranih slitina pri oba pH. Najveće otpuštanje zabilježeno je za NiTi u obje pH-vrijednosti; TMA je imao drugo najveće otpuštanje pri pH 5,5, dok je pri pH 6,6 to bila slitina NiTi s premazom. Titanij je pokazao povećano otpuštanje tijekom vremena u obje pH-vrijednosti. Analiza glavnih učinaka analizom varijanci za NiTi i slitine NiTi s premazom, u pogledu otpuštanja titanija, pokazala je značajne razlike u svim vremenskim točkama i u oba pH (tablica 3. i sl. 10.).



Slika 8. Otpuštanje titanija iz analiziranih uzoraka pri pH 5,5.

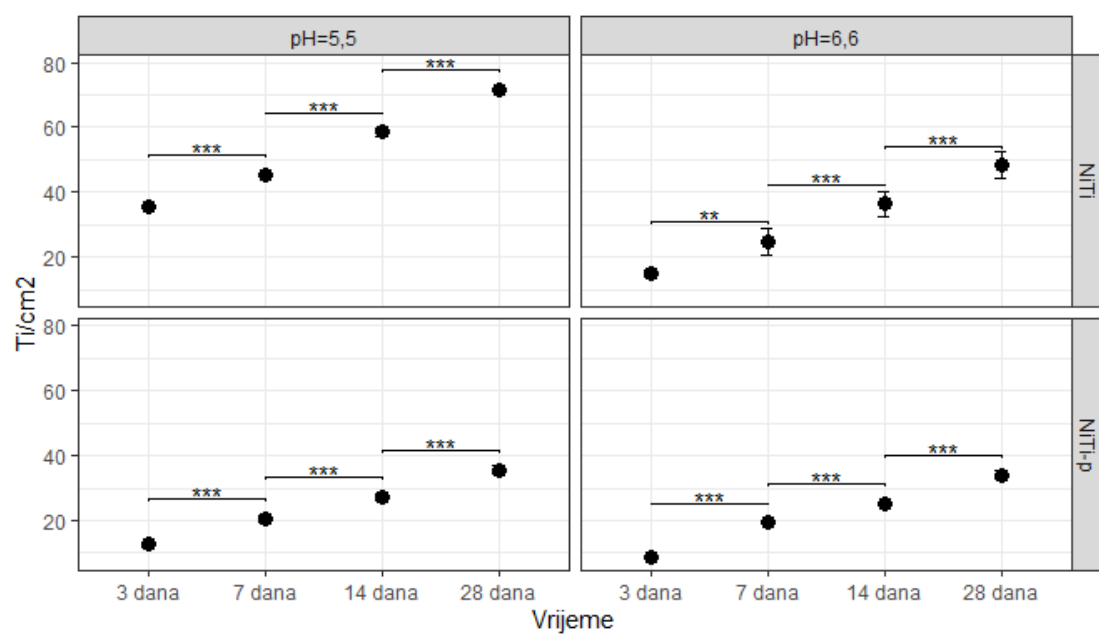


Slika 9. Otpuštanje titanija iz analiziranih uzoraka pri pH 6,6.

Tablica 3. Analiza glavnih učinaka korištenjem analize varijance za ponovljena mjerenja s testiranjem učinaka pH, vrste slitine i vremena (mješovita ANOVA), za titanij oslobođen iz NiTi i NiTi-p slitina

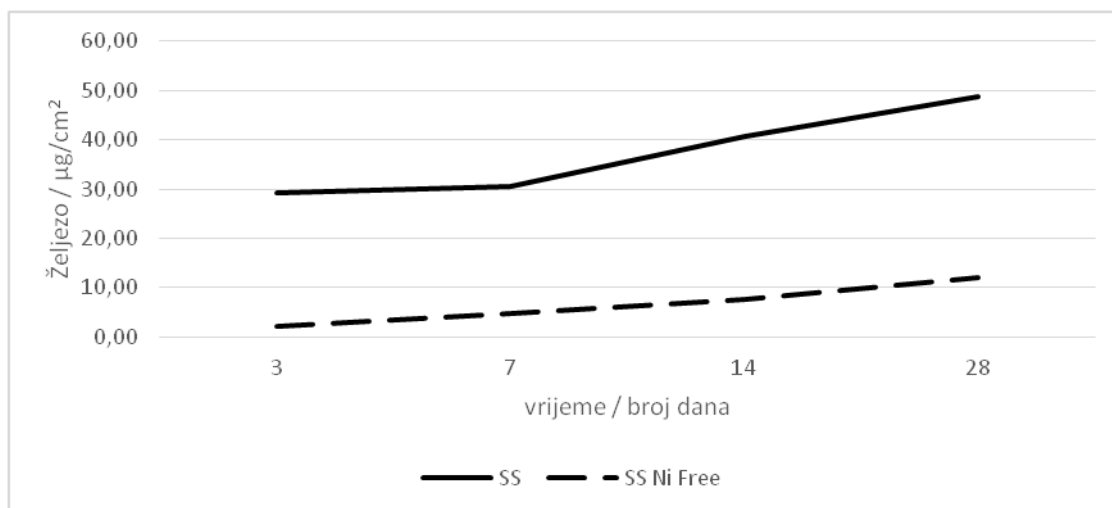
Efekt	DFn ¹	DFd ²	F ³	p ⁴	ges ⁵
Vrsta	1,0	16,00	703,27	0,000	0,967
pH	1,0	16,00	277,97	0,000	0,921
Vrijeme	1,5	23,93	1946,00	0,000	0,975
vrsta:pH	1,0	16,00	188,09	0,000	0,888
vrsta:vrijeme	1,5	23,93	79,59	0,000	0,619
pH:vrijeme	1,5	23,93	1,31	0,280	0,026
vrsta:pH:vrijeme	1,5	23,93	3,79	0,048	0,072

¹Stupnjevi slobode za broj razina; ²Stupnjevi slobode za broj mjerenja; ³F omjer; ⁴p-vrijednost; ⁵Generalizirani eta kvadrat;

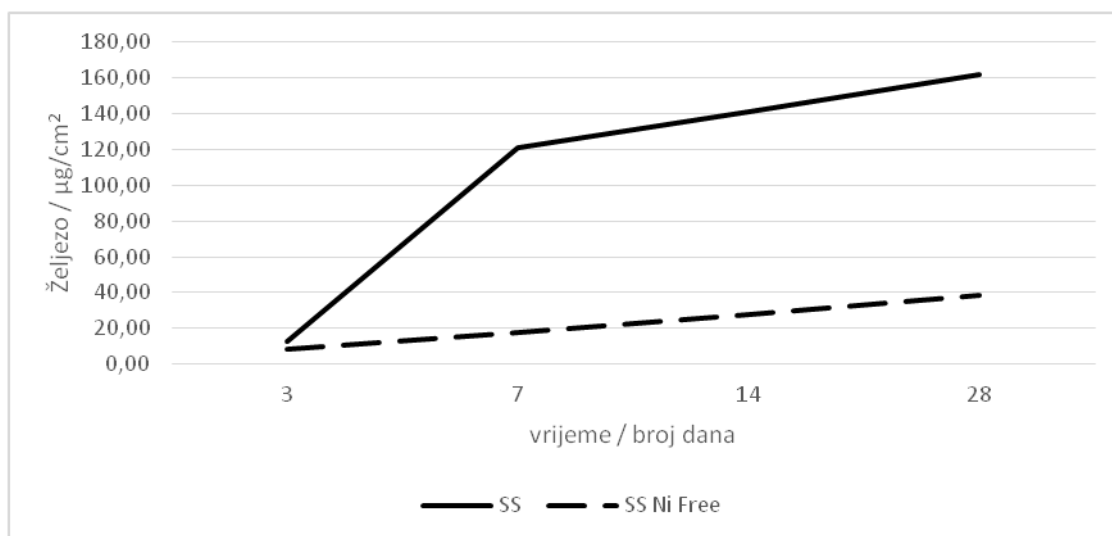


Slika 10. Usporedba otpuštanja titanija iz NiTi i NiTi-p pri pH 5,5 (lijevo) i pH 6,6 (desno) pokazuje značajne razlike za svaku vremensku točku (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$).

Na sl. 11. i 12. prikazano je otpuštanje iona željeza pri oba pH. Slitina SS je otpustila više željeza u oba pH, uspoređeno sa SS bez nikla slitinom, ali samo nakon prvih 7 dana eluiranja. Količine otpuštene pri višem pH su tri puta više nego pri nižem pH. Tablica 4. i sl. 13. pokazuju da su svi glavni efekti interakcije za SS i SS bez nikla slitine statistički značajni (mješovita ANOVA).



Slika 11. Otpuštanje željeza iz analiziranih uzoraka pri pH 5,5.

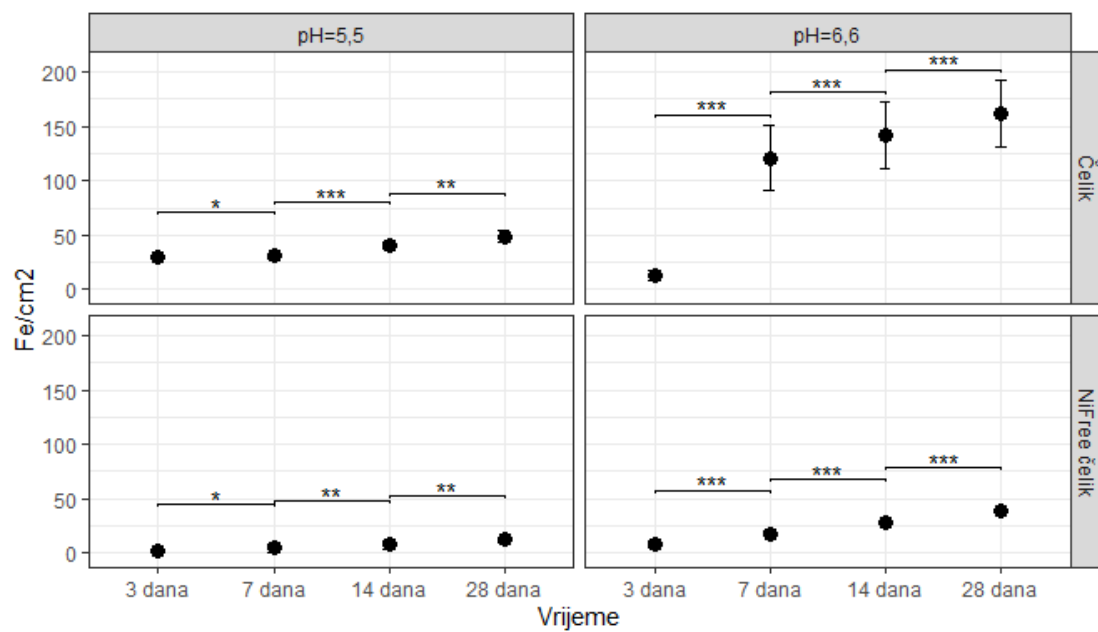


Slika 12. Otpuštanje željeza iz analiziranih uzoraka pri pH 6,6.

Tablica 4. Analiza glavnih efekata za SS i SS bez nikla slitine

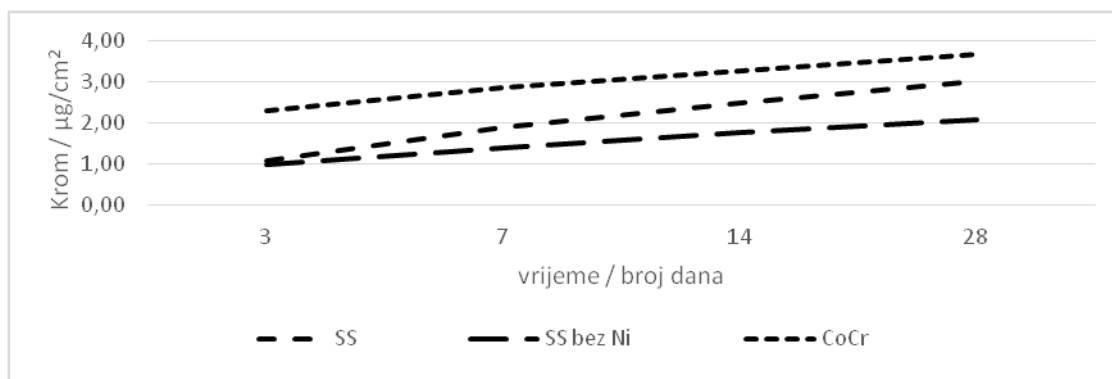
Efekt	DFn ¹	DFd ²	F ³	p ⁴	ges ⁵
Vrsta	1,00	16,00	116,44	0,000	0,852
pH	1,00	16,00	66,34	0,000	0,767
Vrijeme	1,04	16,72	198,19	0,000	0,720
vrsta:pH	1,00	16,00	26,27	0,000	0,566
vrsta:vrijeme	1,04	16,72	83,05	0,000	0,518
pH:vrijeme	1,04	16,72	111,83	0,000	0,592
vrsta:pH:vrijeme	1,04	16,72	66,41	0,000	0,462

¹Stupnjevi slobode za broj razina; ²Stupnjevi slobode za broj mjerjenja; ³F omjer; ⁴p-vrijednost; ⁵Generalizirani eta kvadrat;

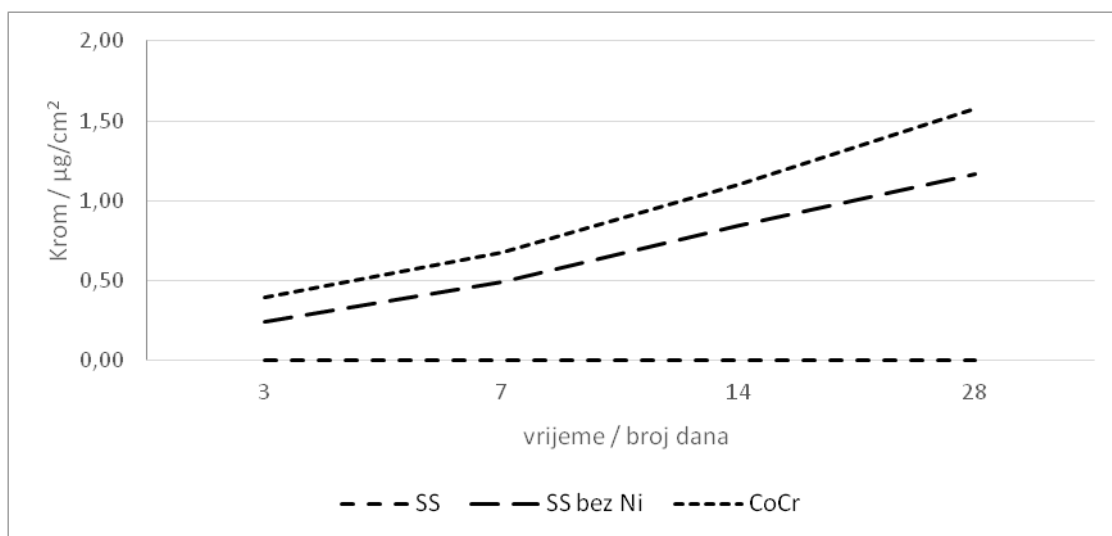


Slika 13. Usporedba željeza oslobođenog iz SS i SS bez nikla slitina za svaku vremensku točku pri pH 5,5 (lijevo) i pH 6,6 (desno) pokazuje značajne razlike (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$).

Sl. 14. i 15. pokazuju otpuštanje kroma iz testiranih materijala pri pH umjetne sline 5,5 i 6,6. Pri nižem pH, krom se otpušta u količinama prema sljedećem redoslijedu: CoCr < SS < SS bez nikla slitine. Tablica 5. i sl. 16. pokazuju da su svi glavni efekti za SS i SS bez nikla slitine značajni, za vrstu slitine, pH umjetne sline i vrijeme uranjanja.



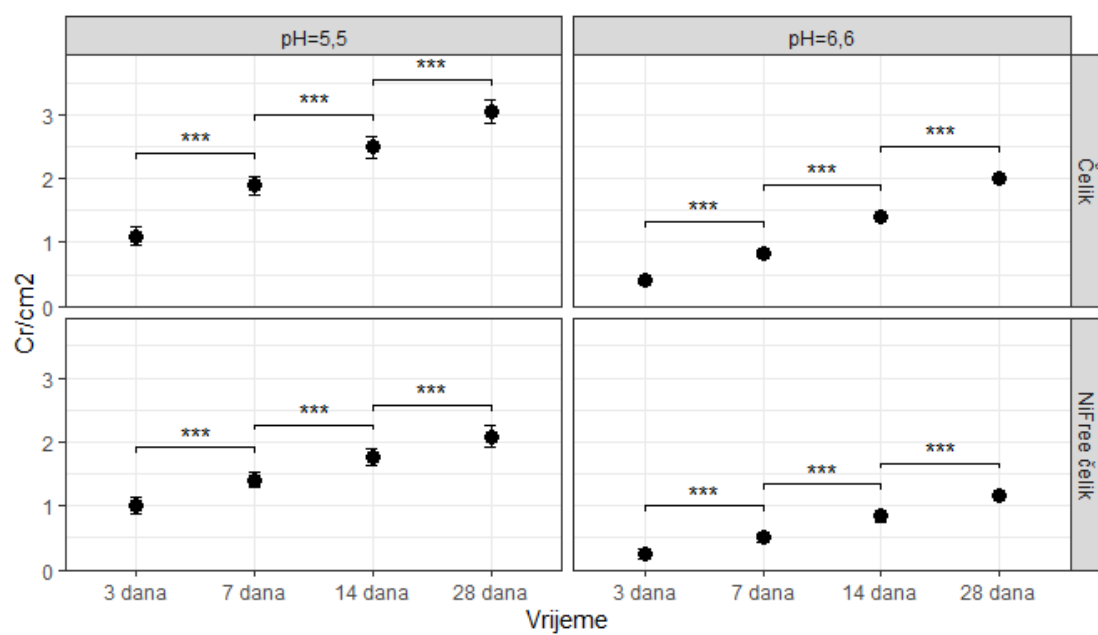
Slika 14. Otpuštanje kroma iz analiziranih uzoraka pri pH 5,5.



Slika 15. Otpuštanje kroma iz analiziranih uzoraka pri pH 6,6.

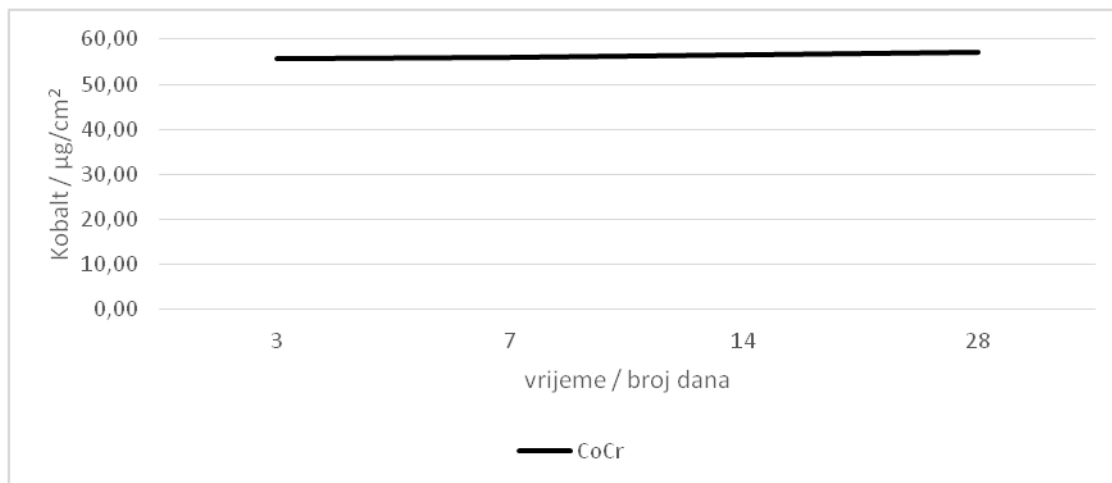
Tablica 5. Analiza glavnih efekata za SS i SS bez nikla slitine

Efekt	DFn ¹	DFd ²	F ³	p ⁴	ges ⁵
Vrsta	1,00	16,00	105,94	0,000	0,864
pH	1,00	16,00	338,63	0,000	0,953
Vrijeme	1,78	28,46	10382,57	0,000	0,962
vrsta:pH	1,00	16,00	0,91	0,355	0,052
vrsta:vrijeme	1,78	28,46	783,81	0,000	0,657
pH:vrijeme	1,78	28,46	123,36	0,000	0,232
vrsta:pH:vrijeme	1,78	28,46	18,75	0,000	0,044
¹ Stupnjevi slobode za broj razina; ² Stupnjevi slobode za broj mjerjenja; ³ F omjer; ⁴ p-vrijednost; ⁵ Generalizirani eta kvadrat;					

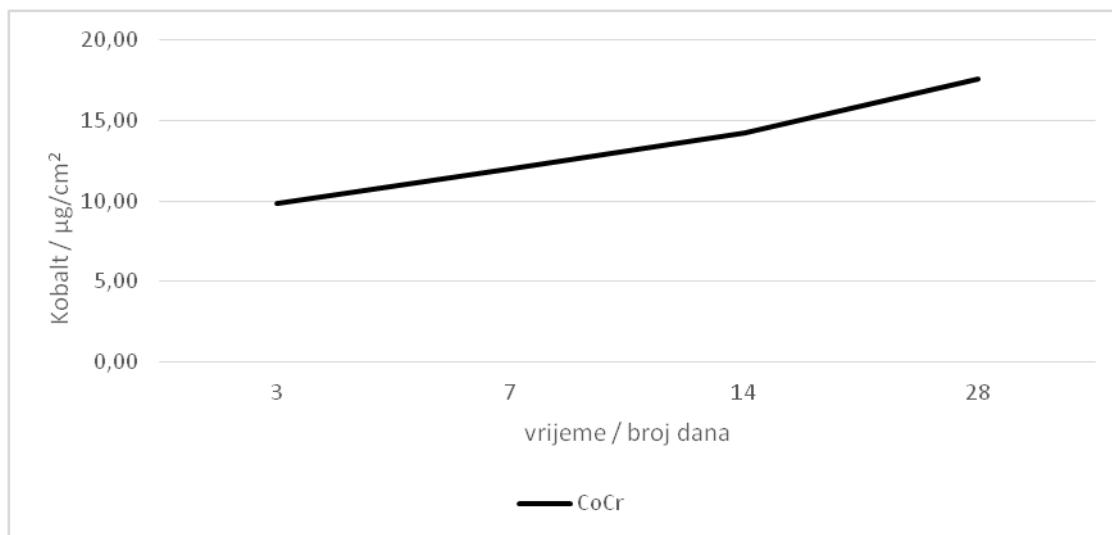


Slika 16. Usporedba kroma oslobođenog iz SS i SS bez nikla slitina za svaku vremensku točku pri pH 5,5 (lijevo) i pH 6,6 (desno) pokazuje značajnu razliku (** $p < 0,001$).

Sl. 17. i 18. pokazuju otpuštanje kobalta iz promatranih uzoraka pri pH 5,5 i 6,6. Kobalt se otpušta jedino iz CoCr slitine i oko 4 puta više pri nižem pH umjetne sline, najviše nakon tri dana. Daljnje statističke usporedbe nisu moguće.

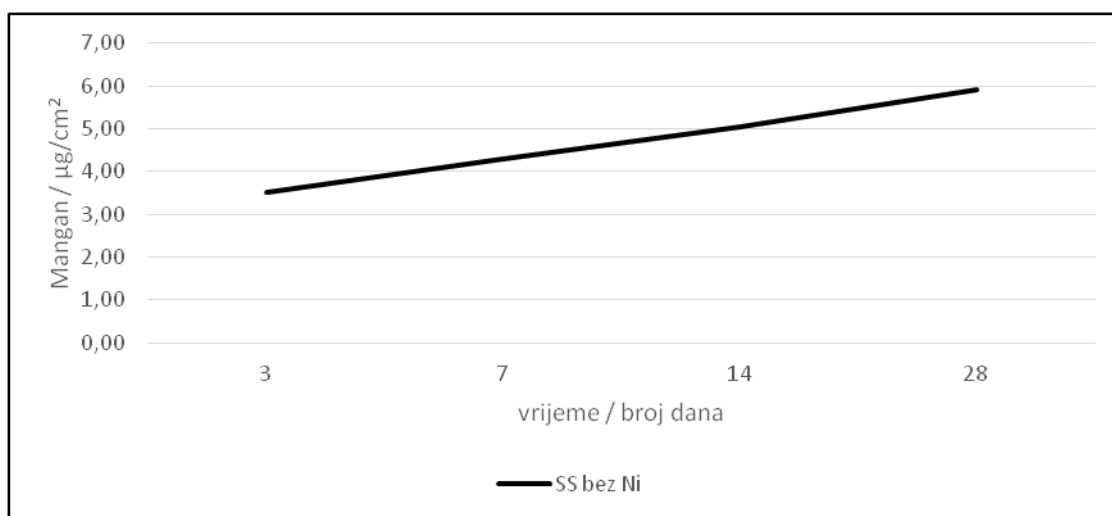


Slika 17. Otpuštanje kobalta iz analiziranih uzoraka pri pH 5,5.

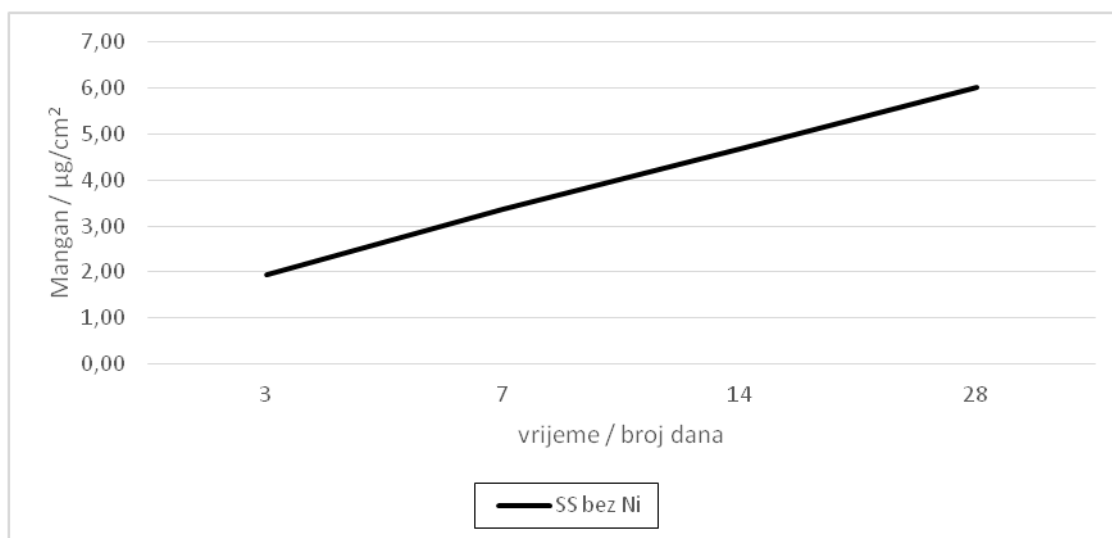


Slika 18. Otpuštanje kobalta iz analiziranih uzoraka pri pH 6,6.

Sl. 19. i 20. pokazuju otpuštanje mangana iz promatranih uzoraka pri pH umjetne sline 5,5 i 6,6. Zabilježene vrijednosti su općenito niske, i kumulativni učinak je sličan pri oba pH, razlike nisu statistički značajne.

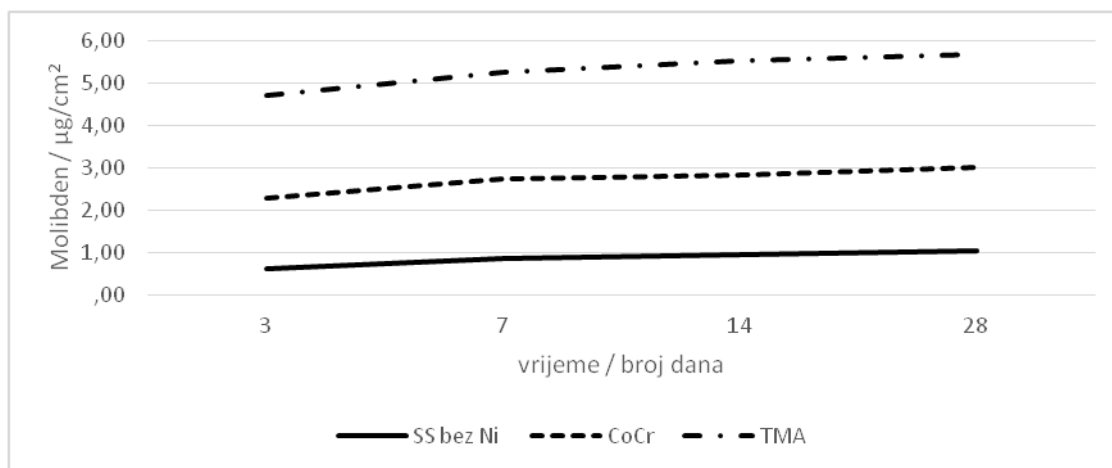


Slika 19. Otpuštanje mangana iz analiziranih uzoraka pri pH 5,5.

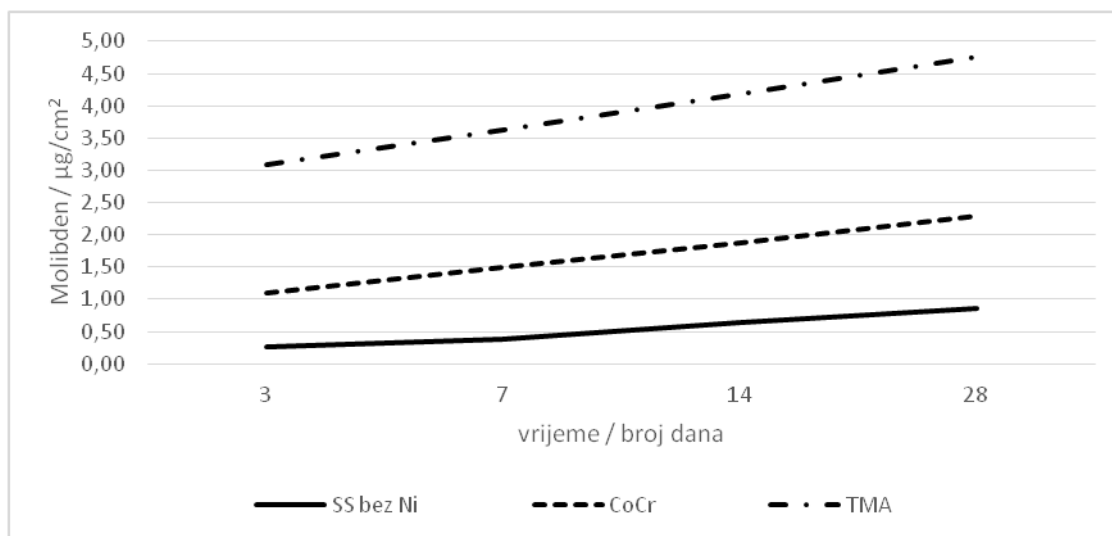


Slika 20. Otpuštanje mangana iz analiziranih uzoraka pri pH 6,6.

Sl. 21. i 22. pokazuju otpuštanje molibdena iz promatranih slitina pri pH umjetne sline 5,5 i 6,6. Pri nižem pH, otpuštanje je kako slijedi: TMA > CoCr > SS bez nikla slitine. Općenito, ukupno otpuštanje molibdena je bilo nisko. Tablica 6. i sl. 23. pokazuju da su svi glavni efekti bili značajni, ponajviše vrsta slitine, pH i vrijeme, analizom varijanci.



Slika 21. Otpuštanje molibdena iz analiziranih uzoraka pri pH 5,5.

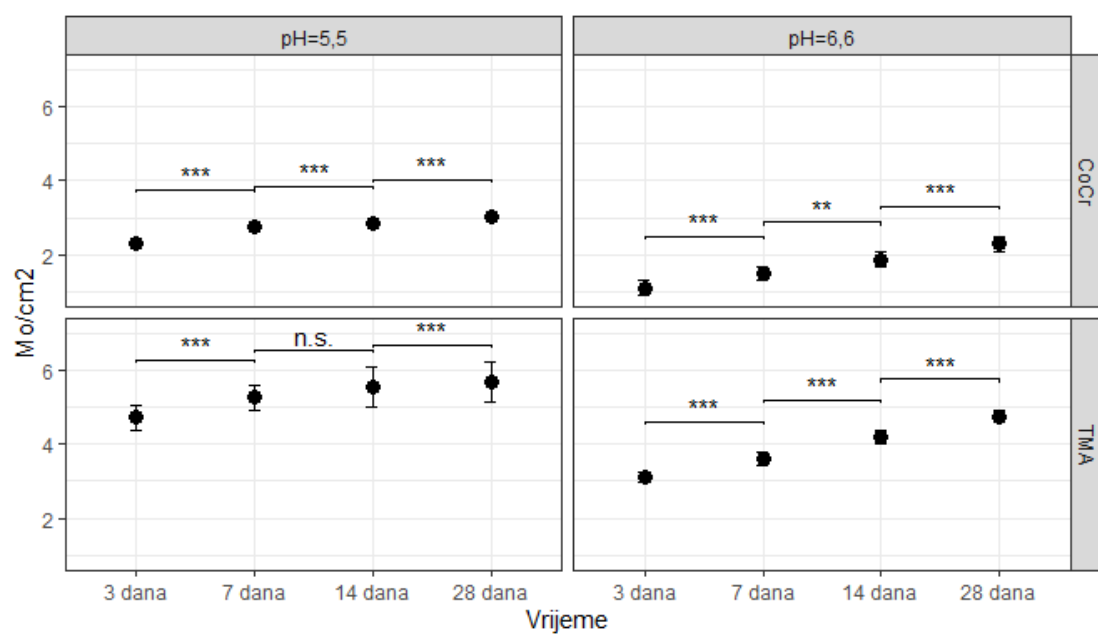


Slika 22. Otpuštanje molibdena iz analiziranih uzoraka pri pH 6,6.

Tablica 6. Analiza glavnih učinaka pomoću analize varijance za ponovljena mjerenja za ispitivanje učinaka pH, vrste slitine i vremena (mješovita ANOVA) za oslobođeni molibden iz CoCr i TMA slitina

Efekt	DFn ¹	DFd ²	F ³	p ⁴	ges ⁵
Vrsta	1,00	16,0	448,72	0,000	0,963
pH	1,00	16,0	115,28	0,000	0,869
Vrijeme	1,07	17,2	656,49	0,000	0,760
vrsta:pH	1,00	16,0	2,30	0,149	0,117
vrsta:vrijeme	1,07	17,2	18,04	0,000	0,080
pH:vrijeme	1,07	17,2	58,63	0,000	0,221
vrsta:pH:vrijeme	1,07	17,2	2,11	0,164	0,010

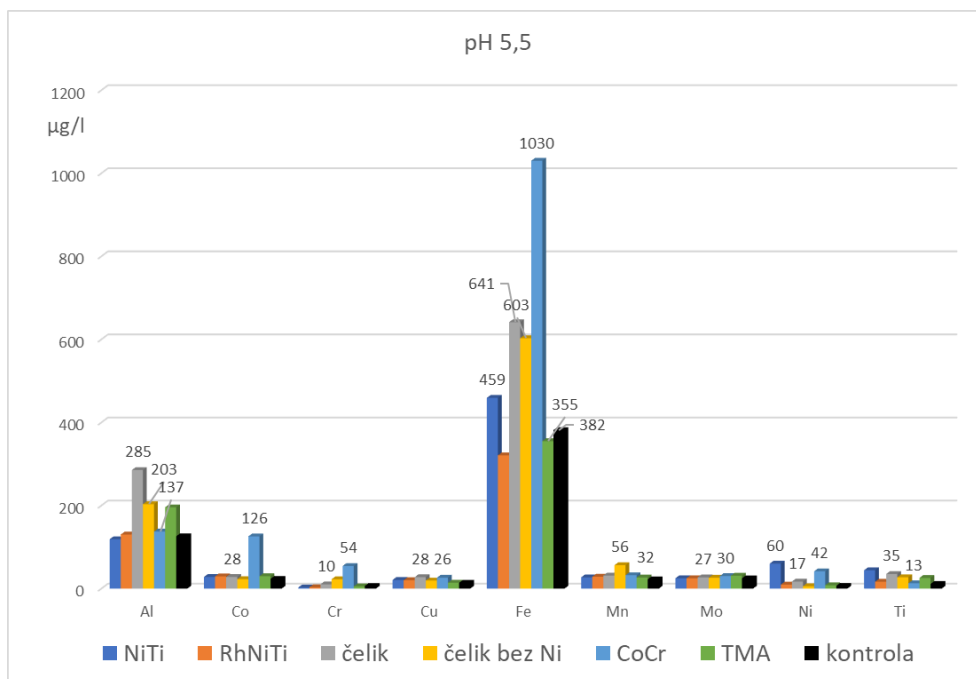
¹Stupnjevi slobode za broj razina; ²Stupnjevi slobode za broj mjerenja; ³F omjer; ⁴p-vrijednost; ⁵Generalizirani eta kvadrat;



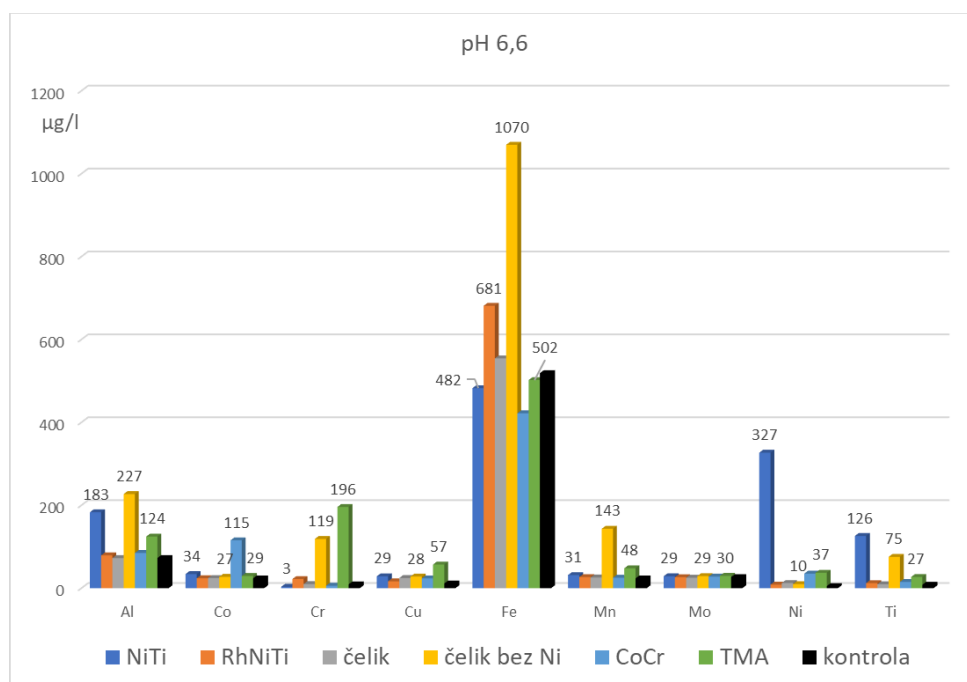
Slika 23. Usporedba molibdena oslobođenog iz CoCr i TMA slitina za svaku vremensku točku pri pH 5,5 (lijevo) i pH 6,6 (desno) uz pokazane razlike (n.s. (engl. *not significant*), nije značajno; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) u svakoj vremenskoj točki.

4.2.2. Mjerenja induktivno spregnutom plazmom (ICP) na kvaščevoj podlozi

Za potrebe ispitivanja biološkog učinka eluiranih metalnih iona i uzgoja kvasca, pripremani su slični eluati na kvaščevoj podlozi kao i na umjetnoj slini kao mediju. U pokusima su korištene iste vrste žica i količina medija te isti eksperimentalni uvjeti eluiranja. Jedino su u tim pokusima korišteni samo eluati od 28 dana. Rezultati ICP-MS analiza na kvaščevoj podlozi prikazani su na sl. 24 a) pri pH 5,5 i b) pri pH 6,6. Količine eluiranih metalnih iona izražene su masenom koncentracijom ($\mu\text{g/l}$).



a)



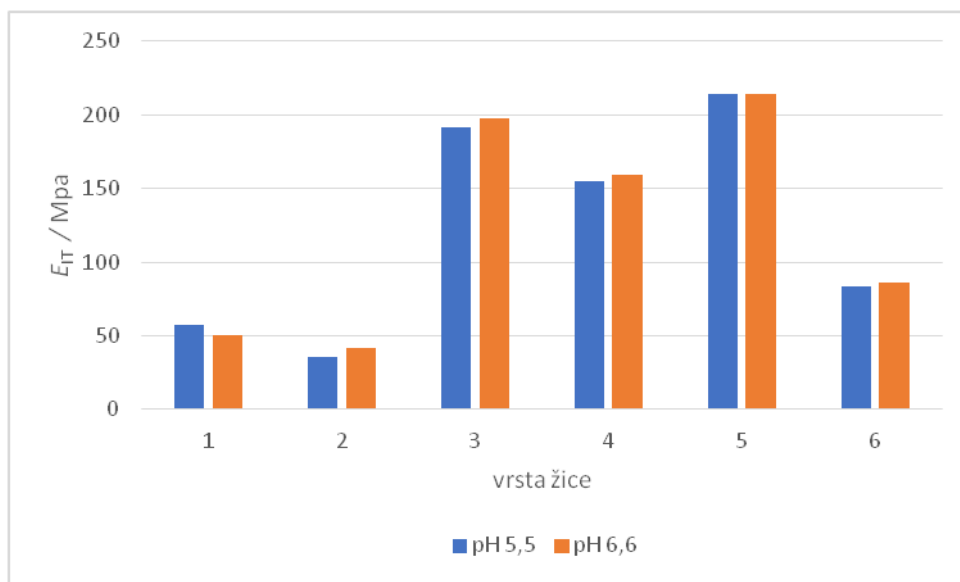
b)

Slika 24. Otpuštanja najzastupljenijih iona metala nakon eluiranja od 28 dana u kvašćevu podlogu kao medij, određeni ICP-MS metodom, a) pri pH 5,5 i b) pri pH 6,6.

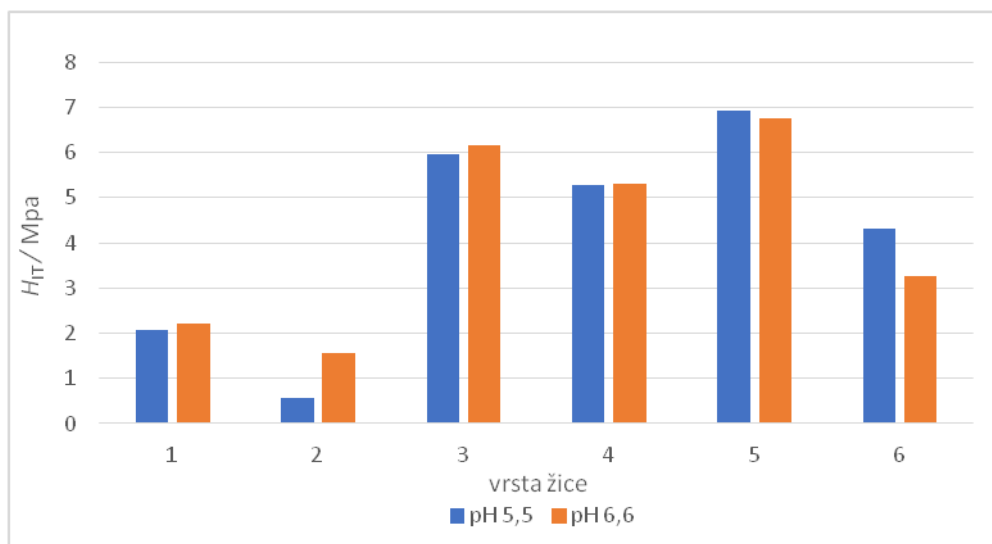
Na kvašćevoj podlozi, pri oba pH (5,5 i 6,6), oslobađa se najviše iona željeza. Pri pH 5,5 uz čelične i čelične žice bez nikla (što je očekivano), znatne količine Fe izlučuju se iz CoCr slitine (u kojoj nisu deklarirane i ne očekuju se). Iz te se slitine otpuštaju i najveće količine Co i Cr. U čeličnoj žici bez nikla zabilježena je najviša količina Al i Mn. TMA žica pri pH 6,6 otpušta najveće količine iona Cr i Cu. Najviše se iona Ni i Ti otpušta iz NiTi žice, i to gotovo peterostruko više pri pH 6,6 nego pri pH 5,5. Slično je zabilježeno za umjetnu slinu kao medij, ali su količine otpuštene u kvašćevu podlogu znatno više nego u umjetnu slinu. Rodijem i zlatom presvučene inačice NiTi ne otpuštaju znatne količine iona. Općenito je profil otpuštanja u podlogu kao medij drugačiji nego kod umjetne sline, ali su isto tako u pojedinim vrstama žica detektirani metalni ioni koji nisu niti deklarirani, niti očekivani (poput Al i Cu u gotovo svim uzorcima te Fe u CoCr žici).

4.3. Promjene mehaničkih svojstava

Na sl. 25. i 26. prikazani su rezultati ispitivanja mehaničkih svojstava ispitivanih žica nakon uranjanja u umjetnu slinu pH 5,5 i pH 6,6.



Slika 25. Grafički prikaz vrijednosti Youngovog modula elastičnosti (E_{IT}) izmjerenih nanoindentacijom (MPa – megapaskal; 1 – NiTi, 2 – NiTi-p, 3 – SS, 4 – SS bez nikla, 5 – CoCr, 6 – TMA).



Slika 26. Grafički prikaz vrijednosti tvrdoće (H_{IT}) izmjerenih nanoindentacijom (MPa – megapaskal; 1 – NiTi, 2 – NiTi-p, 3 – SS, 4 – SS bez nikla, 5 – CoCr, 6 – TMA).

Statistička analiza ANOVA je pokazala značajnu promjenu u vrijednostima za tvrdoću i Youngov modul elastičnosti samo za NiTi-p, dok za ostale žice nakon uranjanja 28 dana u umjetnu slinu s različitim pH nije bilo statistički značajan promjene, odnosno različiti pH sline nije utjecao na promjenu mehaničkih svojstava. Rezultati za NiTi žice: nema značajne promjene tvrdoće ($p = 0,976$) i modula elastičnosti ($p = 0,728$). Rezultati za NiTi-p žice: značajna promjena tvrdoće ($p = 0,023$) i modula elastičnosti ($p = 0,008$). Rezultati za SS žice: nema značajne promjene tvrdoće ($p = 0,219$) i modula elastičnosti ($p = 0,167$). Rezultati za SS bez Ni žice: nema značajne promjene tvrdoće ($p = 0,768$) i modula elastičnosti ($p = 0,177$). Rezultati za CoCr žice: nema značajne promjene tvrdoće ($p = 0,551$) i modula elastičnosti ($p = 0,872$). Rezultati za TMA žice: nema značajne promjene tvrdoće ($p = 0,083$) i modula elastičnosti ($p = 0,107$). Nije bilo moguće dokazati korelaciju između otpuštenih iona i promjene mehaničkih svojstava.

4.4. Analiza površine mikroskopom atomskih sila (AFM)

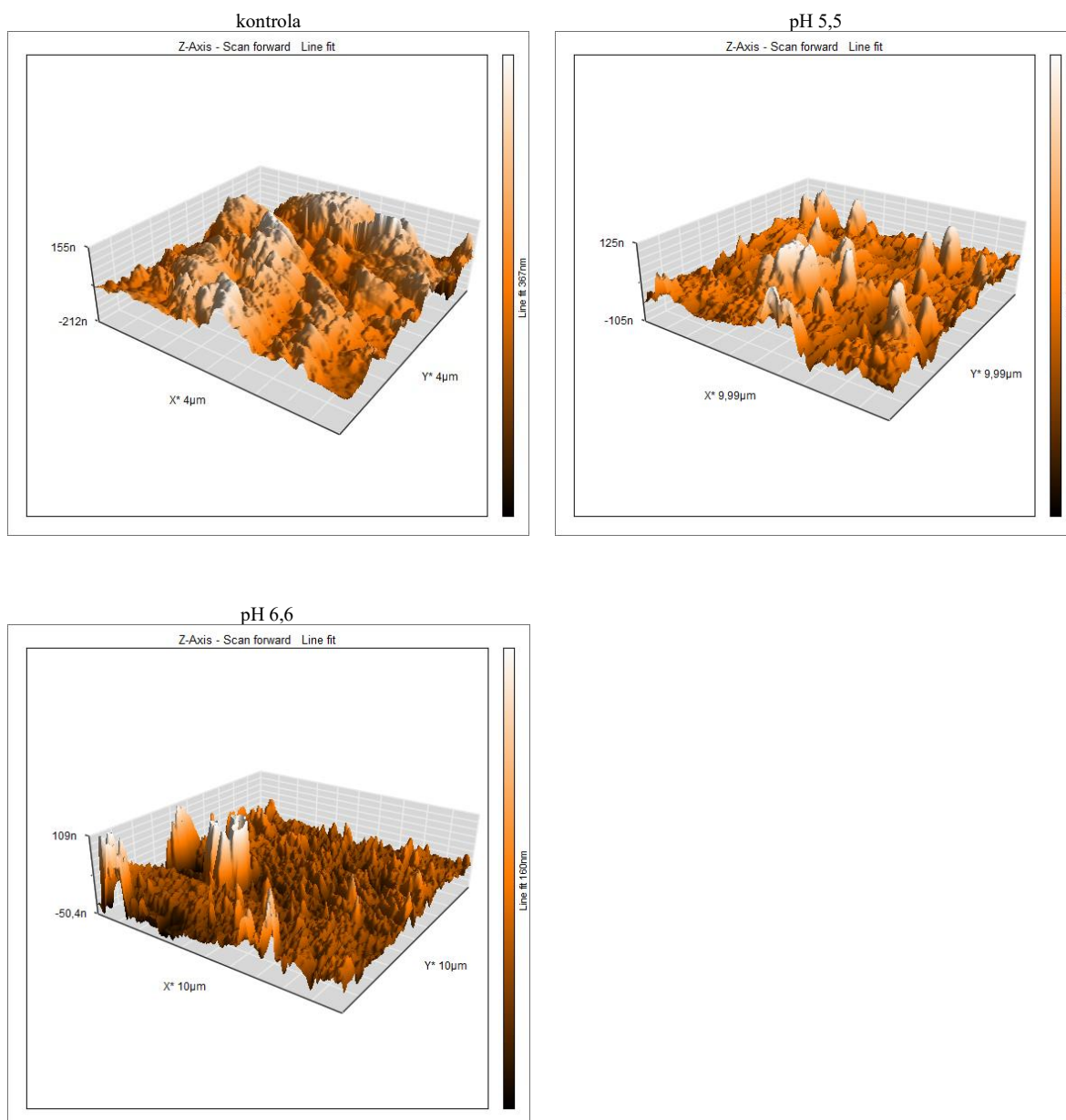
Na sl. 27. – 32. i u tablici 7. prikazani su rezultati za sve promatrane žice u početnom stanju (bez ikakve intervencije) te nakon izlaganja slini pH 5,5 i 6,6. Parametri koji nam najbolje opisuju promjene su aritmetička srednja hrapavost površine R_a , korijen kvadrata hrapavosti R_q i korijen kvadrata površine S_q , pa su njihove vrijednosti izdvojene u tablici.

NiTi otpušta više iona nikla i titanija u odnosu na presvučenu NiTi, rezultati AFM-a ukazuju na opću koroziju i ravnomjerno trošenje površine, dok se kod žice s prevlakom događa jamičasta korozija (sl. 27. i 28., tablica 7.).

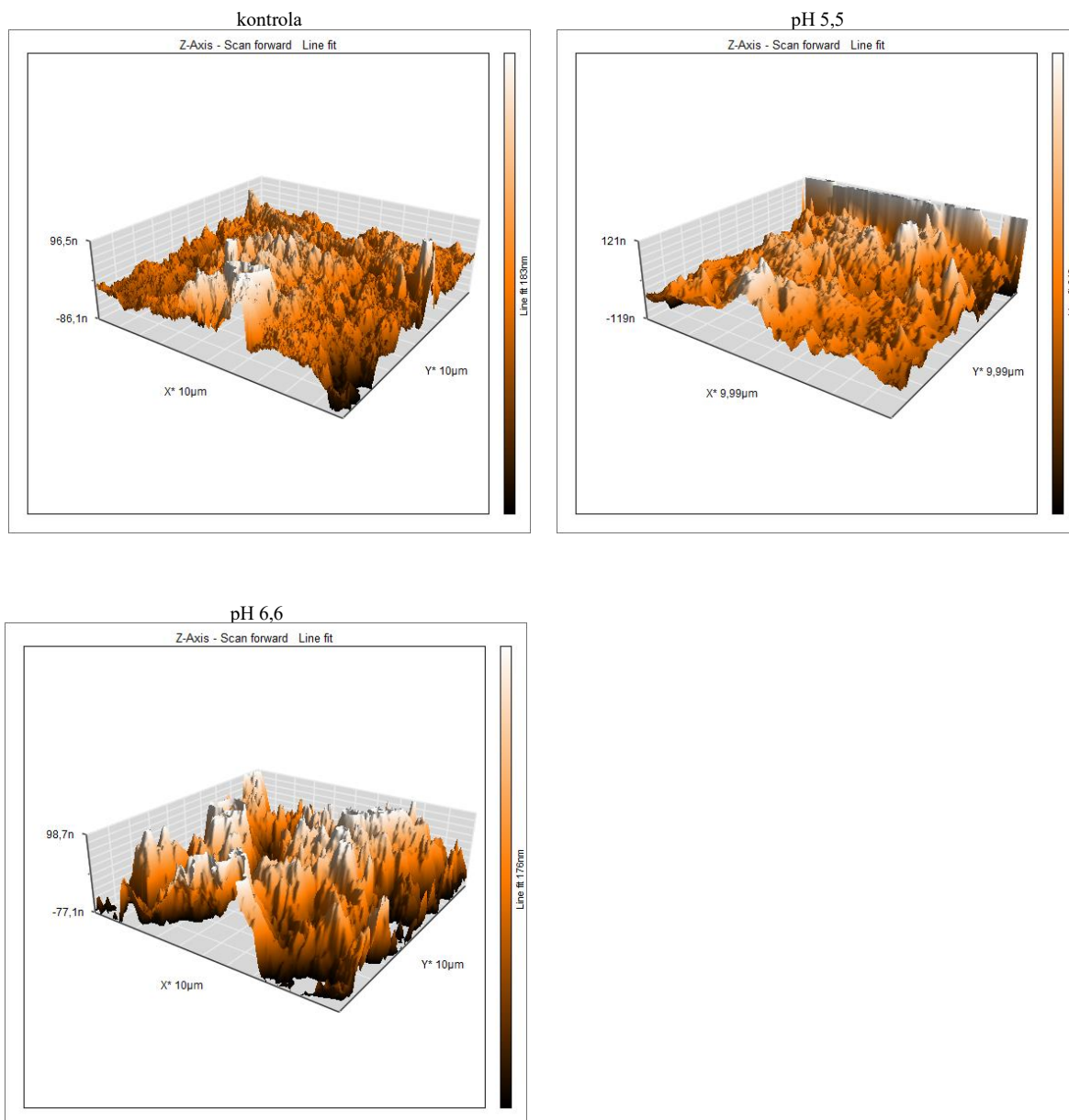
Površinska hrapavost SS bez nikla je puno veća od standardne SS žice vjerojatno zbog toga što su, umjesto nikla, dodani u većem broju drugi metali. Korozijom u slini, početne se razlike u promatranim parametrima hrapavosti povećavaju, više pri nižem pH (tablica 7.). Slike ukazuju na vjerojatnu jamičastu koroziju (sl. 29. i 30.).

Rezultati za CoCr i TMA dobro ilustriraju promjene površinske hrapavosti uslijed otpuštanja iona, tj. pojave korozije (sl. 31. i 32., tablica 7.). Usporedbom rezultata proizlazi zaključak da TMA slitina manje mijenja površinsku hrapavost u odnosu na kontrolu kad je uronjena u slinu pH-vrijednosti 6,6, nešto više nakon pH 5,5, što je podudarno s povećanim otpuštanjem iona titanija pri pH 5,5 (vidljivo u prije opisanim rezultatima ICP u umjetnoj slini).

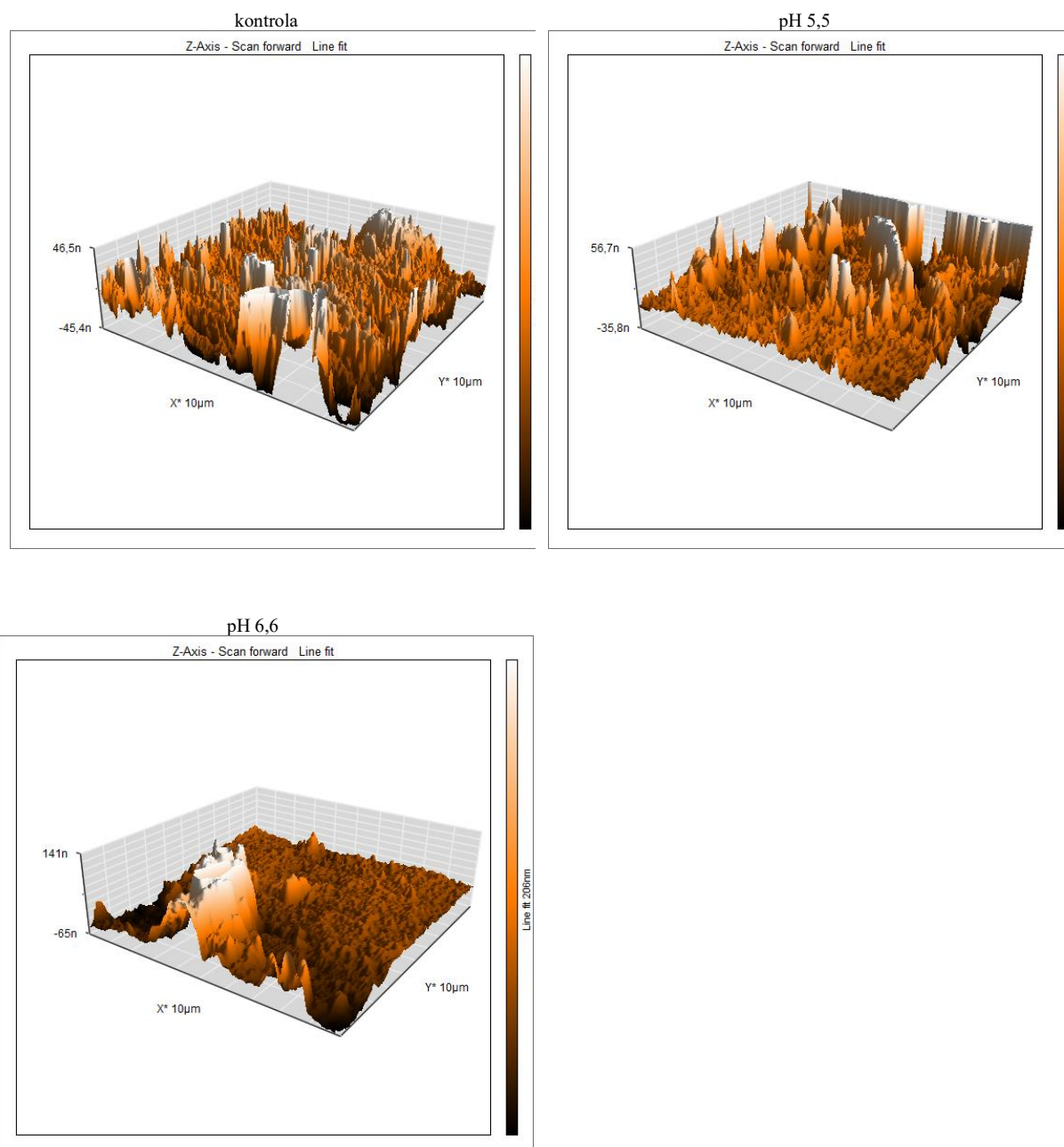
Kod žice slitine CoCr dolazi do manjeg porasta hrapavosti površine u pH 5,5, a znatno više u pH 6,6 (sl. 31., tablica 7.). To se događa zbog jače opće korozije pri pH 5,5 kod koje dolazi do ravnomjernog trošenja materijala, što je popraćeno i povećanim otpuštanjem iona kobalta i nikla, što je vidljivo i na rezultatima za ICP u umjetnoj slini.



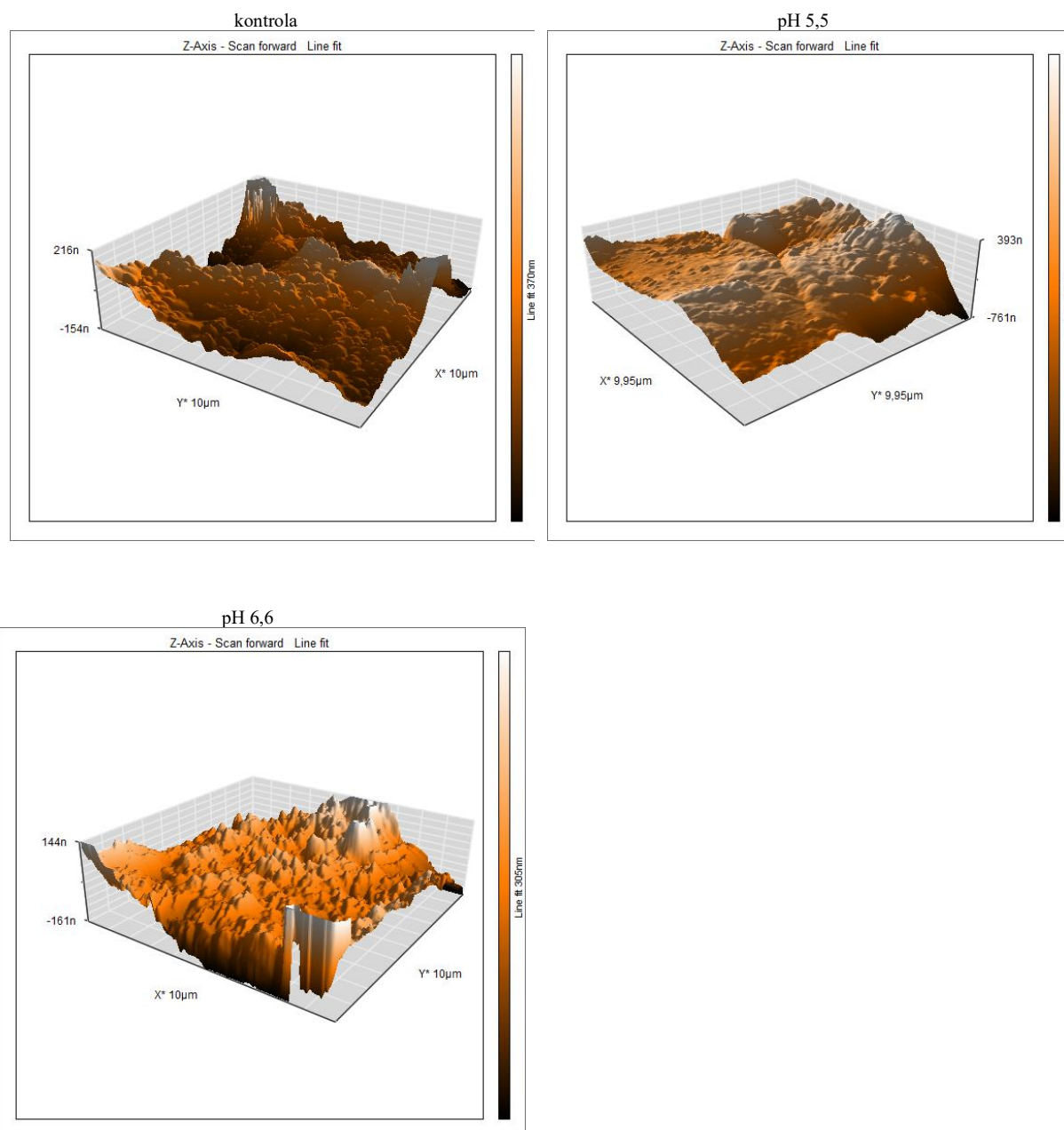
Slika 27. Trodimenzionalni prikaz površine žice NiTi bez uranjanja u slinu (kontrola), te nakon 28 dana uranjanja u umjetnu slinu pH 5,5 i 6,6.



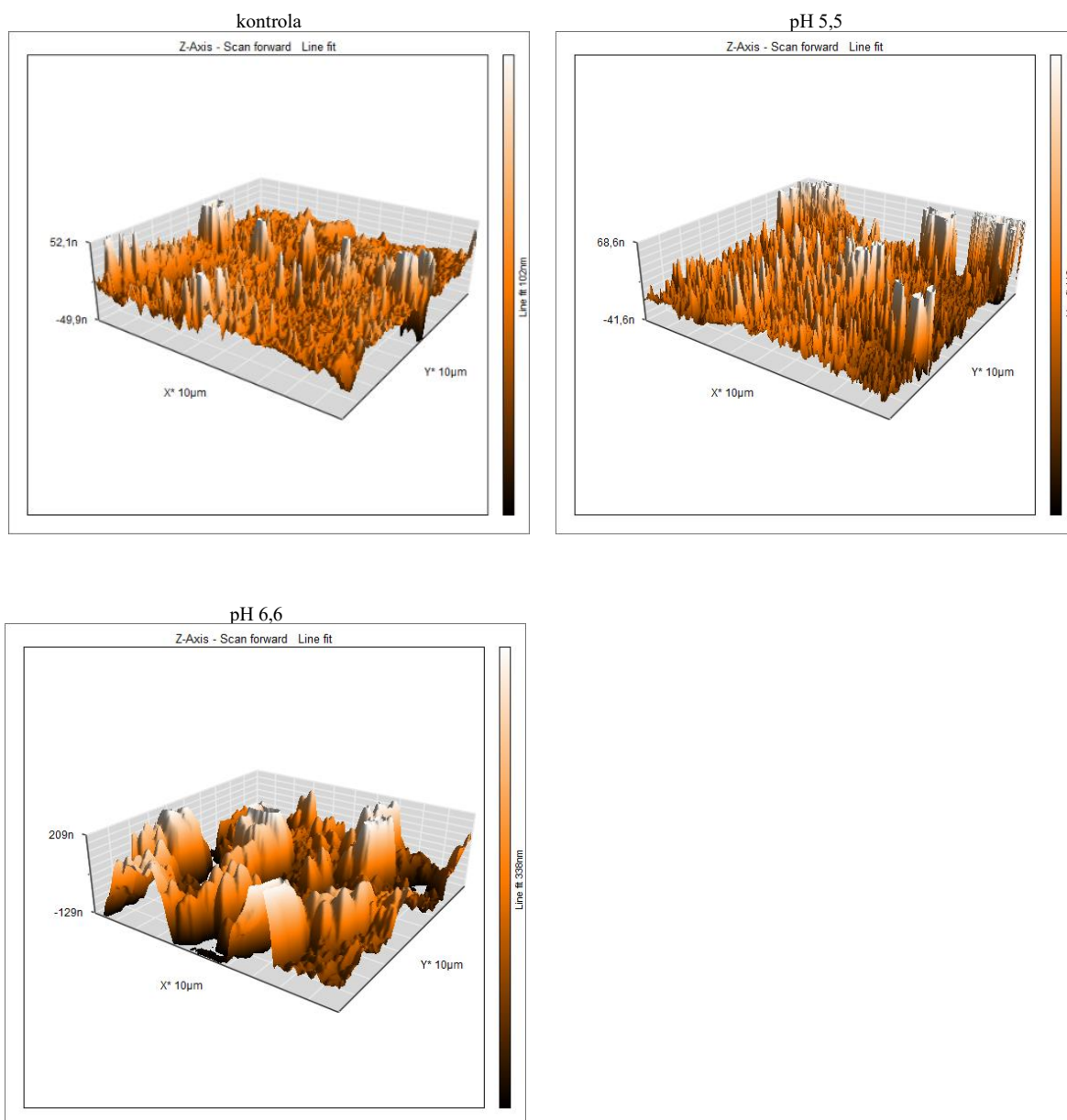
Slika 28. Trodimenzionalni prikaz površine žice NiTi-p bez uranjanja u slinu (kontrola), te nakon 28 dana uranjanja u umjetnu slinu pH 5,5 i 6,6.



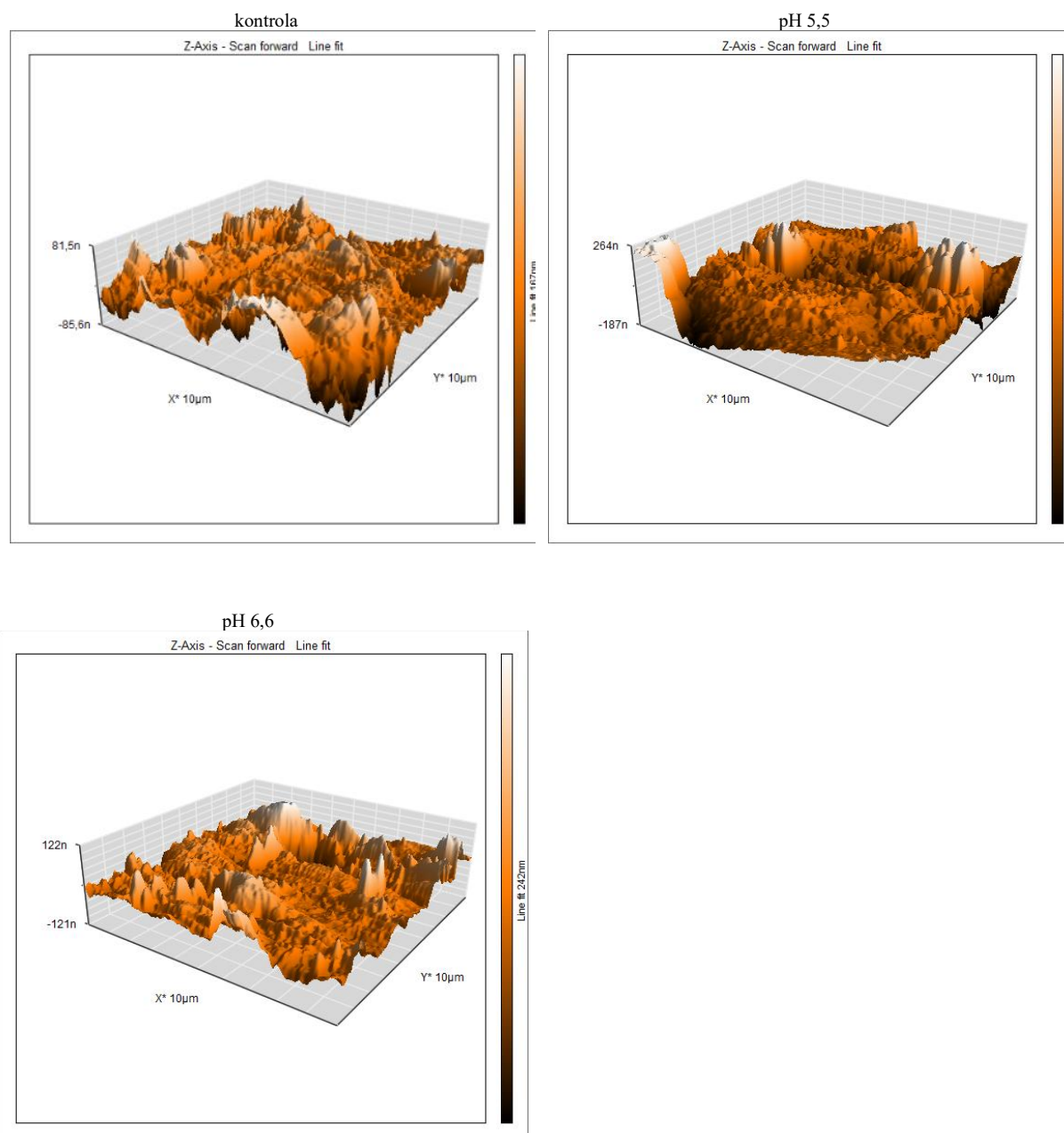
Slika 29. Trodimenzionalni prikaz površine žice SS bez uranjanja u slinu (kontrola), te nakon 28 dana uranjanja u umjetnu slinu pH 5,5 i 6,6.



Slika 30. Trodimenzionalni prikaz površine žice SS bez nikla bez uranjanja u slinu (kontrola), te nakon 28 dana uranjanja u umjetnu slinu pH 5,5 i 6,6.



Slika 31. Trodimenzionalni prikaz površine žice CoCr bez uranjanja u slinu (kontrola), te nakon 28 dana uranjanja u umjetnu slinu pH 5,5 i 6,6.



Slika 32. Trodimenzionalni prikaz površine žice TMA bez uranjanja u slinu (kontrola), te nakon 28 dana uranjanja u umjetnu slinu pH 5,5 i 6,6.

Tablica 7. Rezultati AFM analize (S_q , R_a i R_q) za NiTi, NiTi-p, čelične, čelične bez nikla, CoCr i TMA žice pri pH 5,5 i 6,6

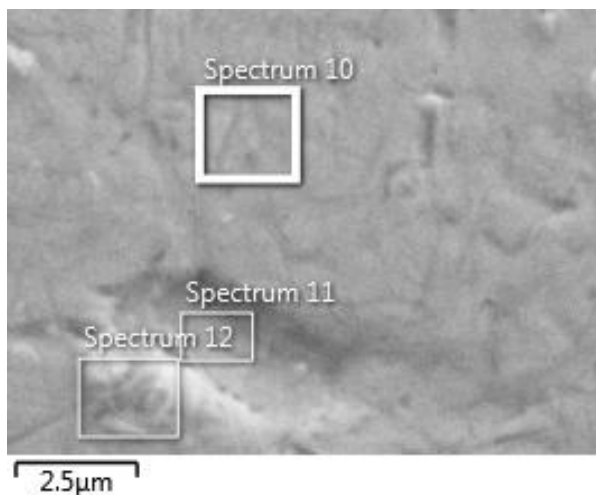
Slitina		S_q (nm ²)	R_a (nm)	R_q (nm ²)
NiTi	kontrola	50,48	46,844	61,555
	pH 5,5	30,198	25,769	36,93
	pH 6,6	21,378	8,0866	9,8536
NiTi-p	kontrola	24,955	18,564	22,038
	pH 5,5	33,549	15,411	19,115
	pH 6,6	60,713	41,65	47,876
Čelik	kontrola	19,607	13,329	22,031
	pH 5,5	15,281	8,5717	12,792
	pH 6,6	37,988	14,851	18,709
Čelik bez nikla	kontrola	65,757	50,506	61,744
	pH 5,5	166,78	102,8	131,86
	pH 6,6	34,842	26,475	37,472
CoCr	kontrola	14,131	8,2637	11,89
	pH 5,5	32,615	10,865	13,919
	pH 6,6	88,365	58,851	75,168
TMA	kontrola	20,151	17,965	23,115
	pH 5,5	64,537	29,031	37,803
	pH 6,6	28,791	19,911	26,743

S_q – korijen kvadrata površine; R_a – aritmetička srednja hrapavost površine (linearna); R_q – korijen kvadrata hrapavosti (linearno)

4.5. Analiza površine skenirajućim elektronskim mikroskopom / energijskom disperzivnom spektroskopijom (SEM/EDX)

Na sljedećim slikama (33 – 53) prikazane su analize površine po jednog uzorka od svake promatrane žice, prije (kontrolni uzorak) i nakon uranjanja 28 dana u umjetnu slinu pH 5,5 i 6,6. Kemijski sastav prisutnih elemenata je iskazan kao maseni udio (ω (%)) navedenih elemenata na označenim dijelovima uzoraka u ukupnom udjelu (100 %). Osim elemenata koji čine promatranu slitinu, zamjetna su površinska onečišćenja u vidu čestica koje sadrže ugljik, kisik, aluminij, silicij, kalcij, fosfor, kalij, natrij, sumpor i klor.

Rezultati prikazani na sl. 33. – 35. pokazuju da NiTi dentalna metalna slitina prolazi kroz značajnu koroziju kada je izložena kiseloj sredini (umjetna slina) (pH 5,5) tijekom 28 dana, što je jasno prikazano povećanom hrapavošću površine, udubljenjima i značajnim porastom sadržaja kisika zbog procesa oksidacije. Razine nikla i titanija se smanjuju, što sugerira da dolazi do ispiranja iona i time do degradacije materijala. Nasuprot tome, pri pH 6,6 materijali ostaju stabilniji, s manjom korozijom i donekle umjerenim povećanjem sadržaja kisika, najvjerojatnije zbog stvaranja pasivnog oksidnog sloja. Lokalizirana područja u uzorku s pH 6,6 pokazuju visok sadržaj kisika, kao rezultat selektivne oksidacije. Općenito, niži pH sline dovodi do većeg gubitka materijala, dok malo viši pH nudi određenu zaštitu razvojem oksidnog sloja.

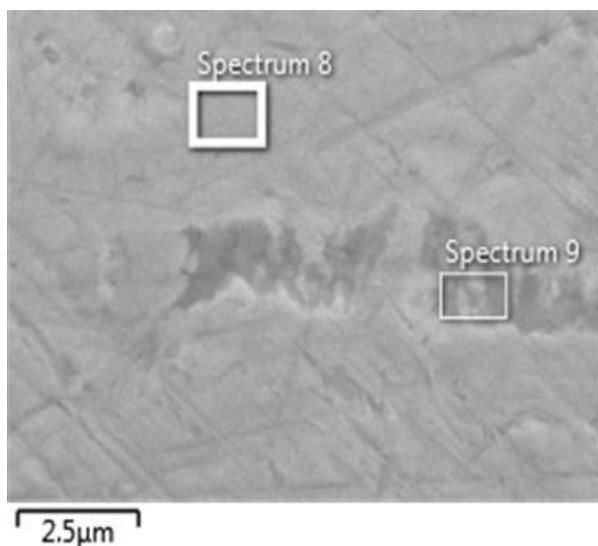


a)

Element	ω (%)		
	Sp10	Sp11	Sp12
Ni	51,9	51,5	38,9
Ti	41,3	41,4	32,0
C	4,0	4,2	21,0
Al			4,8
O	2,7	2,8	3,2
Si	0,1	0,1	0,1
Total:	100	100	100

b)

Slika 33. SEM/EDX analiza NiTi žice, kontrolni, netretirani uzorak; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.

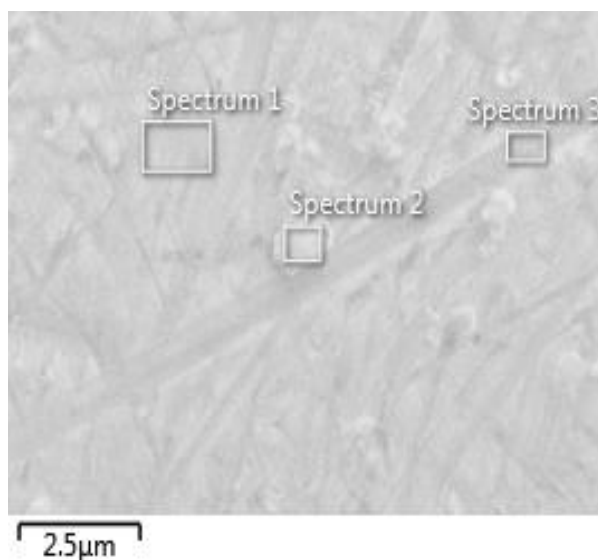


a)

	ω (%)	
Element	Sp8	Sp9
Ni	50,5	41,0
Ti	40,1	30,5
C	5,9	24,6
O	3,4	3,9
Si	0,0	0,0
Total:	100	100

b)

Slika 34. SEM/EDX analiza NiTi žice nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.



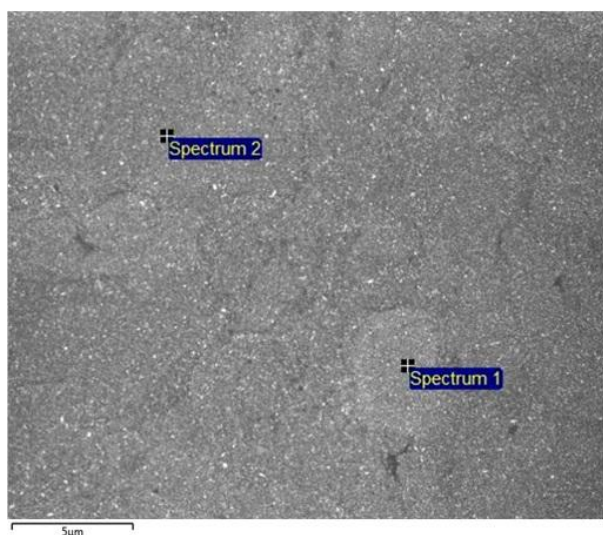
a)

	ω (%)		
Element	Sp1	Sp2	Sp3
Ni	50,3	26,6	49,3
Ti	40,5	23,2	40,1
Al		10,3	
C	5,2	3,5	5,5
O	4,1	36,4	5,0
Si	0,0	0,0	0,1
Total:	100	100	100

b)

Slika 35. SEM/EDX analiza NiTi žice nakon eluiranja pri pH 6,6; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.

Rezultati prikazani na sl. 36. – 38. pokazuju da izloženost umjetnoj slini uvelike utječe na sastav površine slitine NiTi s prevlakom Rh i Au. Kontrolni uzorak (sl. 36.) ima visoku razinu ugljika i kisika, dok u pH 5,5 (sl. 37.) raste udio kisika, dok se sadržaj titanija smanjuje, najvjerojatnije zbog korozije i ispiranja materijala. Prisutnost sumpora ukazuje na modifikacije površine zbog apsorpcije onečišćenja. Pri pH 6,6 (sl. 38.), razine titanija relativno su više nego pri pH 5,5, što ukazuje na smanjeno ispiranje, dok kisik ostaje povišen, najvjerojatnije zbog stvaranja pasivnog oksidnog sloja. Očito je da kiselo okruženje ubrzava degradaciju materijala, dok okruženje blisko neutralnom nudi bolju stabilnost materijala kroz stvaranje oksida.

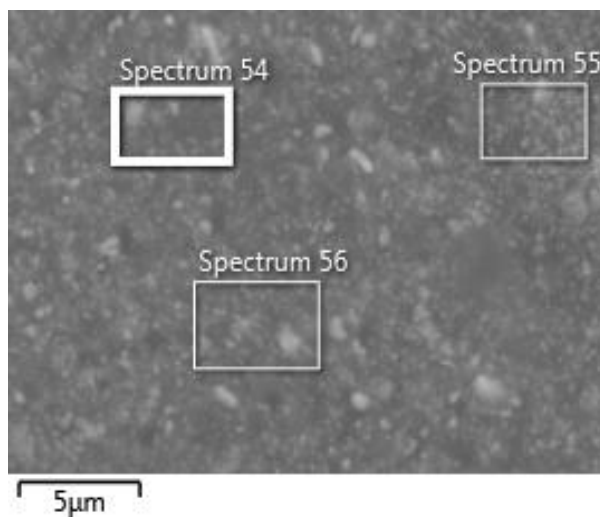


a)

Element	ω (%)	
	Sp1	Sp2
C	47,74	43,36
O	37,71	33,59
S	1,11	1,94
Ti		21,11
Total:	100	100

b)

Slika 36. SEM/EDX analiza NiTi-p žice, kontrolni, netretirani uzorak; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.

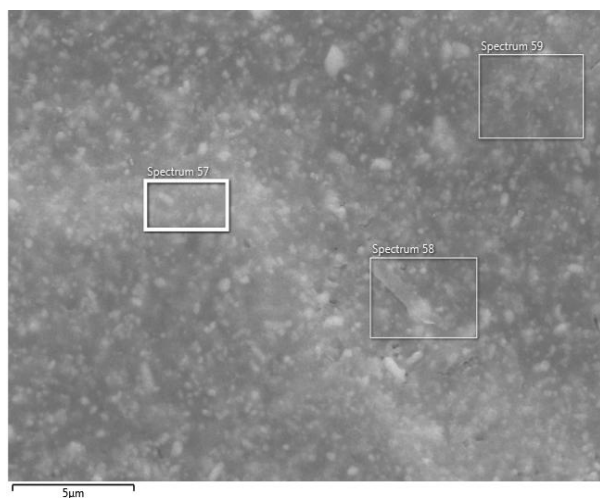


a)

Element	ω (%)		
	Sp54	Sp55	Sp56
C	31,8	31,25	39,87
O	43,89	45,81	38,49
Al	0,34	0,34	0,27
Si	0,53	0,36	0,46
S	2,04	2,31	2,01
K			0,07
Ti	18,71	17,19	16,06
Au	2,68	2,73	2,34
Pb			0,43
Total:	100	100	100

b)

Slika 37. SEM/EDX analiza NiTi-p žice nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.



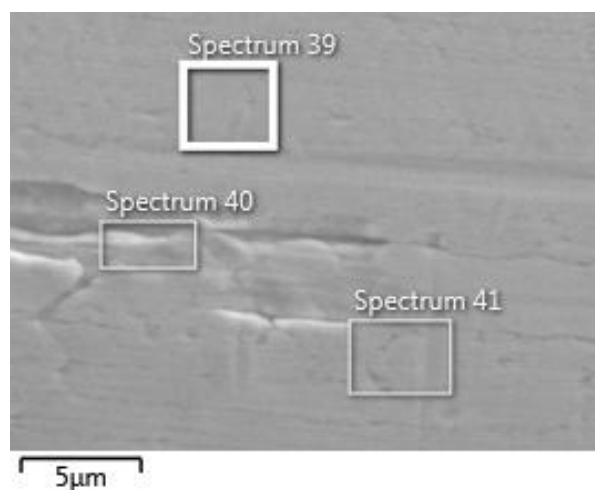
a)

Element	ω (%)		
	Sp57	Sp58	Sp59
C	40,9	44,18	37,27
O	44,6	39,34	45,01
Na		0,19	0,3
Al	0,26	0,26	0,45
Si	0,24	0,3	1,54
S	1,27	1,35	
Cl	0,09	0,1	
K	0,16	0,21	13,65
Ca		0,09	
Ti	10,51	11,69	
Ni	0,51	0,52	
Au	1,46	1,77	1,77
Total:	100	100	100

b)

Slika 38. SEM/EDX analiza NiTi-p žice nakon eluiranja pri pH 6,6; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.

Rezultati prikazani na sl. 39. – 41. pokazuju da kontrolni uzorak čelične žice (sl. 39.) ima stabilan sastav, sličan nominalnom sastavu, sa sadržajem željeza (Fe), kroma (Cr) i nikla (Ni). Uzorak pri pH 5,5 (sl. 40.) pokazuje malo povećane razine ugljika, dok se sadržaj željeza smanjuje, što ukazuje na početnu koroziju i gubitak materijala. Pri pH 6,6 (sl. 41.) sadržaj kisika znatno raste (do 11,1 %), što ukazuje na oksidaciju i stvaranje pasivnog sloja, dok se razine Fe i Cr smanjuju, što ukazuje na blagu koroziju. Sl. 41. (pH 6,6) pokazuje daljnju oksidaciju, s visokim sadržajem kisika (11,75 %) i natrija (2,44 – 2,53 %), najvjerojatnije kao rezultat površinskih naslaga iz umjetne sline. Kiseli okoliš ubrzava proces razgradnje metala, dok pH 6,6 potiče stvaranje oksidnog sloja, pružajući određenu zaštitu površine.

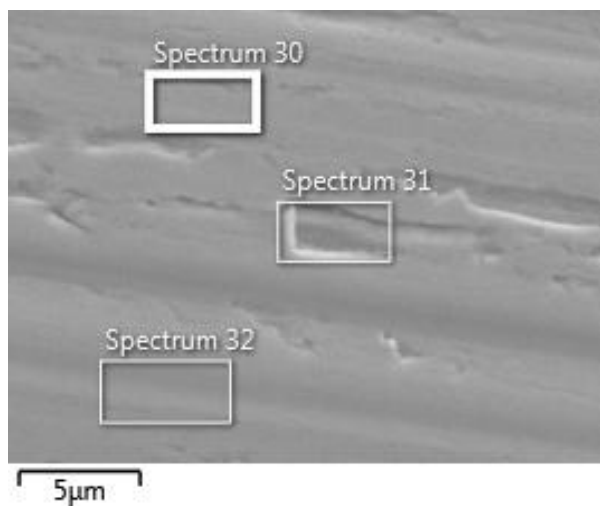


a)

Element	ω (%)		
	Sp39	Sp40	Sp41
C	3,07	7,23	3,44
O	1,34	2,53	1,66
Si	0,27	0,21	0,27
P			0,08
S			0,14
Cr	18,18	17,39	18,23
Fe	69,3	65,49	68,45
Ni	7,84	7,15	7,74
Total:	100	100	100,00

b)

Slika 39. SEM/EDX analiza čelične žice, kontrolni, netretirani uzorak; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.

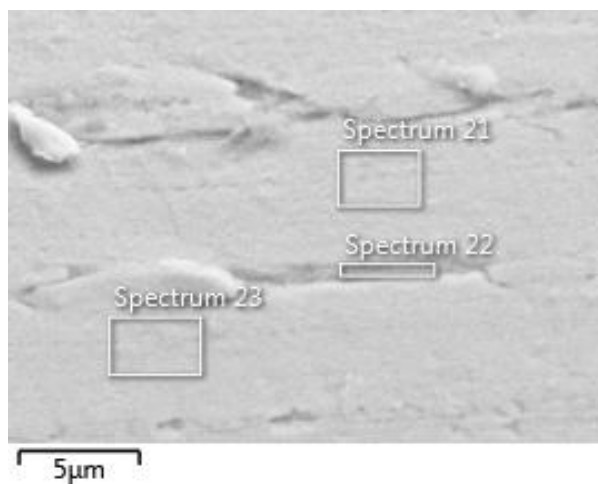


a)

	ω (%)		
Element	Sp30	Sp31	Sp32
C	4,8	7,73	5,03
O	1,5	2,64	1,56
Si	0,29	0,34	0,29
Cr	18,12	17,28	18,08
Fe	67,39	64,86	67,49
Ni	7,89	7,15	7,54
Total:	100	100	100

b)

Slika 40. SEM/EDX analiza čelične žice nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize



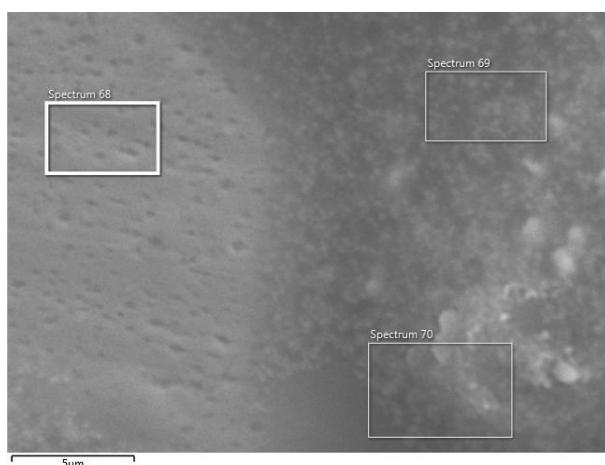
a)

	ω (%)		
Element	Sp21	Sp22	Sp23
C	9,78	13,64	11,33
O	11,5	11,75	10,56
Na	2,53	2,44	2,47
Si	0,32	0,31	0,32
P	1,23	1,18	1,14
S	0,26		
Ca	1,34	1,36	1,26
Cr	14,56	13,97	14,52
Fe	52,52	49,74	52,28
Ni	5,97	5,62	6,12
Total:	100	100	100

b)

Slika 41. SEM/EDX analiza čelične žice nakon eluiranja pri pH 6,6; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.

Rezultati SEM/EDX analize čelične žice bez nikla (sl. 42. – 45.) ukazuju na značajne promjene u sastavu površine dentalne slitine nakon 28 dana u umjetnoj slini na različitim pH razinama. Kontrolni uzorak (sl. 42.) pokazuje elementarnu raspodjelu, u kojoj dominiraju Fe, Cr i Mn. Pri pH 5,5 (sl. 43. i 44.) dolazi do porasta udjela ugljika i kisika, uz istovremeno smanjenje Fe i Cr, najvjerojatnije zbog površinske oksidacije i korozije. Prisutnost Ti, Si i Al u različitim količinama ukazuje na moguće taloženje ili taloženje nusproizvoda korozije. Najozbiljnija degradacija vidljiva je na sl. 45., s visokim razinama kisika, što ukazuje na pojačanu oksidaciju. Pri pH 6,6 (sl. 45.) sastav pokazuje niži stupanj oksidacije u odnosu na pH 5,5, uz relativno veće zadržavanje Fe i Cr. Povećana prisutnost F, Na i K ukazuje na površinske interakcije s komponentama umjetne sline, što dovodi do djelomičnog taloženja minerala. Konačno, rezultati pokazuju da niži pH ubrzava oksidaciju i koroziju, dok pH (6,6) blizu neutralnog nudi relativno bolju stabilnost slitine.

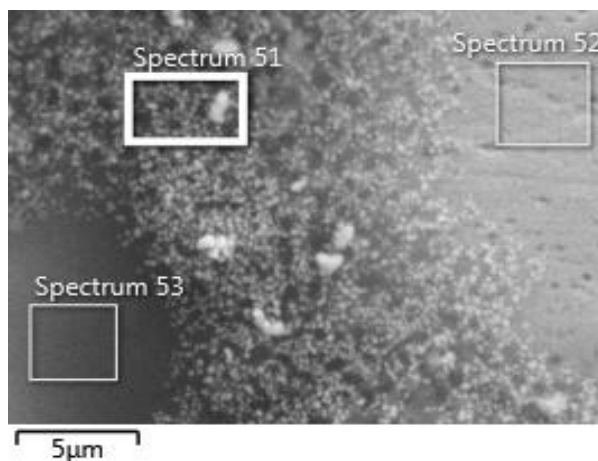


a)

Element	ω (%)		
	Sp68	Sp69	Sp70
C	7,21	24,41	25,27
O	2,29	42,98	31,14
Al		0,94	0,88
Si	0,33	7,59	7,95
Ti	0,21	19,27	20,91
Cr	19,72	0,6	2,56
Mn	19,54	0,51	2,14
Fe	47,5	1,06	4,76
Au	3,2	2,63	4,4
Total:	100	100	100

b)

Slika 42. SEM/EDX analiza čelične žice bez nikla, kontrolni, netretirani uzorak; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.

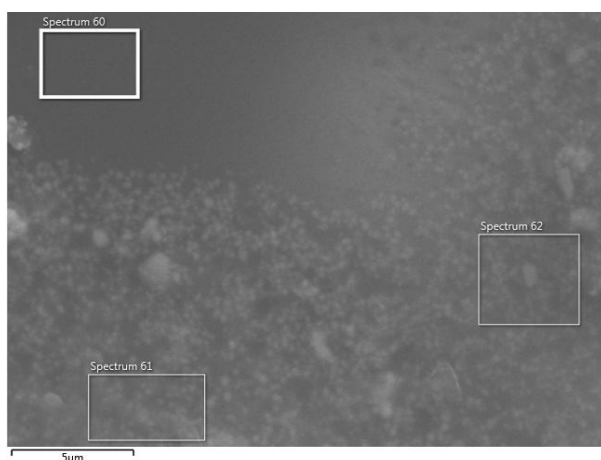


a)

	ω (%)		
Element	Sp51	Sp52	Sp53
C	24,51	6,19	55,02
O	30,09	2,32	10,39
Al	0,63		
Si	2,78	0,32	0,3
Ti	11,52	0,19	0,16
Cr	7,74	20,63	8,43
Mn	6,75	20,55	7,78
Fe	15,57	49,07	17,92
Mo		0,73	
Sb	0,43		
Total:	100	100	100

b)

Slika 43. SEM/EDX analiza čelične žice bez nikla nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.



a)

	ω (%)		
Element	Sp60	Sp61	Sp62
C	24,43	60,28	17,43
O	46,08	16,88	20,06
Al	1,12	0,35	0,67
Si	5,28		2,84
Ti	20,42		11,68
Cr		5,36	11,07
Mn		4,34	10,1
Fe		9,01	23,38
Au	2,67	3,78	2,77
Total:	100	100	100

b)

Slika 44. SEM/EDX analiza čelične žice bez nikla nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.



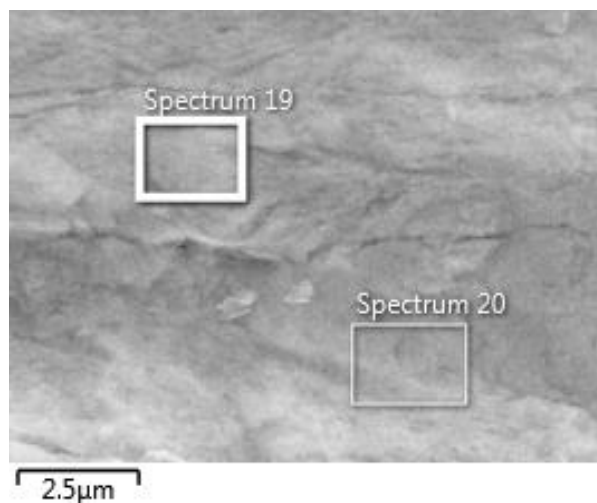
a)

Element	ω (%)		
	Sp65	Sp66	Sp67
C	10,17	30,18	24,53
O	2,64	20,12	26,83
Na			0,37
F		10,64	
Al		0,45	1,07
Si	0,54	2,33	12,14
K			0,46
Ti		7,31	24,29
Cr	18,82	6,94	0,97
Mn	19	5,99	0,95
Fe	44,64	13,47	2,23
Mo	0,67		
Au	3,53	2,57	6,17
Total:	100	100	100

b)

Slika 45. SEM/EDX analiza čelične žice bez nikla nakon eluiranja pri pH 6,6; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.

Rezultati SEM/EDX (sl. 46. – 50.) za CoCr žicu pokazuju da elementarnim sastavom kontrolnih uzoraka dominira Co, Ni i Cr (sl. 46. i 47.). Pri pH 5,5 (sl. 48. i 49.) dolazi do značajnog povećanja sadržaja kisika i ugljika, uz smanjenje Cr i Co, najvjerojatnije kao rezultat površinske oksidacije i degradacije materijala. Prisutnost Sr i Na u nekim regijama najvjerojatnije je posljedica potencijalnih površinskih interakcija s komponentama u umjetnoj slini. Dodatno, na sl. 49., uočeno je značajno povećanje ugljika, što ukazuje na organsko taloženje ili kontaminaciju. Pri pH 6,6 (sl. 50.), elementarni sastav čini se relativno stabilnim, sa sadržajem Co, Ni i Cr bližim kontrolnom uzorku, iako se još uvijek opaža manja oksidacija. Ovo sugerira da niži pH (5,5) ubrzava proces korozije, dok malo viši pH (6,6) pomaže u održavanju stabilnosti materijala.

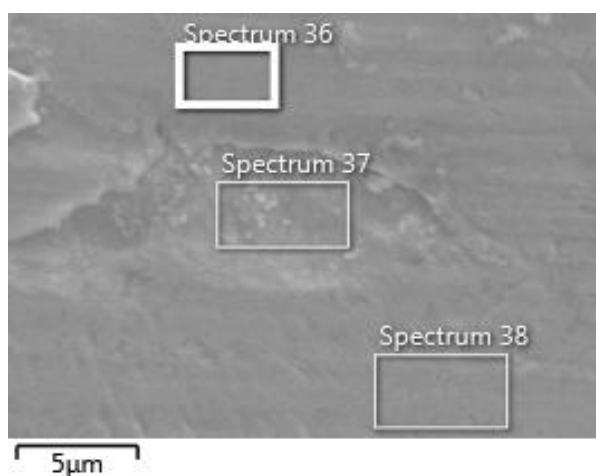


a)

	ω (%)	
Element	Sp19	Sp20
Co	44,3	45,5
Ni	21,2	21,4
Cr	17,5	17,8
Fe	5,2	5,1
C	3,4	4,1
Mo	3,2	2,2
W	3,1	2,1
Ti	1,1	1,0
O	0,9	0,7
Si	0,1	0,1
Total:	100,00	100,00

b)

Slika 46. SEM/EDX analiza CoCr žice, kontrolni, netretirani uzorak; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.

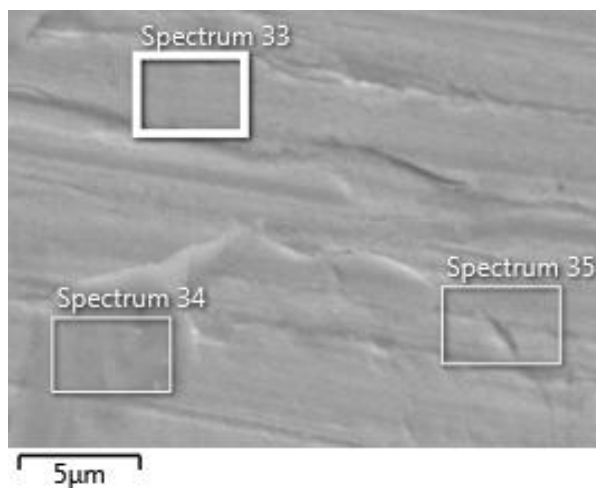


a)

	ω (%)		
Element	Sp36	Sp37	Sp38
C	3,63	3,82	3,52
O	0,74	2,31	0,81
Si	0,13	0,18	0,16
Ti	0,73	1,65	1,27
Cr	17,35	16,89	17,51
Mn	0,59		
Fe	5,26	4,92	5,27
Co	44,68	43,34	44,4
Ni	21,51	21,18	21,16
Mo	2,76	2,81	2,99
W	2,62	2,9	2,9
Total:	100	100	100

b)

Slika 47. SEM/EDX analiza CoCr žice, kontrolni, netretirani uzorak; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.

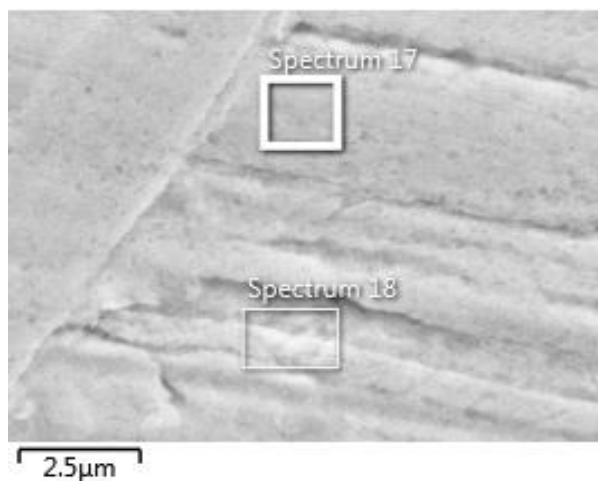


a)

	ω (%)		
Element	Sp33	Sp34	Sp35
C	9,62	38,62	6,98
O	1,78	7,6	1,95
Na		0,89	
Si	0,41	0,14	0,17
P	3,13		
S	0,19		
Cl		0,31	
K		0,25	
Ca		0,1	
Ti	1,28	0,92	1,82
Cr	16,54	9,9	16,98
Fe	4,66	2,76	4,82
Co	39,33	23	40,33
Ni	18,96	10,85	19,26
Mo	3,34	2,46	3,81
W	3,06	2,19	3,89
Total:	100	100	100,00

b)

Slika 48. SEM/EDX analiza CoCr žice nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.

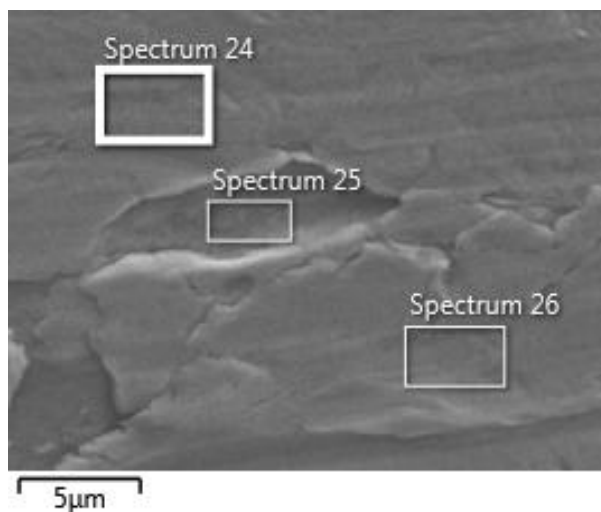


a)

	ω (%)	
Element	Sp17	Sp18
Co	42,2	40,5
Ni	20,0	19,2
Cr	17,2	16,2
C	5,6	9,0
Fe	4,9	4,8
Mo	3,8	3,6
Sr		2,8
W	3,7	
O	1,4	1,4
Ti	1,0	1,4
Si	0,2	1,0
Total:	100	100

b)

Slika 49. SEM/EDX analiza CoCr žice nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.



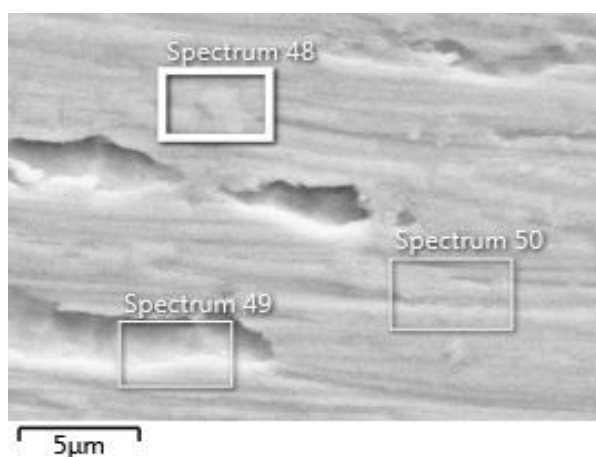
a)

	ω (%)		
Element	Sp24	Sp25	Sp26
C	4,15	3,96	4,98
O	1,28	0,93	1,21
Si	0,18	0,2	0,14
P	0,14		
S	0,85	0,54	
Ti	1,57	1,27	0,91
Cr	17,69	18,54	17,27
Fe	5,08	5,35	5,19
Co	44,56	47,13	43,58
Ni	21,32	22,08	20,68
Mo			3,12
W	3,17		2,92
Total:	100	100	100

b)

Slika 50. SEM/EDX analiza CoCr žice nakon eluiranja pri pH 6,6; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.

Rezultati analize TMA žice prikazani su na sl. 51. – 53. Kontrolni uzorak (sl. 51.) pokazuje visok sadržaj Ti (~ 65 %) s Mo, Zr i Sn kao sekundarnim elementima prisutnim u materijalu. Pri pH 5,5 (sl. 52.) dolazi do porasta razine kisika, što upućuje na proces oksidacije, ali sadržaj Ti ostaje nepromijenjen, što ukazuje na dobru otpornost na koroziju i stabilnost. Mala prisutnost sumpora u jednom uzorku najvjerojatnije je kontaminacija. Pri pH 6,6 (sl. 53.), razine kisika dodatno rastu, što ukazuje na kontinuirani proces oksidacije, međutim sadržaj Ti ostaje konzistentan, potvrđujući njegovu stabilnost u blago kiselom okruženju. Međutim, prisutnost Na i male redukcije Mo i Sn ukazuju na neke reakcije ispiranja ili ionske izmjene. Rezultati pokazuju da je slitina na bazi Ti (TMA žica) otpornija na koroziju u usporedbi sa slitinom CoCr žice, posebno u kiselim uvjetima.

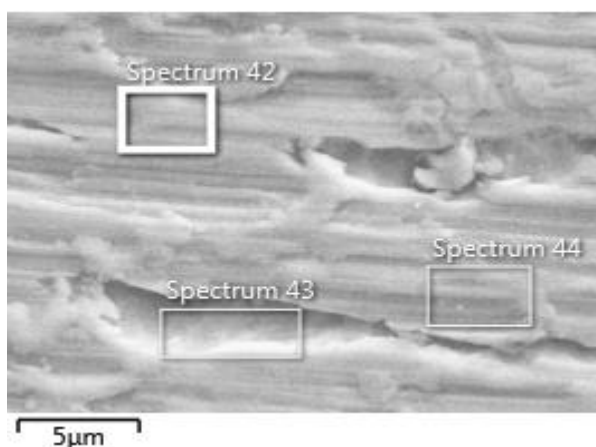


a)

	ω (%)		
Element	Sp48	Sp49	Sp50
C	4,42	5,03	4,69
O	11,97	8,57	9,94
F		1,13	
Si	0,03	0,05	0,05
Ti	64,19	65,5	65,72
Zr	5,34	5,34	5,49
Mo	10,09	10,4	9,93
Sn	3,95	3,99	4,18
Total:	100	100	100

b)

Slika 51. SEM/EDX analiza TMA žice, kontrolni, netretirani uzorak; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.

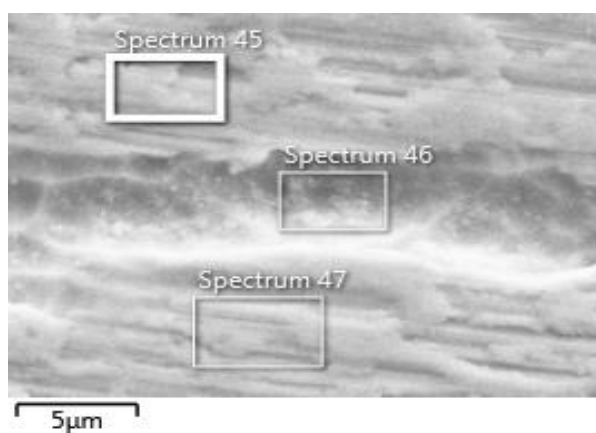


a)

	ω (%)		
Element	Sp42	Sp43	Sp44
C	3,5	3,51	4,71
O	9,5	10,14	10,94
Si	0,04	0,06	0,01
S		0,32	
Ti	66,99	67,34	66,01
Zr	5,51	5,27	5,03
Mo	10,37	9,33	9,29
Sn	4,1	4,03	4,02
Total:	100	100	100

b)

Slika 52. SEM/EDX analiza TMA žice nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.



a)

	ω (%)		
Element	Sp45	Sp46	Sp47
C	4,34	4,36	4,23
O	14,62	15,81	13,78
Na		0,43	
Si	0,07	0,12	0,04
Ti	61,99	63,27	63,16
Zr	5,36	4,34	5,54
Mo	9,8	8,18	9,17
Sn	3,82	3,49	4,07
Total:	100	100	100

b)

Slika 53. SEM/EDX analiza TMA žice nakon eluiranja pri pH 6,6; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine izražen masenim udjelom pojedinog elementa na označenim mjestima analize.

5. RASPRAVA

5.1. Biološki učinak

5.1.1. Vijabilnost kvasca

Rezultati određivanja vitalnosti kvasca su prikazani na sl. 1. Moguće je primijetiti da nema statistički značajnih promjena u porastu broja stanica među uzorcima, a nije zamjetna niti značajna razlika kod promjene pH. Količine otpuštenih metalnih iona u podlogu kao medij (iako se radi i o ukupnoj količini od 1,5 mg/l) nisu izazvale vidljive štetne učinke na stanicama kvasaca. Nešto veće smanjenje porasta stanica zamjetno je kod pH 6,6 kod CoCr žice, što se može vezati uz količinu otpuštenog iona kroma (i moguće interferencije s proteinima ili DNA). Aktivirani endogeni enzimatski i neenzimatski mehanizmi obrane pridonose održavanju vitalnosti testiranog kvasca [131].

5.1.2. Analiza ekspresije gena stresnog odgovora kvasca

Kvasci su razvili sofisticirane enzimske i neenzimske antioksidativne mehanizme za odgovor na oksidativni stres. Dio enzimskog antioksidativnog obrambenog sustava čine CTT, SOD1 i 2 i GSH i oni moraju biti usklađeni u svom djelovanju kako bi učinkovito zaštitili stanice od različitih oblika oksidativnog stresa. SOD1 i SOD2 pretvaraju superoksidne radikale u H_2O_2 , katalaza pretvara H_2O_2 u vodu i kisik, a glutation, kojeg proizvodi glutation sintetaza, djeluje kao opći antioksidans i podržava druge antioksidativne enzime. [106, 107].

Objekte testirane superoksidne dismutaze (sl. 3. i 4.) značajno su više eksprimirane pri pH 5,5 nego kod pH 6,6, s time da je mitohondrijski SOD enzim više eksprimiran od citosolnog. Pri pH 5,5 povećanu ekspresiju SOD1 izaziva najviše čelik bez nikla te CoCr žica, dok je SOD2 povišen, uz ista ta dva tretmana i pod tretmanom eluata NiTi žice. CoCr žica izaziva i veću ekspresiju katalaze, kod oba pH, s tim da je NiTi žica pri pH 5,5 najviše pojačala ekspresiju katalaze. Razlog povećanja ekspresije spomenutih enzima mogao bi biti u većoj količini iona Fe u tim eluatima, odnosno sinergijskom učinku Fe, Al i Mn (čelik bez nikla), Fe, Co, Cr i Ni (CoCr), odnosno Fe, Ni i Ti (NiTi). Sinergijski učinak smjese metalnih iona koji se nalaze u eluatima ortodontskih materijala i posljedično izazivanje oksidativnog stresa kad su bili prisutni u količini 1000 μM potvrđeno je na kvascu *S. cerevisiae* [92]. Većina spomenutih eluiranih metalnih iona su prijelazni metali, koji mogu bilo Fentonovim ili Haber-Weiss mehanizmom stvoriti značajne količine ROS-a (i superoksidnog aniona, vodikovog peroksida ili radikala hidroksida) te posljedično aktivirati enzime potrebne za njihovu pregradnju. Za pregradnju

superoksidnog radikala u stanici postoji samo superoksid dismutaza (i citosolna i mitohondrijska) i poznato je da postoje izoenzimi tog enzima, čime je osigurano efikasno uklanjanje superoksidnog radikala i preživljavanje stanica u stresnim uvjetima [105, 106]. Aktivacija barem jednog od SOD enzima u ovom radu je i očekivana i potvrđena. Kako za uklanjanje nastalog H_2O_2 u stanici osim katalaze postoje još i drugi enzimi (primjerice glutation-peroksidaza), nešto manja aktivacija katalaze u ovom radu može se dijelom objasniti uključivanjem ili drugog izoenzima katalaze ili glutation-peroksidaze [105, 106].

Zanimljivo je sagledati učinak metalnih iona i s „druge strane“. Vidljivo je da TMA utišava obje superoksid-dismutaze, što je još i izraženije pri pH 6,6. To je moguće pripisati ili najvišoj količini otpuštenog iona Cr (196 $\mu g/l$), ili sinergijskom učinku iona Cr, Cu, Mn i Al. Učinak kroma na stanice kvasca detaljno je elaboriran u radu Kaszycki i sur. [131] u kojem je navedeno mnogo mogućih staničnih procesa u koje bi se krom mogao (štetno) uključiti, dok Sumner i sur. zaključuju da su glavna meta kroma stanični proteini na kojima uočavaju oksidativna oštećenja [108].

Glutation sintetaza katalizira posljednji korak u biosintezi glutaciona, ključnog antioksidansa i staničnog reducensa. Glutation (GSH) je najzastupljeniji intracelularni tiol niske molekularne težine u stanicama i tkivima, koji igra ključnu ulogu u brojnim staničnim procesima. Djeluje kao glavni antioksidans, regulirajući funkciju proteina, sintezu DNK, ekspresiju gena, staničnu proliferaciju i staničnu signalizaciju [110]. Kao što je prikazano na sl. 2. ekspresija tog enzima pod velikim je utjecajem eluiranih metalnih iona iz testiranih žica, znači ovisi i o vrsti žice i o pH-vrijednosti. Najveći nivo ekspresije (uspoređujući sve testirane enzime oksidativnog stresa u ovom radu, kod oba pH) zabilježen je za čeličnu žicu kod pH 6,6. Elaborirajući trenutnu literaturu [110–113] moguće je zaključiti da je homeostaza glutaciona ključna za zdravlje i funkciju stanica te da nedostatak GSH doprinosi oksidativnom stresu. Prilagodba na oksidativni stres usko je povezana s redoks promjenama komponenti antioksidativne obrane [109].

Dobiveni rezultati jasno pokazuju da različite ortodontske legure i površinske prevlake izazivaju specifične obrasce ekspresije antioksidativnih enzima, pri čemu pH mikrookoliša ima ključnu ulogu u modulaciji odgovora. Glutation-sintetaza (GSH) pokazala je izraženu indukciju kod NiTi žica pri pH 5,5, dok je rodijeva prevlaka dovela do gotovo potpune supresije. Ovi nalazi potvrđuju ranija istraživanja prema kojima prevlake mogu promijeniti ali ne nužno i smanjiti biološki odgovor [132, 133]. Kod čeličnih žica bez nikla povišena ekspresija GSH

ukazala je da upravo ioni željeza i kroma, a ne nikal, dominiraju u induciranju oksidativnog odgovora [134]. Superoksid dismutaza 1 (SOD1) pokazala je najveću ekspresiju kod čeličnih žica bez nikla pri pH 5,5, uz višestruko smanjene vrijednosti pri neutralnom pH. Sličan obrazac zabilježen je kod CoCr žica. Ovi nalazi potvrđuju da kisele sredine pospješuju otpuštanje iona te snažnije induciraju oksidativni stres, što je u skladu s ranijim opažanjima [134, 135]. Superoksid dismutaza 2 (SOD2) pokazala je osobito visoku ekspresiju kod NiTi i CoCr žica pri pH 5,5 (do 27 puta u odnosu na kontrolu), što ukazuje na snažnu aktivaciju mitohondrijskog antioksidativnog mehanizma. Rodijeva prevlaka značajno je reducirala ekspresiju SOD2, što je u skladu s nalazima da površinske obloge mogu smanjiti oslobađanje iona, ali ne u potpunosti [132]. Pri pH 6,6 ekspresija je bila gotovo potpuno supresirana, osim kod CoCr žice, što potvrđuje ulogu iona kobalta i kroma u održavanju oksidativnog stresa i u neutralnijim uvjetima [135, 136]. Katalaza (CAT) se razlikuje od prethodnih enzima jer je značajna indukcija uočena i pri pH 6,6. Najveća ekspresija zabilježena je kod NiTi žice pri pH 5,5 (26 puta u odnosu na kontrolu), dok je CoCr inducirao snažan odgovor u oba pH uvjeta. Za razliku od SOD2, rodijeva prevlaka na NiTi žici povećala je ekspresiju katalaze, što ukazuje na kompleksnu interakciju iona i signalnih putova [132, 133]. Ovi nalazi potvrđuju da katalaza reagira na sekundarne produkte oksidativnog stresa (H_2O_2) i pokazuje širi raspon aktivacije, čak i u blažim okolišnim uvjetima [135, 137].

5.2. Analiza rezultata mjerenja induktivno spregnutom plazmom (ICP)

5.2.1. Analiza rezultata mjerenja induktivno spregnutom plazmom (ICP) u umjetnoj slini

Otpuštanje iona iz testiranih dentalnih slitina pokazalo se manjim iz predloženih hipoalergenih varijanti u usporedbi sa standardnim materijalima. Najviše nikla otpušteno je iz nepresvučenih NiTi žica i žica od nehrđajućeg čelika, dok je kod njihovih analoga otpuštanje bilo minimalno ili nikakvo. Također, nakon početnog slabog otpuštanja pri pH 6,6, oslobađanje Ni iz nepresvučenog NiTi značajno se povećalo, vjerojatno zbog manipulacije metalnom pincetom između dvije vremenske točke [158, 159] i izlaganja podpovršinskog materijala nakon otapanja površinskog zaštitnog sloja. Sličan je rezultat zapažen za željezo oslobođeno iz SS-a, također vjerojatno potaknut manipulacijom i stvaranjem nestabilnog spoja željeza koji se brzo otapa u gotovo neutralnim uvjetima [159, 160]. U prethodnom istraživanju Lairda i sur. također je otkriveno da hipoalergene slitine oslobađaju manje metalnih iona u usporedbi sa standardnim slitinama [160], te da vrsta i uniformnost premaza utječu na otpuštanje iona [56, 162]. Istraživanje Edwarda Cho i sur. pokazalo je da se čak i usprkos zadebljanoj rodijevoj prevlaci na NiTi žicama nikal ispire, ali je ukupna količina niska i gotovo se ne može detektirati u potkožnom tkivu [163]. Razine oslobođenog nikla i titanija u našoj su studiji usporedive s onima Chikhalea i sur. [164], koji su proučavali NiTi i TMA žice. Prethodna su istraživanja pokazala da je Ni najčešći uzrok alergije, a također djeluje i kao katalizator povećavajući rizik od senzibilizacije i alergije na kobalt [165]. Kao što su naši rezultati pokazali, slitina CoCr je otpustila veliku količinu kobalta (među najvišim vrijednostima od svih testiranih metala) zajedno s velikom količinom nikla, a kao što je već spomenuto, kombinirani učinak oba iona predstavlja rizik za ljudsko zdravlje [166]. Interakcije, pa čak i katalitički učinci razlog su više da sveukupno ispiranje iz dentalnih slitina bude što niže.

Gornja podnošljiva razina unosa (UL) za Ni, što predstavlja najveći dnevni unos hranjivih tvari za koji nije vjerojatno da će predstavljati rizik od štetnih zdravstvenih učinaka za gotovo sve pojedince u općoj populaciji, postavljena je na 1,0 mg/dan [138]. Izvedena razina bez prigovora (DNEL) je razina izloženosti tvari kojoj ljudi ne bi trebali biti izloženi [139], a postavljena je na 11 µg/kg tm/dan za Ni [140] i 350 mg/kg tm/dan za Ti [141]. Budući da postoje mnogi izvori nikla u dnevnoj konzumaciji vode, orašastih plodova i žitarica, kao i iz losiona za kožu, deterdženata, tetovaža, piercinga, nakita itd., preporučljivo je zadržati unos iz dodatnih poznatih

izvora (kao što su ortodontski aparati ili stomatološki protetski materijali) što je moguće nižim [142].

Akumulirana doza nikla u koži ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) je najvažniji čimbenik koji određuje rizik od alergije i alergijskog dermatitisa na nikal [143, 144]. Fischer i sur. (2005) su pokazali da 5 % osjetljive populacije reagira na $0,44 \mu\text{g Ni}/\text{cm}^2$ i 10 % na $1,04 \mu\text{g Ni}/\text{cm}^2$ [144]. Jensen i sur. (2006) su proveli meta-analizu kako bi pronašli procijenjene pragove doza nikla koje mogu izazvati sistemski kontaktni dermatitis kod pacijenata osjetljivih na nikal [145, 146]. Rezultati su pokazali da najosjetljivije skupine mogu reagirati sistemskim kontaktnim dermatitisom pri normalnoj dnevnoj izloženosti niklu iz vode za piće ili hrane s $0,22 - 0,35 \text{ mg}$ nikla kod 1 % tih pojedinaca. Najosjetljivije osobe alergične na nikal reagirale su na nehrđajući čelik s procijenjenim otpuštanjem nikla ekvivalentnim $0,22 - 0,35 \text{ mg}$ nikla kod 1 % tih pojedinaca. Najosjetljivije osobe alergične na nikal reagirale su na nehrđajući čelik s procijenjenim otpuštanjem nikla ekvivalentnim $0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ na tjedan [147]. Prema Direktivi EU o niklu, proizvodi sa sadržajem nikla namijenjeni izravnom i dugotrajnom kontaktu s kožom ne smiju ispuštati više od $0,5 \mu\text{g Ni}/\text{cm}^2/\text{tjedan}$ [139]. Daljnje implikacije za ljudsko zdravlje predstavljaju glavne infekcije, budući da oslobođeni Ni mijenja bakterijski metabolizam i predstavlja složenija klinička stanja. Osim toga, pacijenti s osjetljivom kožom, zbog neispravne kožne barijere, imaju povećanu apsorpciju nikla [148]. Apsorpciju titanija kod pacijenata s različitim kožnim stanjima ili infekcijama potrebno je ispitati u budućim istraživanjima.

Oslobađanje titanija također je bilo znatno veće u klasičnim NiTi, u usporedbi s NiTi-p, suprotno prethodnim istraživanjima NiTi-p žica [163], što sugerira poboljšanje kvalitete premaza. Novija istraživanja pokazuju sve više slučajeva nuspojava kod stomatoloških pacijenata, uzrokovanih različitim kombinacijama galvanskog spoja i utjecajem niza vanjskih (razni izvori zračenja) i unutarnjih nasljednih čimbenika [166]. Istraživanje je pokazalo da nakupljanje titanija (i željeza) povećava osjetljivost epitelnih stanica gingive na mikroorganizme u usnoj šupljini, zahvaćajući i limfocite, makrofage, monocite i osteoklaste, te urušava i meko i tvrdo tkivo u slučajevima periimplantitisa [167, 168]. Stoga oslobađanje željeza također treba svesti na minimum, kako bi se smanjila upala i osjetljivost na infekcije oralne sluznice i alveolarne kosti. U našem istraživanju otpuštanje željeza bilo je značajno niže u SS-u bez nikla u usporedbi s klasičnom SS-slitinom. Zanimljivo je da je veće otpuštanje željeza zabilježeno nakon produženog vremena potapanja u višem pH, vjerojatno zbog ogrebotina nastalih manipulacijom i stvaranja nestabilnih spojeva željeza [159, 160].

Iako se titanij općenito smatra nealergenim materijalom, neka su istraživanja otkrila izolirane slučajeve alergija u blizini materijala koji sadrže titanij, npr. zubnih implantata, što može uzrokovati reakcije tipa IV (odgođene) ili I (neposredne) kod alergičnih pacijenata [149, 150, 151, 152, 1]. Alergije na titanij su rijetke; kod pacijenata sa zubnim implantatima otkrivena je prevalencija od 0,6 % [1]. Granična vrijednost praga za preosjetljivost na Ti pri oralnoj ili kožnoj apsorpciji nije se mogla pronaći. Alergija na titanij također može biti posljedica nečistoća u titaniju, kao što su nikal, krom i kadmij. Zbog oskudnih podataka o alergijama izazvanim titanijem, indicirana su daljnja istraživanja i promatranje kliničkih manifestacija.

Postoji stalni trend koji nastoji zadržati unos metala, metalnih iona i nanočestica što je moguće nižim, na temelju preporuka i zakonodavstva EU, Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC), Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO), te američkog Nacionalnog toksikološkog programa (engl. *National Toxicology Program*, NTP) i Uprave za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) [169, 170–172]. Uz novo označavanje i upozoravanje potrošača koje postaje obvezno, za slitine koje sadrže CMR tvar, poput nikla, kobalta i kroma, čini se uputnim koristiti one s nižim količinama impliciranih materijala ili bez njih. Naše je istraživanje pokazalo da se četiri puta veće koncentracije kobalta oslobađaju iz CoCr slitine, u usporedbi s odgovarajućom žicom izrađenom uglavnom od titanija i molibdena, što je čini manje preporučljivom za upotrebu.

Također, CoCr otpušta sve gorespomenute Ni, Co, Cr i dodatno Mo ione, što je čini najmanje poželjnom opcijom među dostupnim slitinama. Oslobađanje titanija iz TMA žice bilo je usporedivo s rezultatima iz prethodnih istraživanja [164].

Mangan je bitan element uključen u nekoliko fizioloških funkcija ljudskog tijela, ali stalna akumulacija Mn dovodi do povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), što pridonosi disfunkciji mitohondrija, fragmentaciji DNA i apoptozi [173]. Iako su razine oslobođenog mangana niske, još uvijek su više za standardnu SS slitinu u usporedbi s hipoalergenom slitinom, s vremenom uranjanja kao najvažnijim faktorom.

Preporučeni prehrambeni dodaci (engl. *Recommended Dietary Allowances*, RDA) opisuju dnevne prehrambene razine unosa molibdena za različite dobne skupine, sugerirajući da su djeca različitih dobnih skupina prilično osjetljiva na razine unosa, iako su dokazi o utjecaju na ljudsko zdravlje ograničeni [174]. Podaci o imunotoksičnosti molibdena također su ograničeni,

s prijavljenih približno 3 % pacijenata sa stentovima od nehrđajućeg čelika, koji su također imali odgođenu kontaktnu preosjetljivost na molibden. Potrebna su daljnja istraživanja utjecaja molibdena na ljudsko zdravlje [175]. Molibden se dodaje hipoalergenom SS-u bez nikla u cilju poboljšanja njegove otpornosti na koroziju [176], a oslobađanje Mo iz ove slitine bilo je najmanje među svima promatranima. Također, oslobađanje željeza iz SS-a bez nikla mnogo je niže od standardne SS slitine; prema tome, potencijalni štetni učinak njihove kombinacije je nizak.

Izvori minerala i elementi kao što su krom, željezo i mangan, između ostalog, neophodni su za ljude jer su uključeni u razne metaboličke funkcije, aktivnosti enzima, receptorska mjesta, hormonsku funkciju i transport proteina u određenim koncentracijama, koje se mogu regulirati do neke mjere, ali prekomjerno opterećenje može rezultirati nizom nepovoljnih staničnih odgovora, od proizvodnje ROS do oštećenja DNA i proteina, stanične apoptoze i karcinogeneze [177–180].

Ukupan unos različitih elemenata trebao bi biti što je moguće niži, jer raznovrsne interakcije između metala u ljudskom tijelu tek treba detaljno istražiti. Naše je istraživanje pokazalo da bi bilo potrebno preporučivati NiTi-p žice umjesto standardnih NiTi, nehrđajući čelik bez nikla umjesto standardnog nehrđajućeg čelika, a TiMb slitina trebala bi biti preferirani izbor u odnosu na one kobalta i kroma. Na taj bi se način ukupan unos raznih metala sveo na minimum. Osim toga, kako zakonodavna tijela razlikuju preporučene dnevne unose za djecu i odrasle, još je važnije da ukupni dnevni unos kod djece bude što niži.

Izmjerene koncentracije specifičnih metalnih iona otpuštenih iz ortodontskih žica nisu bile iznad preporučenih razina za dnevni unos. Unatoč tome, treba uzeti u obzir reakcije preosjetljivosti i moguće sinergističke učinke mješavina metala. Osim toga, veća dnevna doza metalnih iona mogla bi se dobiti ako se u obzir uzme izloženost drugim izvorima (npr. unos putem hrane, kozmetike, itd.).

Ograničenje je našeg istraživanja što je istraživano otpuštanje iona isključivo *in vitro* uvjetima, a istraživanje pokazuje da bi stvarno otpuštanje iona moglo biti i veće *in vivo* [158, 159, 181], što predstavlja veću prijetnju ljudskom zdravlju, osobito pri smanjenim količinama antioksidansa kod imunokompromitiranih osoba ili uz dodatne rizike za otpuštanje metalnih iona iz drugih izvora (dentalna rehabilitacija, umjetni kukovi, stentovi itd.) [160, 176, 180].

5.2.2. Analiza rezultata mjerenja induktivno spregnutom plazmom (ICP) na kvaščevoj podlozi

Tijekom izrade doktorata naišli smo na niz problema s postavljanjem i provođenjem zamišljenih pokusa. Tako se iscrpine u umjetnu slinu nisu mogle adekvatno koristiti za pokuse s kvascima i nametnula se potreba za provođenjem pokusa s kvaščevom podlogom kao medijem i testiranjem količine i vrste otpuštenih iona i u taj medij. Dokazano je da takav proteinima i šećerima bogat medij potiče drugačije otpuštanje metalnih iona, te da su te količine veće u odnosu na umjetnu slinu [182]. I u ovom istraživanju smo dobili slično – ukupno veće otpuštanje metalnih iona, i pojedini metalni ioni su otpušteni u različitim količinama u oba testirana medija. Različita količina i vrsta otpuštenih metalnih iona može se pripisati lakšem stvaranju protektivnog sloja u umjetnoj slini kao mediju, u odnosu na podlogu bogatu proteinima koji kompleksiraju metalne ione i onemogućuju stvaranje protektivnog oksidnog sloja [182].

Rezultati ICP-MS analiza na kvaščevoj podlozi pokazali su znatno više razine otpuštanja metalnih iona nego što je to bilo zabilježeno u umjetnoj slini. Ova razlika može se pripisati različitim kemijskim svojstvima podloge, jer kvaščeva podloga sadrži komponente koje mogu djelovati kelirajuće ili olakšati otapanje metala, dok umjetna slina ima stabilizirajući učinak i bliže oponaša oralni okoliš. Ovakva metodološka usporedba ukazuje na važnost odabira medija prilikom procjene biokompatibilnosti materijala. Najizraženije otpuštanje željeza pri obje pH-vrijednosti potvrđuje nalaze da čelične žice, a djelomično i CoCr legure, predstavljaju značajan izvor iona Fe, što je u skladu s prethodnim zapažanjima o snažnoj indukciji SOD1 i SOD2 kod tih materijala. Neočekivano otpuštanje Fe iz CoCr legure posebno je važno jer može doprinijeti oksidativnom stresu, iako taj element nije deklariran u sastavu. Ovaj nalaz podržava ranija opažanja da se u uvjetima korozije iz dentalnih slitina mogu oslobađati i elementi koji nisu nominalno navedeni [132, 133]. Otpuštanje Co i Cr bilo je najizraženije iz CoCr legure, što se poklapa s visokim ekspresijskim odgovorom SOD2 i katalaze zabilježenim u staničnim testovima. S obzirom na poznatu sposobnost Co i Cr iona da induciraju stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta [134], ovakav nalaz dodatno povezuje kemijski profil otpuštanja s biološkim odgovorom. U čeličnoj žici bez nikla zabilježene su povišene koncentracije Al i Mn, što potvrđuje složenost slitinskog sastava i mogućnost otpuštanja neočekivanih elemenata. Slično, TMA žica pri pH 6,6 otpuštala je najveće količine Cr i Cu, iako Cu nije deklariran, što može objasniti djelomično specifičan obrazac ekspresije enzima kod TMA legura. NiTi žice su, očekivano, otpuštale najviše iona Ni i Ti, s izraženim povećanjem pri pH 6,6 (do pet puta više

nego pri pH 5,5). To se dobro uklapa s nalazima snažne indukcije GSH i katalaze pri kiselijim uvjetima, a smanjenog odgovora pri neutralnijem pH. Ovi rezultati potvrđuju da se eluirani nikal i titanij snažno odražavaju na oksidativne signalne putove [135, 136]. Posebno je zanimljivo da rodijem i zlatom presvučene inačice NiTi žica nisu otpuštale značajne količine iona, što potvrđuje ranije izvještaje da plemenite obloge mogu djelovati zaštitno [137], premda su naši rezultati na razini ekspresije enzima pokazali da takve prevlake ponekad induciraju i nepredvidive promjene (npr. RhNiTi kod katalaze). Općenito, profil otpuštanja metala u kvaščevoj podlozi pokazuje i elemente koji nisu deklarirani (Al, Cu, Fe u CoCr), što otvara važna pitanja o skrivenim izvorima bioloških učinaka i potvrđuje da složeni sustavi korozije u stvarnim uvjetima ne moraju odgovarati tehničkim deklaracijama proizvođača.

5.3. Promjene mehaničkih svojstava

Promjena pH sline ne izaziva značajnu promjenu u mehaničkim svojstvima standardnih žica, kao ni kod njihovih hipoalergijskih inačica, osim kod NiTi s prevlakom. Prethodno je uočeno da su rezultati dobiveni tehnikom nanoindentiranja osjetljiviji na hrapavost površine [157], te se zabilježene vrijednosti mogu pripisati premazu, a ne osnovnom materijalu [157]. Iako su rezultati, u širem smislu, slični dobivenima u prijašnjim istraživanjima [35, 55, 62, 65, 156, 157], za svaku vrstu slitine, nije utvrđen utjecaj promjene pH sline na promjenu mehaničkih svojstava. Uočeno je da „standarde“ slitine imaju veće vrijednosti tvrdoće i modula elastičnosti od svojih hipoalergenih inačica, što bi se moglo uzeti u obzir pri izboru materijala za klinički rad, budući da elastičniji materijali mogu kroz duže vrijeme otpuštati kontinuirane niže sile potrebne za pomak zuba na atraumatski način.

5.4. Analiza površine mikroskopom atomskih sila (AFM)

Važno je primijetiti da je hrapavost površine povezana s povećanom osjetljivošću na koroziju, što rezultira povećanim otpuštanjem metala. Kao što je gore navedeno, povećane količine nikla i titanija u usnoj šupljini i susjednim mekim tkivima [154, 155] mogu predstavljati opasnost u izravnom kontaktu sa stanicama, bilo u razvoju kontaktnih alergija, bilo modificiranjem imunološkog odgovora povezanog s atopijskom alergijom putem stafilokoknih infekcija [151, 156].

NiTi otpušta više iona nikla i titanija u odnosu na NiTi-p, rezultati AFM-a ukazuju na opću koroziju i ravnomjerno trošenje površine, dok se kod žice s prevlakom događa jamičasta korozija [34, 35, 36, 153].

Površinska hrapavost SS bez nikla je puno veća od standardne SS žice vjerojatno zbog toga što su, umjesto nikla, dodani u većem broju drugi metali. Korozijom u slini, početne se razlike u promatranim parametrima hrapavosti povećavaju, više pri nižem pH, na što ukazuju i slike, a sukladno je i nalazima Alsabti i sur. [63].

Rezultati za CoCr i TMA dobro ilustriraju promjene površinske hrapavosti uslijed otpuštanja iona, tj. pojave korozije. Usporedbom rezultata proizlazi zaključak da TMA slitina manje mijenja površinsku hrapavost u odnosu na kontrolu kad je uronjena u slinu pH-vrijednosti 6,6,

nešto više nakon pH 5,5, što je podudarno s povećanim otpuštanjem iona titanija pri pH 5,5. Dobiveni rezultati su slični prethodno objavljenima, i potvrđuju više vrijednosti površinske hrapavosti u odnosu na CoCr i SS žice [63].

Kod CoCr slitine dolazi do manjeg porasta hrapavosti površine u pH 5,5, a znatno više u pH 6,6. To se događa zbog jače opće korozije pri pH 5,5 kod koje dolazi do ravnomjernog trošenja materijala, što je popraćeno i povećanim otpuštanjem iona kobalta i nikla, što je vidljivo i na rezultatima za ICP u umjetnoj slini. Površinska hrapavost im je slična SS žicama [63].

Na provedenim analizama nije bilo moguće provesti statističke analize pa nije moguće donijeti generalizirane zaključke o korelaciji uočenih promjena na površini i otpuštenih metalnih iona.

5.5. Analiza površine skenirajućim elektronskim mikroskopom / energijskom disperzivnom spektroskopijom (SEM/EDX)

Rezultati SEM/EDX analiza pružaju detaljan uvid u korozivno ponašanje dentalnih slitina u uvjetima umjetne sline različitog pH tijekom 28 dana. Generalno, potvrđuje se obrazac već opažen u biološkim testovima: niži pH (5,5) značajno ubrzava koroziju i degradaciju materijala, dok je pri pH 6,6 očuvana bolja stabilnost zbog stvaranja pasivnih oksidnih slojeva. NiTi slitina pokazala je izraženu površinsku degradaciju pri pH 5,5, s povećanom hrapavošću, udubljenjima i smanjenjem sadržaja Ni i Ti. Ovo je u skladu s ICP-MS nalazima o značajnom otpuštanju Ni i Ti iona te s visokom indukcijom GSH i katalaze u staničnim modelima. Pri pH 6,6 materijal je pokazivao bolju otpornost, a lokalna područja oksidacije upućuju na stvaranje zaštitnog TiO_2 sloja, što je potvrđeno i u literaturi [132, 133]. NiTi s prevlakom Rh pokazao je također povišene razine oksidacije pri pH 5,5, ali s manjim gubitkom titanija u odnosu na nepresvučeni NiTi. Ovi nalazi potvrđuju ranije opažanje da plemenite prevlake modificiraju korozivne procese [134], iako ne sprječavaju u potpunosti otpuštanje iona, što se očitovalo u ekspresijskim analizama enzima (npr. smanjena ekspresija SOD2, ali povišena katalaze kod RhNiTi). Čelična žica pri pH 5,5 pokazala je znakove inicijalne korozije, dok se pri pH 6,6 uočava značajan porast udjela kisika i stvaranje pasivnog sloja. Povećana prisutnost natrija ukazuje na površinsko taloženje minerala iz sline. Ovi nalazi odgovaraju visokoj indukciji SOD1 i SOD2 u biološkim pokusima, što se može pripisati otpuštanju Fe i Cr iona potvrđenom ICP analizom [136]. Čelična žica bez nikla pokazala je još izraženiju oksidaciju pri pH 5,5, uz značajan gubitak Fe i Cr te taloženje Ti, Si i Al. Ova neočekivana prisutnost elemenata vjerojatno je posljedica kompleksnih

korozivnih reakcija i potvrđuje nalaze ICP analize o otpuštanju nedeklariranih iona. Pri pH 6,6 žica je zadržala veći udio osnovnih elemenata, a prisutnost Na, F i K ukazuje na površinsku interakciju s komponentama umjetne sline. Biološki, ovakvi nalazi dobro se podudaraju s visokom indukcijom SOD1 i stabilnijim profilom GSH. CoCr slitina bila je posebno osjetljiva pri pH 5,5, gdje je zabilježeno smanjenje udjela Co i Cr uz izražen porast oksidacije. Ova promjena odgovara nalazima ICP-MS (visoko otpuštanje Co i Cr) i pojačanoj ekspresiji SOD2 i katalaze. Pri pH 6,6, sastav je bio stabilniji, s vrijednostima bližima kontrolnom uzorku, potvrđujući da blago neutralan okoliš štiti leguru pasivnim slojem, što je u skladu s ranijim opažanjima [137]. TMA žica pokazala je najveću otpornost na koroziju. Pri oba pH sadržaj Ti ostaje stabilan, a povećanje kisika ukazuje na formiranje zaštitnog sloja oksida. Gubitak Mo i Sn pri pH 6,6 bio je umjeren, što potvrđuje dobru biokompatibilnost i otpornost legura na bazi titanija. Biološki, ovaj profil objašnjava zašto TMA žica pokazuje manje konzistentne obrasce ekspresije antioksidativnih enzima u usporedbi s CoCr ili NiTi. Općenito, rezultati SEM/EDX analiza u potpunosti potvrđuju nalaze razine korozije, otpuštanja iona i biološkog odgovora (povišena ekspresija GSH, SOD i katalaze). Legure koje otpuštaju najviše iona (NiTi, CoCr, SS) pokazuju i najveću aktivaciju oksidativnih enzima, dok otpornije legure poput TMA pokazuju blaže odgovore. Ovi nalazi dodatno potvrđuju važnost pH kao presudnog čimbenika u modulaciji biokompatibilnosti ortodontskih žica.

Rezultati ovog istraživanja jasno pokazuju da su sastav slitine, površinska obrada i okolišni uvjeti (pH) presudni čimbenici koji određuju korozivno ponašanje dentalnih slitina i posljedične biološke učinke. Integracijom podataka dobivenih molekularno-biološkim metodama (ekspresija antioksidativnih enzima), kemijskim analizama (ICP-MS) i površinskim analizama (SEM/EDX) uočava se konzistentan obrazac: niži pH (5,5) potiče intenzivnu koroziju, veće otpuštanje iona i jaču aktivaciju oksidativnih mehanizama u stanicama, dok blago neutralan pH (6,6) ublažava degradaciju zahvaljujući stvaranju pasivnih oksidnih slojeva.

Glutation-sintetaza (GSH) izraženo se inducirala kod NiTi žica pri pH 5,5, dok je rodijeva prevlaka (RhNiTi) izazvala njenu supresiju, potvrđujući da površinske obloge mogu značajno izmijeniti ali ne i u potpunosti spriječiti stanični odgovor [132, 133]. Čelične žice bez nikla pokazale su povišenu ekspresiju, što sugerira da Fe i Cr imaju veću ulogu u oksidativnom stresu od samog nikla [1134]. Superoksid dismutaza 1 (SOD1) bila je najviše inducirana pri pH 5,5 kod čeličnih žica bez nikla i CoCr slitina. Kod pH 6,6 ekspresija je uglavnom bila utišana, što ukazuje na jasnu povezanost između kiselog okoliša, povećanog otpuštanja iona i jače

aktivacije oksidativnih putova [134, 135]. Superoksid dismutaza 2 (SOD2) posebno je bila inducirana kod NiTi i CoCr žica pri pH 5,5 (do 27 puta u odnosu na kontrolu). Prevlaka rodija značajno je smanjila ovaj odgovor, dok je pri pH 6,6 gotovo sva ekspresija bila supresirana osim kod CoCr žice. Ovaj obrazac potvrđuje ulogu iona Co i Cr u održavanju oksidativnog potencijala i u neutralnijim uvjetima [135, 136]. Katalaza (CAT) pokazala je drugačiji obrazac – inducirana je i pri pH 6,6. Najveća ekspresija zabilježena je kod NiTi pri pH 5,5 (26 puta više od kontrole) te kod CoCr, dok je RhNiTi u ovom slučaju djelovao stimulativno. To potvrđuje da katalaza, kao enzim uključen u razgradnju H_2O_2 , reagira na sekundarne produkte oksidativnog stresa i pokazuje širi raspon fiziološke reaktivnosti [134, 137].

ICP-MS rezultati na kvaščevoj podlozi pokazali su znatno veće koncentracije otpuštenih iona nego u umjetnoj slini. Najviše se otpuštao Fe (čelične i CoCr žice), zatim Co i Cr iz CoCr, Ni i Ti iz NiTi, dok su Al, Mn i Cu neočekivano detektirani i u slitinama u kojima nisu deklarirani. Rodijem i zlatom presvučene NiTi žice otpuštale su minimalne količine iona. Ovi rezultati objašnjavaju zašto su u biološkim testovima najizraženiji odgovori zabilježeni kod NiTi, CoCr i čeličnih žica, dok su TMA žice pokazale stabilniji profil [132, 136, 137].

Površinske analize potvrdile su nalaze ICP i ekspresijskih testova. NiTi žice pokazale su izraženu koroziju pri pH 5,5, s gubitkom Ni i Ti i povećanim sadržajem kisika, dok je pri pH 6,6 došlo do stvaranja pasivnog oksidnog sloja. Rh i Au prevlake smanjile su degradaciju, ali nisu spriječile oksidaciju i gubitak titanija [134]. Čelične i CoCr žice pokazale su značajnu oksidaciju pri pH 5,5, uz gubitak osnovnih elemenata i pojavu kontaminanata (Sr, Na, C), dok je pri pH 6,6 došlo do stabilizacije zahvaljujući pasivnim slojevima. Čelična žica bez nikla pokazala je značajnu oksidaciju uz gubitak Fe i Cr i taloženje neočekivanih elemenata (Ti, Al, Si), potvrđujući kompleksne procese korozije. TMA žica bila je najotpornija, s minimalnim promjenama u sastavu i stabilnim udjelom Ti, što potvrđuje njezinu dobru otpornost na koroziju i kompatibilnost.

Integracijom svih analiza jasno se potvrđuje povezanost između otpuštanja iona, korozije površine i biološkog oksidativnog odgovora. Najizraženiji odgovori zabilježeni su kod materijala koji otpuštaju najviše iona (NiTi, CoCr, čelične žice), dok su materijali poput TMA pokazali stabilniji kemijski i biološki profil.

6. ZAKLJUČAK

Oslobađanje metala iz dentalnih ortodontskih slitina *in vitro* ukupno je niže za hipoalergene ekvivalente u usporedbi sa standardnim dentalnim slitinama. Niži pH umjetne sline uglavnom je uzrokovao veće početno i ukupno oslobađanje metalnih iona. NiTi je otpustio više metalnih iona titanija i nikla u usporedbi s NiTi-p. Nehrdajući čelik oslobađa više željeza, kroma i nikla u usporedbi s čelikom bez nikla. CoCr oslobađa kobalt u visokoj koncentraciji a niske količine kroma, nikla, i molibdena u usporedbi s molibdenom i titanijem koje oslobađa TMA. Nije uočena statistički značajna promjena parametara površinske hrapavosti promatranih žica promjenom pH umjetne sline. Promjena pH sline nema statistički značajan utjecaj na tvrdoću i Youngov modul elastičnosti promatranih žica u različitom pH sline, osim za NiTi-p. Ne očekuje se znatan utjecaj na klinički rad, jer su zabilježene promjene povezane za promjene površine, a ne osnovnog materijala. Preporuke za klinički rad su vođene manjim otpuštanjem metalnih iona iz promatranih slitina, pa se daje prednost korištenju hipoalergenih inačica.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da eluirani metalni ioni iz ortodontskih žica induciraju različite obrasce ekspresije antioksidativnih enzima ovisno o vrsti legure i pH okoliša. NiTi i CoCr žice pokazale su najsnažniji potencijal za indukciju GSH, SOD i katalaze, dok su čelične žice bez nikla ukazale na ključnu ulogu željeza i kroma u poticanju oksidativnog odgovora. Površinska prevlaka rodija pokazala je dvosmjerne učinke – supresiju SOD2, ali indukciju katalaze – što potvrđuje složenost interakcije između zaštitnih slojeva i otpuštanja iona. Ovi nalazi ukazuju da biokompatibilnost ortodontskih materijala nije statična, već dinamično ovisi o mikrookolišnim uvjetima, posebice o pH. Stoga se pri odabiru materijala u kliničkoj praksi mora uzeti u obzir da promjene u oralnom okolišu mogu značajno modificirati stanični odgovor, što ima važnost za sigurnost i dugoročnu stabilnost terapije.

Mjerenja ICP-MS na kvaščevoj podlozi potvrdila su da se oslobađaju znatno veće količine iona nego u umjetnoj slini, što ukazuje na važnost medija u procjeni korozivnog potencijala. Najviše su se otpuštali Fe, Co, Cr, Ni i Ti, pri čemu su čelične i CoCr žice te NiTi bile dominantni izvori. Kombinacijom ovih kemijskih nalaza i prethodnih podataka o ekspresiji antioksidativnih enzima može se zaključiti da postoji jasna povezanost između otpuštanja iona i aktivacije oksidativnog odgovora stanica. Najizraženiji odgovori zabilježeni su kod legura koje otpuštaju

visoke razine Fe, Co, Cr i Ni, što potvrđuje da upravo ti elementi imaju najveći potencijal za induciranje oksidativnog stresa i bioloških posljedica.

SEM/EDX analiza pokazala je da NiTi, CoCr i SS prolaze kroz značajnu koroziju pri kiselom pH (5,5), što dovodi do gubitka osnovnih elemenata, povećane oksidacije i pojave nedeklariranih elemenata na površini. Pri pH 6,6 sve su legure pokazale veću stabilnost, najčešće zbog formiranja zaštitnih oksidnih slojeva. Plemenite prevlake (Rh, Au) usporile su, ali nisu spriječile degradaciju, dok je TMA slitina pokazala najveću otpornost. Kombinacija morfoloških i kemijskih analiza (SEM/EDX, ICP) s biološkim testovima (ekspresija antioksidativnih enzima) jasno potvrđuje da oslobađanje iona i korozija imaju izravnu vezu s oksidativnim odgovorom stanica. Ovi nalazi naglašavaju da se pri odabiru ortodontskog materijala moraju uzeti u obzir ne samo nominalni sastav legure nego i potencijalna korozivna ponašanja u realnim oralnim uvjetima, gdje pH može značajno varirati.

Ovo istraživanje pokazalo je da dentalne ortodontske žice različitog sastava izazivaju različite razine korozije i otpuštanja iona, što izravno utječe na stanični oksidativni odgovor. NiTi i CoCr žice uzrokuju najsnažnije promjene, s izraženim otpuštanjem Ni, Ti, Co i Cr iona, što dovodi do snažne indukcije antioksidativnih enzima (GSH, SOD, katalaza). Čelične žice (s ili bez nikla) pokazuju značajnu oksidaciju, pri čemu Fe i Cr imaju dominantnu ulogu u oksidativnom stresu. TMA žica pokazala se najstabilnijom, s minimalnim otpuštanjem iona i konzistentnim površinskim sastavom. Rodijeve i zlatne prevlake smanjile su otpuštanje iona, ali nisu potpuno eliminirale korozivne i biološke učinke. pH se pokazao ključnim čimbenikom: kiselo okruženje (5,5) značajno pojačava koroziju, otpuštanje iona i stanični stres, dok neutralniji pH (6,6) potiče stvaranje pasivnih oksidnih slojeva i djelomičnu zaštitu.

Svi ovi nalazi imaju jasne kliničke implikacije jer uvjeti u usnoj šupljini nisu konstantni – pH varira ovisno o prehrani, higijeni i upalnim procesima. Stoga odabir ortodontskog materijala mora uključivati procjenu njegove otpornosti na koroziju u realnim oralnim uvjetima, a ne samo deklarirani kemijski sastav.

7. LITERATURA

1. Bradley TG, Berzins DW, Valeri N, Pruszyński J, Eliades T, Katsaros C. An investigation into the mechanical and aesthetic properties of new generation coated nickel-titanium wires in the as-received state and after clinical use. *Eur J Orthod.* 2014;36(3):290-6.
2. Upadhyay D, Panchal A, Dubey S, Srivastava K. Corrosion of alloys used in dentistry: A review. *Mat Sci Eng.* 2006;432:11.
3. Schmalz G, Garhammer P. Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues. *J Dent Mater.* 2002;18:396-406.
4. Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR. *Phillip's Science of Dental Materials.* 12th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2013. str. 571.
5. Knosp H, Holliday R, Corti CW. Gold in dentistry: Alloys, uses and performance. *Gold Bull.* 2003;36(3):93-102.
6. Asri RIM, Harun WSW, Samykano M i sur. Corrosion and surface modification on biocompatible metals: A review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;77:1261-74.
7. Vaicelyte A, Janssen C, Borgne ML, Grosogeat B. Cobalt–Chromium Dental Alloys: Metal Exposures, Toxicological Risks, CMR Classification, and EU Regulatory Framework. *Crystals.* 2020;10(12):1151.
8. Gopinath M. Chapter 1b Metallic Biomaterials: Cobalt-Chromium Alloys. U: Narayan R, urednik. *Metallic Biomaterials: New Directions and Technologies.* Springer; 2016.
9. Alnazzawi A. Effect of Fixed Metallic Oral Appliances on Oral Health. *J Int Oral Health.* 2018;10(1):1-5.
10. Zhao YY, Cao CL, Liu YL i sur. Genetic analysis of oxidative and endoplasmic reticulum stress responses induced by cobalt toxicity in budding yeast. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects.* 2020;1864(3):129516.
11. Kirana SS, Auerkari EI. Genotoxicity of NiTi orthodontic wires induced by the release of metal ions. *AIP Conf Proc.* 2021;2345(1):020001.
12. Quintão LM, DMLCC A. The Release of Ions from Metallic Orthodontic Appliances. *Semin Orthod.* 2010;16(4):258-69.

13. Brantley WA, Berzins DW, Iijima M, Tüfekçi E, Cai Z. Structure/property relationships in orthodontic alloys. U: *Orthodontic Applications of Biomaterials*. Woodhead Publishing; 2017. str. 3-20.
14. Arango SC, Pelaez-Vargas A, García C. Coating and Surface Treatments on Orthodontic Metallic Materials. *Coatings*. 2013;3(1):1-15.
15. Oh KT, Kim YS, Park YS, Kim KN. Properties of super stainless steels for orthodontic applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004;69(2):183-94.
16. Sifakakis I, Eliades T. Adverse reactions to orthodontic materials. *Aust Dent J*. 2017;62 Suppl 1:20-8.
17. Nicholson JW. Titanium Alloys for Dental Implants: A Review. *Prosthesis*. 2020;2(2):100-12.
18. Zanza A, D'Angelo M, Reda R, Gambarini G, Testarelli L, Nardo DD. An Update on Nickel-Titanium Rotary Instruments in Endodontics: Mechanical Characteristics, Testing and Future Perspective—An Overview. *Bioengineering*. 2021;8(12):218.
19. Jorge JRP, Barão VAR, Délben JA, Faverani LP, Queiroz TP, Assunção WG. Titanium in Dentistry: Historical Development, State of the Art and Future Perspectives. *J Indian Prosthodont Soc*. 2012;12(4):209-17.
20. Green J. Orthodontic appliances for patients with a nickel allergy. *Dent Nurs*. 2013;9(9):504-8.
21. Wichai W, Anuwongnukroh N, Dechkunakorn S. Comparison of Chemical Properties and Ni Release of Stainless Steel and Nickel Titanium Wires. *Adv Mater Res*. 2014;884-885:560-4.
22. Hoque ME, Showva N, Ahmed M i sur. Titanium and titanium alloys in dentistry: current trends, recent developments, and future prospects. *Heliyon*. 2022;8(11):e11300.
23. Gubbi P, Wojtisek T. The role of titanium in implant dentistry. In: Narayan R, editor. *Metallic Biomaterials: New Directions and Technologies*. Springer; 2018. str. 437-56.
24. Chaturvedi T. An overview of the corrosion aspect of dental implants (titanium and its alloys). *Indian J Dent Res*. 2009;20(1):91-8.
25. Laing PG, Ferguson AB, Hodge ES. Tissue reaction in rabbit muscle exposed to metallic implants. *J Biomed Mater Res*. 1967;1(1):135-49.
26. Weltman B, Vig KW, Fields HW, Shanker S, Kaizar EE. Root resorption associated with orthodontic tooth movement: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2010;137(4):462-76.

27. Lijima M, Yuasa T, Endo K, Muguruma T, Ohno H, Mizoguchi I. Corrosion behavior of ion implanted nickel-titanium orthodontic wire in fluoride mouth rinse solutions. *Dent Mater J*. 2010;29(1):53-8.
28. Lee SP, Lee SJ, Lim BS, Ahn SJ. Surface characteristics of orthodontic materials and their effects on adhesion of mutans streptococci. *Angle Orthod*. 2009;79(2):353-60.
29. Khoroushi M, Kachuie M. Prevention and treatment of white spot lesions in orthodontic patients. *Contemp Clin Dent*. 2017;8(1):11-9.
30. Arneberg P, Giertsen E, Emberland H, Ogaard B. Intra-oral variations in total plaque fluoride related to plaque pH. A study in orthodontic patients. *Caries Res*. 1997;31(6):451-6.
31. Law V, Seow WK, Townsend G. Factors influencing oral colonization of mutans streptococci in young children. *Aust Dent J*. 2007;52(2):93-100.
32. Katić V, Ćurković L, Ujević Bošnjak M, Špalj S. Determination of corrosion rate of orthodontic wires based on nickel-titanium alloy in artificial saliva. *Materialwiss Werkst*. 2014;45(2):99-105.
33. Katic V, Curkovic L, Bosnjak MU, Peros K, Mandic D, Spalj S. Effect of pH, fluoride and hydrofluoric acid concentration on ion release from NiTi wires with various coatings. *Dent Mater J*. 2017;36(2):149-56.
34. Rongo R, Ametrano G, Gloria A i sur. Effects of intraoral aging on surface properties of coated nickel-titanium archwires. *Angle Orthod*. 2014;84(4):665-72.
35. Iijima M, Muguruma T, Brantley W i sur. Effect of coating on properties of esthetic orthodontic nickel-titanium wires. *Angle Orthod*. 2012;82(2):319-25.
36. da Silva DL, Mattos CT, Sant' Anna EF, Ruellas AC, Elias CN. Cross-section dimensions and mechanical properties of esthetic orthodontic coated archwires. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013;143(4 Suppl):S85-91.
37. M, Topfl E. Electrolytes for corrosion testing of dental alloys. *J Dent Res*. 1986;65(3):301.
38. Gözl L, Papageorgiou SN, Jäger A. Nickel hypersensitivity and orthodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *Contact Dermatitis*. 2015;73(1):1-14.
39. Kishore S, Felicita AS, Siva S. 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*. 2021;10(20):1539.
40. Wichelhaus A, Geserick M, Hibst R, Sander FG. The effect of surface treatment and clinical use on friction in NiTi orthodontic wires. *J Dent Mater*. 2005;21(10):938-45.

41. Lucchese A, Carinci F, Brunelli G, Monguzzi R. An in vitro study of resistance to corrosion in brazed and laser welded orthodontic appliances. *EJ Inflamm.* 2011;9(1):67-72.
42. Pearce D, Sherman F. Toxicity of Copper, Cobalt, and Nickel Salts Is Dependent on Histidine Metabolism in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1999;181(15):4774-7.
43. Katić V, Mandić V, Ježek D, Baršić G, Špalj S. Influence of various fluoride agents on working properties and surface characteristics of uncoated, rhodium coated and nitrified nickel-titanium orthodontic wires. *Acta Odontol Scand.* 2015;73(4):241-9.
44. Furlan TPR, Barbosa JA, Basting RT. Nickel, copper, and chromium release by CuNi-titanium orthodontic archwires is dependent on the pH media. *J Int Oral Health.* 2018;10(5):224-8.
45. Jamilian A, Moghaddas O, Toopchi S, Perillo L. Comparison of nickel and chromium ions released from stainless steel and NiTi wires after immersion in Oral B®, Orthokin® and artificial saliva. *J Contemp Dent Pract.* 2014;15(4):403-6.
46. Venkatesan K, Kailasam V, Padmanabhan S. Evaluation of titanium dioxide coating on surface roughness of nickel-titanium archwires and its influence on *Streptococcus mutans* adhesion and enamel mineralization: A prospective clinical study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2020;158(2):199-208.
47. Primožič J, Poljšak B, Jamnik P, Kovač V, Čanadi Jurešić G, Špalj S. 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 (Basel).* 2021;10(9):1359.
48. Quadras D, Nayak U, Kumari N, Priyadarshini H, Gowda S, Fernandes B. In vivo study on the release of nickel, chromium, and zinc in saliva and serum from patients treated with fixed orthodontic appliances. *J Dent Res.* 2019;16(3):209-15.
49. Schmalz G, Garhammer P. Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues. *J Dent Mater.* 2002;18(6):396-406.
50. Ashique Abdulhameed S, Brijesh S, Sunny J, Goswami DS, Abraham N, Asha Ambroise M. Comparison of Surface Roughness of Different Orthodontic Archwires: Atomic Force Microscopic Study. *Cureus.* 2024;16(1):e51516.
51. Yu J, Huang H. Surface roughness and topography of four commonly used types of orthodontic archwire. *J Med Biol Eng.* 2011;31(5):367-70.

52. Sheibaninia A, Salehi A, Asatourian A. Comparison of Spring Characteristics of Titanium-Molybdenum Alloy and Stainless Steel. *J Clin Exp Dent*. 2018;10(1):84-90.
53. Kim I, Park H, Kyung Y, Kim K, Kwon T. Comparative short-term in vitro analysis of mutans streptococci adhesion on esthetic, nickel-titanium, and stainless-steel arch wires. *Angle Orthod*. 2014;84(4):680-6.
54. Ryu SH, Lim BS, Kwak EJ, Lee GJ, Choi S, Park KH. Surface ultrastructure and mechanical properties of three different white-coated NiTi archwires. *Scanning*. 2015;37(5):414-21.
55. Da Silva DL, Mattos CT, Sant Anna EF, Ruellas AC, Elias CN. Cross-section dimensions and mechanical properties of esthetic orthodontic coated archwires. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013;143(4 Suppl):S85-91.
56. Katić V, Ćurković HO, Semenski D, Baršić G, Marušić K, Špalj S. Influence of surface layer on mechanical and corrosion properties of nickel-titanium orthodontic wires. *Angle Orthod*. 2014;84(6):1041-8.
57. Washington B, Evans CA, Viana G, Bedran-Russo A, Megremis S. Contemporary esthetic nickel-titanium wires: Do they deliver the same forces? *Angle Orthod*. 2015;85(1):95-101.
58. Da Silva DL, Santos E, de Souza Camargo S, de Oliveira Ruellas AC. Infrared spectroscopy, nano-mechanical properties, and scratch resistance of esthetic orthodontic coated archwires. *Angle Orthod*. 2015;85(5):777-83.
59. Rudge P, Sherriff M, Bister D. A comparison of roughness parameters and friction coefficients of aesthetic archwires. *Eur J Orthod*. 2015;37(1):49-55.
60. Choi S, Park DJ, Kim KA, Park KH, Park HK, Park YG. In vitro sliding-driven an overview morphological changes in representative esthetic NiTi archwire surfaces. *Microsc Res Tech*. 2015;78(10):926-34.
61. Mhaske AR, Shetty PC, Bhat NS i sur. Antiadherent and antibacterial properties of stainless steel and NiTi orthodontic wires coated with silver against *Lactobacillus acidophilus*—An in vitro study. *Prog Orthod*. 2015;16(1):40.
62. Elayyan F, Silikas N, Bearn D. Ex vivo surface and mechanical properties of coated orthodontic archwires. *Eur J Orthod*. 2008;30(6):661-7.
63. Alsabti NI, Bourauel CP, Talic NF. Comparison of surface topography of low-friction and conventional TMA orthodontic arch wires using atomic force microscopy. *J Orthod Sci*. 2021;10:2.

64. Suryavanshi S, Lingareddy U, Ahmed N, Neelakantappa KK, Sidiqha N, Minz M. In Vitro Comparative Evaluation of Frictional Resistance of Connecticut New Arch Wires, Stainless Steel and Titanium Molybdenum Alloy Archwires Against Different Brackets. *Cureus*. 2019;11(11):e6131.
65. Iijima M, Muguruma T, Brantley WA i sur. Effect of coating on properties of esthetic orthodontic nickel-titanium wires. *Angle Orthod*. 2012;82(2):319-25.
66. Elayyan F, Silikas N, Bearn D. Ex ViVo surface and mechanical properties of coated orthodontic archwires. *Eur J Orthod*. 2008;30(6):661-7.
67. Lim KF, Lew KK, Toh SL. Bending stiffness of two aesthetic orthodontic archwires: an in vitro comparative study. *Clin Mater*. 1994;16(2):63-71.
68. Usui T, Lwata T, Miyake S i sur. Mechanical and frictional properties of aesthetic orthodontic wires obtained by hard chrome carbide plating. *J Dent Sci*. 2018;13(2):151-9.
69. Kusy RP, Whitley JQ. Effects of surface roughness on the coefficients of friction in model orthodontic systems. *J Biomech*. 1990;23(9):913-25.
70. Da Silva DL, Mattos CT, Simão RA, de Oliveira Ruellas AC. Coating stability and surface characteristics of esthetic orthodontic coated archwires. *Angle Orthod*. 2013;83(6):994-1001.
71. Arango S, Peláez-Vargas A, García C. Coating and surface treatments on orthodontic metallic materials. *Coatings*. 2013;3(1):1-15.
72. Fernández-Miñano E, Calvo JL, Vicente A, Ortiz C, Ortiz AJ. Metallic ion content and damage to the DNA in oral mucosa cells of children with fixed orthodontic appliances. *BioMetals*. 2011;24(5):935-41.
73. Močnik P, Kosec T, Kovač J, Bizjak M. The effect of pH, fluoride and tribocorrosion on the surface properties of dental archwires. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;78:682-9.
74. Abskharon RN, Hassan SH, Kabir MH, Qadir SA, El-Rab SM, Wang MH. The role of antioxidants enzymes of *E. coli* ASU3, a tolerant strain to heavy metals toxicity, in combating oxidative stress of copper. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010;26(2):241-7.
75. Weinmann M, Schnitter C, Stenzel M, Markhoff J, Schulze C, Bader R. Development of bio-compatible refractory Ti/Nb(/Ta) alloys for application in patient-specific orthopaedic implants. *Int J Refract Met Hard Mater*. 2018;75:126-36.

76. Borisov VB, Forte E, Nastasi MR, Siletsky SA. ROS Defense Systems and Terminal Oxidases in Bacteria. *Antioxidants*. 2021;10(6):839.
77. Kailasa SK, Vajubhai GN, Koduru JR, Park TJ. Recent progress of nanomaterials for colorimetric and fluorescence sensing of reactive oxygen species in biological and environmental samples. *Trends Environ Anal Chem*. 2023;37:e00196.
78. Nosaka Y, Nosaka AY. Generation and Detection of Reactive Oxygen Species in Photocatalysis. *Chem Rev*. 2017;117(17):11302-36.
79. Zhao G, Kappler A, Zheng X, Chen B, Wu B, Chu C. Tide-Triggered Production of Reactive Oxygen Species in Coastal Soils. *Environ Sci Technol*. 2022;56(16):11888-96.
80. Kang DH. Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. *AACN Clin Issues*. 2002;13(4):540-9.
81. Koivula MJ, Eeva T. Metal-related oxidative stress in birds. *Environ Pollut*. 2010;158(7):2359-70.
82. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. *Methods Mol Biol*. 2009;594:57-72.
83. He F, Chuang CC, Li J, Zuo L, Yang W, Liu Z. Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in Exercise. *Front Physiol*. 2016;7:486.
84. Thanan R, Ma N, Oikawa S i sur. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int J Mol Sci*. 2014;16(1):193-217.
85. Prasad S, Srivastava SK. Oxidative Stress and Cancer: Chemopreventive and Therapeutic Role of Triphala. *Antioxidants*. 2020;9(1):72.
86. Radak Z, Zhao Z, Goto S, Koltai E. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Mol Aspects Med*. 2011;32(4-6):305-15.
87. Simmons SO, Yeoman K, Fan CY, Ramabhadran R, Wakefield J. NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent. *Curr Chem Genomics*. 2011;5:1-12.
88. Kim HS, Seo YR, Kim YJ. An Overview of Carcinogenic Heavy Metal: Molecular Toxicity Mechanism and Prevention. *J Cancer Prev*. 2015;20(4):232-40.
89. Buha A, Tinkov A, Panieri E i sur. The Role of Toxic Metals and Metalloids in Nrf2 Signaling. *Antioxidants*. 2021;10(5):630.
90. Hanawa T. Metal ion release from metal implants. *Mater Sci Eng C*. 2004;24(6-8):745-52.

91. Metcalfe NB, Alonso-Alvarez C. Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Funct Ecol.* 2010;24(5):984-96.
92. Kovač V, Poljšak B, Jamnik P, Primožič J. Are Metal Ions That Make up Orthodontic Alloys Cytotoxic, and Do They Induce Oxidative Stress in a Yeast Cell Model? *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):7993.
93. Velasco-Ibáñez R, Lara-Carrillo E, Morales-Luckie RA i sur. Evaluation of the release of nickel and titanium under orthodontic treatment. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-10.
94. Zhang D, Wong CS, Li Y, Wen C. Cellular responses of osteoblast-like cells to 17 elemental metals. *J Biomed Mater Res A.* 2016;105(1):148-58.
95. Salloum Z, Lehoux EA, Catelas I, Harper M. Effects of cobalt and chromium ions on oxidative stress and energy metabolism in macrophages in vitro. *J Orthop Res.* 2018;36(12):3178-87.
96. Primožič J, Jamnik P, Poljšak B, Čanadi Jurešić G, Kovač V, Spalj S. 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.* 2021;10(9):1359.
97. Nowicka B. Heavy metal-induced stress in eukaryotic algae—mechanisms of heavy metal toxicity and tolerance with particular emphasis on oxidative stress in exposed cells and the role of antioxidant response. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2022;29(12):16860-911.
98. Tkaczyk C, Antoniou J, Tabrizian M, Huk OL, Petit A, Zukor DJ. Significance of Elevated Blood Metal Ion Levels in Patients with Metal-on-Metal Prostheses: An Evaluation of Oxidative Stress Markers. *Open Orthop J.* 2010;4:221-7.
99. De La Torre-Ruiz M, Sundaran V, Pujol N. Coping with oxidative stress. The yeast model. *Curr Drug Targets.* 2015;16(1):2-12.
100. Rani A, Zuurro A, Bhatia S i sur. Microorganisms: A Potential Source of Bioactive Molecules for Antioxidant Applications. *Molecules.* 2021;26(4):1142.
101. Wysocki R, Tamás MJ. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiol Rev.* 2010;34(6):925-51.
102. Vanderwaeren L, Dok R, Voordeckers K, Nuyts S, Verstrepen KJ. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System for Eukaryotic Cell Biology, from Cell Cycle Control to DNA Damage Response. *Int J Mol Sci.* 2022;23(19):11665.

103. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283(2-3):65-87.
104. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*. 1995;18(2):321-36.
105. Sunitha J, Rajkumari S, Jeeva J, Ramesh M, Ananthalakshmi R, Krishnan R. Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015;7(Suppl 2):S331-3.
106. Ighodaro, OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med*. 2018; 54(4):287-293.
107. Briones-Martin-Del-Campo M, Orta-Zavalza E, Juarez-Cepeda J i sur. The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Rev Iberoam Micol*. 2013;31(1):67-71.
108. Sumner ER, Shanmuganathan A, Sideri TC, Willetts SA, Houghton JE, Avery SV. Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast. *Microbiology (Reading)*. 2005;151(Pt 6):1939-1948.
109. Belozerskaya TA, Gessler NN. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. *Appl Biochem Microbiol*. 2007;43(5):506-15.
110. Wang L, Ahn YJ, Asmis R. Sexual dimorphism in glutathione metabolism and glutathione-dependent responses. *Redox Biol*. 2019;31:101410.
111. Desideri E, Ciccarone F, Ciriolo MR. Targeting Glutathione Metabolism: Partner in Crime in Anticancer Therapy. *Nutrients*. 2019;11(8):1926.
112. Wu G, Fang YZ, Lupton JR, Yang S, Turner ND. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr*. 2004;134(3):489-92.
113. Meister A. The Fall and Rise of Cellular Glutathione Levels: Enzyme-Based Approaches. *Curr Top Cell Regul*. 1985;26:383-94.
114. Perrone G, Shi-Xiong T, Dawes WI. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(7):1354-68.
115. Morgenstern M, Stiller BS, Lubert Ph i sur. Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *J Cell Rep*. 2017;19(13):2836-52.
116. Prokisch H, Scharfe C, Camp DG i sur. Integrative Analysis of the Mitochondrial Proteome in Yeast. *PLoS Biol*. 2004;2(6):e160.
117. Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(9):655-67.

118. Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: Different modes of dying. *Biochemistry (Moscow)*. 2005;70(2):231-9.
119. Dugbartey GJ. Cellular and molecular mechanisms of cell damage and cell death in ischemia–reperfusion injury in organ transplantation. *Mol Biol Rep*. 2024;51(1):1-12.
120. Surova O, Zhivotovsky B. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*. 2012;32(33):3789-97.
121. Čanadi Jurešić G, Čurko-Cofek B, Barbarić M, Mumiši N, Blagović B, Jamnik P. Response of *Saccharomyces cerevisiae* w303 to iron and lead toxicity in overloaded conditions. *Curr Microbiol*. 2021;78(4):1188-201.
122. Canadi Jurešić G, Blagović B. The influence of fermentation conditions and recycling on the phospholipid and fatty acid composition of the brewer's yeast plasma membranes. *Folia Microbiol (Praha)*. 2011;56(3):215-24.
123. Arndt M, Brück A, Scully T, Jäger A, Bourauel C. Nickel ion release from orthodontic Ni-Ti wires under simulation of realistic in-situ conditions. *J Mater Sci*. 2005;40(13):3659-67.
124. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013. Available from: <http://www.R-project.org/>.
125. Kline RB. Principles and Practice of Structural Equation Modelling. New York, NY: Guilford Press; 2016.
126. Wickham H, Averick M, Bryan J i sur. Welcome to the tidyverse. *J Open Source Software*, 2019; 4(43), 1686.
127. Rajter M. reflexR: FLEXTABLE BASED STATISTICS. R package version 0.0.0.9000; 2022. <https://github.com/mrajter/reflexR>
128. Kassambara A. rstatix: Pipe-Friendly Framework for BasicStatisticalTests. R package version 0.7.2, 2023. <<https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>>
129. Gohel D, Skintzos P. flextable: Functions for TabularReporting. R package version 0.9.3, 2023. <<https://CRAN.R-project.org/package=flextable>>
130. Kassambara A. ggpubr: 'ggplot2' BasedPublicationReadyPlots. R package version 0.6.0, 2023. <<https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>>.
131. Kaszycki P, Fedorovych D, Ksheminska H, Babyak L, Wójcik D, Koloczek H. Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. *Microbiol Res*. 2004;159(1):11-17.

132. Uysal I, Yilmaz B, Aykan, Atilla AO, Evis Z. Nickel titanium alloys as orthodontic archwires: A narrative review. *Engineering Sci Tech*. 2022;36:101277.
133. Huang HH. Effects of fluoride concentration and elastic tensile strain on the corrosion resistance of commercially pure titanium. *Biomaterials*. 2002;23(1):59-63.
134. Eliades T, Pratsinis H, Kleetsas D, Eliades G, Makou M. Characterization and cytotoxicity of ions released from stainless steel and NiTi orthodontic alloys. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2004;125(1):24-29.
135. Cimpan MR, Matre R, Cressey LI, Tysnes OB, Lie SA, Gjerdet NR. The effect of metal ions on cell death, reactive oxygen species and interleukin-1 α production in human monocytes. *Biomaterials*. 2005;26(30):4749-4757.
136. Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng R Rep*. 2004;47(3-4):49-121.
137. Mjör IA, Moorhead JE, Dahl JE. Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice. *Int Dent J*. 2000;50(6):361-366.
138. Micronutrients, I. of M. (US) P. on Arsenic, Boron, Nickel, Silicon, and Vanadium. In: *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. Washington, USA: National Academies Press (US); 2001.
139. European Food Safety Authority | Trusted science for safe food. Available from: <https://www.efsa.europa.eu/en> [Accessed 9 Jun 2021].
140. Nickel – Registration Dossier – ECHA. Available from: <https://echa.europa.eu/sl/registration-dossier/-/registered-dossier/15544/1/2> [Accessed 7 Jun 2021].
141. Titanium – Registration Dossier – ECHA. Available from: <https://echa.europa.eu/sl/registration-dossier/-/registered-dossier/15537> [Accessed 7 Jun 2021].
142. Thyssen JP, McFadden JP, Kimber I. The multiple factors affecting the association between atopic dermatitis and contact sensitization. *Allergy*. 2014;69(1):28-36.
143. Fischer LA, Johansen JD, Menné T. Nickel allergy: relationship between patch test and repeated open application test thresholds. *Br J Dermatol*. 2007;157(4):723-9.
144. Fischer LA, Menné T, Johansen JD. Dose per unit area—a study of elicitation of nickel allergy. *Contact Dermatitis*. 2007;56(5):255-61.
145. Fischer LA, Menné T, Johansen JD. Experimental nickel elicitation thresholds—a review focusing on occluded nickel exposure. *Contact Dermatitis*. 2005;52(2):57-64.

- 146.Jensen CS, Menné T, Johansen JD. Systemic contact dermatitis after oral exposure to nickel: a review with a modified meta-analysis. *Contact Dermatitis*. 2006;54(2):79-86.
- 147.Ahlström MG, Thyssen JP, Wennervaldt M, Menné T, Johansen JD. Nickel allergy and allergic contact dermatitis: A clinical review of immunology, epidemiology, exposure, and treatment. *Contact Dermatitis*. 2019;81(4):227-41.
- 148.Jacob SE, Brankov N. Nickel sensitization in children with atopic dermatitis and its relationship to *Staphylococcus* infection. *Pract Dermatol*. 2016;13(1):42-66.
- 149.Hosoki M, Nishigawa K, Miyamoto Y, Ohe G, Matsuka Y. Allergic contact dermatitis caused by titanium screws and dental implants. *J Prosthodont Res*. 2016;60(3):213-9.
- 150.Hosoki M, Nishigawa K, Tajima T, Ueda M, Matsuka Y. Cross-sectional observational study exploring clinical risk of titanium allergy caused by dental implants. *J Prosthodont Res*. 2018;62(4):426-31.
- 151.Egusa H, Ko N, Shimazu T, Yatani H. Suspected association of an allergic reaction with titanium dental implants: a clinical report. *J Prosthet Dent*. 2008;100(5):344-7.
- 152.Müller K, Valentine-Thon E. Hypersensitivity to titanium: clinical and laboratory evidence. *Neuro Endocrinol Lett*. 2006;27 Suppl 1:31-5.
- 153.Sicilia A, Cuesta S, Coma G i sur. Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(8):823-35.
- 154.Fors R, Persson M. Nickel in dental plaque and saliva in patients with and without orthodontic appliances. *Eur J Orthod*. 2006;28(3):292-7.
- 155.Amini F, Borzabadi Farahani A, Jafari A, Rabbani M. In vivo study of metal content of oral mucosa cells in patients with and without fixed orthodontic appliances. *Orthod Craniofac Res*. 2008;11:51-56.
- 156.Bogdali AM, Grazyna A, Wojciech D i sur. Nickel allergy and relationship with *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis. *J Trace Elem Med Biol*. 2016;33:1–7.
- 157.Xia Y, Bigerelle M, Marteau J, Mazeran PE, Bouvier S, Iost A. Effect of surface roughness in the determination of the mechanical properties of material using nanoindentation test. *Scanning*. 2014;36(1):134-149.
- 158.Iijima M, Muguruma T, Brantley WA, Mizoguchi I. Comparisons of nanoindentation, 3-point bending, and tension tests for orthodontic wires. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;140:65-71.
- 159.Huang HH, Chiu YH, Lee TH i sur. Ion release from NiTi orthodontic wires in artificial saliva with various acidities. *Biomaterials*. 2003;24(20):3585-92.

160. Daems J, Celis JP, Willems G. Morphological characterization of as-received and in vivo orthodontic stainless steel archwires. *Eur J Orthod*. 2009;31(3):260-5.
161. Fróis A, Santos AC, Louro CS. Corrosion of Fixed Orthodontic Appliances: Causes, Concerns, and Mitigation Strategies. *Metals*. 2023;13(11):1955.
162. Laird C, Xu X, Yu Q, Armbruster P, Ballard R. Nickel and chromium ion release from coated and uncoated orthodontic archwires under different pH levels and exposure times. *J Oral Biosci*. 2021;63(4):450-4.
163. Jusufi Osmani Z, Poljšak B, Zelenika S i sur. Ion Release and Surface Changes of Nickel–Titanium Archwires Induced by Changes in the pH Value of the Saliva—Significance for Human Health Risk Assessment. *Materials*. 2022;15(6):1994.
164. Cho E, Kanno Z, Yonemitsu I i sur. Effect of rhodium plating on the ion dissolution from nickel-titanium and pure nickel wires. *Asian Pac J Dent*. 2022;22(1):21-8.
165. Chikhale R, Akhare P, Umre U i sur. In Vitro Comparison to Evaluate Metal Ion Release: Nickel-Titanium vs. Titanium-Molybdenum Orthodontic Archwires. *Cureus*. 2024;16(1):e56595.
166. Bonefeld CM, Nielsen MM, Vennegaard MT, Johansen JD, Geisler C, Thyssen JP. Nickel acts as an adjuvant during cobalt sensitization. *Exp Dermatol*. 2015;24(3):229-31.
167. Tibau AV, Grube BD, Velez BJ, Vega VM, Mutter J. Titanium exposure and human health. *Oral Sci Int*. 2019;16(1):15-24.
168. Fretwurst T, Buzanich G, Nahles S, Woelber JP, Riesemeier H, Nelson K. Metal elements in tissue with dental peri implantitis: A pilot study. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27(9):1178-86.
169. Wachi T, Shuto T, Shinohara Y, Matono Y, Makihiro S. Release of Ti ions from an implant surface and their effect on cytokine production related to alveolar bone resorption. *Toxicology*. 2015;327(1):1-9.
170. Vaicelyte A, Janssen C, Le Borgne M, Grosgeat B. Cobalt–Chromium Dental Alloys: Metal Exposures, Toxicological Risks, CMR Classification, and EU Regulatory Framework. *Crystals*. 2020;10(12):1151.
171. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Chromium, Nickel and Welding. Volume 49. Available from: <https://publications.iarc.fr/67> [Accessed 27 Jun 2024].
172. National Toxicology Program. Available from: <https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/roc/index-1.html> [Accessed 27 Jun 2024].

173. Biological Responses to Metal Implants. FDA Report Published on September 2019. Available from: <https://www.raps.org/news-and-articles/news-articles/2021/8/an-overview-of-recent-fda-activity-on-materials-in> [Accessed 28 Jun 2024].
174. Harischandra DS, Ghaisas S, Zenitsky G i sur. Manganese-Induced Neurotoxicity: New Insights Into the Triad of Protein Misfolding, Mitochondrial Impairment, and Neuroinflammation. *Front Neurosci.* 2019;13:654.
175. Agency for Toxic Substances and Disease Registry; Division of Toxicology and Human Health Sciences; Environmental Toxicology Branch; U.S. Department of Health and Human Services. Toxicological Profile for Molybdenum: Draft for Public Comment. April 2017. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp212.pdf> [Accessed 28 Jun 2024].
176. Köster R, Vieluf D, Kiehn M i sur. Nickel and molybdenum contact allergies in patients with coronary in-stent restenosis. *Lancet.* 2000;356(9245):1895-7.
177. Eliaz N. Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review. *Materials.* 2019;12(3):407.
178. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol.* 2014;7(2):60-72.
179. Kim KT, Eo MY, Nguyen TTH, Kim SM. General review of titanium toxicity. *Int J Implant Dent.* 2019;5(1):10.
180. Grosgeat B, Vaicelyte A, Gauthier R, Janssen C, Le Borgne M. Toxicological Risks of the Cobalt–Chromium Alloys in Dentistry: A Systematic Review. *Materials.* 2022;15(17):5801.
181. Primožič J, Poljšak B, Jamnik P, Kovač V, Čanadi Jurešić G, Spalj S. 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.* 2021;10(9):1359.
182. Kovac V, Poljsak B, Bergant M, Scancar J, Mezeg U, Primožic J. Differences in Metal Ions Released from Orthodontic Appliances in an In Vitro and In Vivo Setting. *Coatings.* 2022;12(2):190.
183. Petković Didović M, Kara K., Jelovica Badovinac I i sur. Metal release profiles of NiTi and stainless steel orthodontic appliances: The influence of proteinaceous immersion media vs artificial saliva. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine – prihvaćen za objavljivanje*

184. Uysal I, Yilmaz B, Aykan, Atilla AO, Evis Z. Nickel titanium alloys as orthodontic archwires: A narrative review. *Engineering Sci Tech*. 2022;36:101277.
185. Huang HH. Effects of fluoride concentration and elastic tensile strain on the corrosion resistance of commercially pure titanium. *Biomaterials*. 2002;23(1):59-63.
186. Eliades T, Pratsinis H, Kletsas D, Eliades G, Makou M. Characterization and cytotoxicity of ions released from stainless steel and NiTi orthodontic alloys. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2004;125(1):24-29.
187. Cimpan MR, Matre R, Cressey LI, Tysnes OB, Lie SA, Gjerdet NR. The effect of metal ions on cell death, reactive oxygen species and interleukin-1 α production in human monocytes. *Biomaterials*. 2005;26(30):4749-4757.
188. Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng R Rep*. 2004;47(3-4):49-121.
189. Mjör IA, Moorhead JE, Dahl JE. Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice. *Int Dent J*. 2000;50(6):361-366.

Popis slika

Slika 1. Povećanje broja stanica pri a) pH 5,5 i b) pH 6,6. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (AS), aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška (AS $\pm$ SP) te aritmetička sredina i standardno odstupanje (AS $\pm$ SO).

Slika 2. Relativna promjena izričaja glutation sintetaze (GSH) pri a) pH 5,5 i b) pH 6,6. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (AS), aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška (AS $\pm$ SP) te aritmetička sredina i standardno odstupanje (AS $\pm$ SO). * Statistički značajna razlika među naznačenim uzorcima (Kruskal-Wallis test višestruke usporedbe ($p < 0,05$)).

Slika 3. Relativna promjena izričaja superoksid dismutaze 1 pri a) pH 5,5 i b) pH 6,6. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (AS), aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška (AS $\pm$ SP) te aritmetička sredina i standardno odstupanje (AS $\pm$ SO). * Statistički značajna razlika među naznačenim uzorcima (Kruskal-Wallis test višestruke usporedbe ($p < 0,05$)).

Slika 4. Relativna promjena izričaja superoksid dismutaze 2 pri a) pH 5,5 i b) pH 6,6. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (AS), aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška (AS $\pm$ SP) te aritmetička sredina i standardno odstupanje (AS $\pm$ SO). * Statistički značajna razlika među naznačenim uzorcima (Kruskal-Wallis test višestruke usporedbe ($p < 0,05$)).

Slika 5. Relativna promjena izričaja katalaze pri a) pH 5,5 i b) pH 6,6. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (AS), aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška (AS $\pm$ SP) te aritmetička sredina i standardno odstupanje (AS $\pm$ SO). * Statistički značajna razlika među naznačenim uzorcima (Kruskal-Wallis test višestruke usporedbe ($p < 0,05$)).

Slika 6. Otpuštanje nikla iz analiziranih uzoraka pri pH 5,5.

Slika 7. Otpuštanje nikla iz analiziranih uzoraka pri pH 6,6.

Slika 8. Otpuštanje titanija iz analiziranih uzoraka pri pH 5,5.

Slika 9. Otpuštanje titanija iz analiziranih uzoraka pri pH 6,6.

Slika 10. Usporedba otpuštanja titanija iz NiTi i NiTi-p pri pH 5,5 (lijevo) i pH 6,6 (desno) pokazuje značajne razlike za svaku vremensku točku (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$).

Slika 11. Otpuštanje željeza iz analiziranih uzoraka pri pH 5,5.

Slika 12. Otpuštanje željeza iz analiziranih uzoraka pri pH 6,6.

Slika 13. Usporedba željeza oslobođenog iz SS i SS bez nikla slitina za svaku vremensku točku pri pH 5,5 (lijevo) i pH 6,6 (desno) pokazuje značajne razlike (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Slika 14. Otpuštanje kroma iz analiziranih uzoraka pri pH 5,5.

Slika 15. Otpuštanje kroma iz analiziranih uzoraka pri pH 6,6.

Slika 16. Usporedba kroma oslobođenog iz SS i SS bez nikla slitina za svaku vremensku točku pri pH 5,5 (lijevo) i pH 6,6 (desno) pokazuje značajnu razliku (*** $p < 0,001$).

Slika 17. Otpuštanje kobalta iz analiziranih uzoraka pri pH 5,5.

Slika 18. Otpuštanje kobalta iz analiziranih uzoraka pri pH 6,6.

Slika 19. Otpuštanje mangana iz analiziranih uzoraka pri pH 5,5.

Slika 20. Otpuštanje mangana iz analiziranih uzoraka pri pH 6,6.

Slika 21. Otpuštanje molibdena iz analiziranih uzoraka pri pH 5,5.

Slika 22. Otpuštanje molibdena iz analiziranih uzoraka pri pH 6,6.

Slika 23. Usporedba molibdena oslobođenog iz CoCr i TMA slitina za svaku vremensku točku pri pH 5,5 (lijevo) i pH 6,6 (desno) uz pokazane razlike (n.s., nije značajno; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) u svakoj vremenskoj točki.

Slika 24. Profili otpuštanja najzastupljenijih iona metala nakon eluiranja od 28 dana u kvašćevu podlogu kao medij, određeni ICP-MS metodom, a) pri pH 5,5 i b) pri pH 6,6.

Slika 25. Grafički prikaz vrijednosti Youngovog modula elastičnosti (E_{IT}) izmjerenih nanoindentacijom (MPa – megapaskal; 1 – NiTi, 2 – NiTi-p, 3 – SS, 4 – SS bez nikla, 5 – CoCr, 6 – TMA).

Slika 26. Grafički prikaz vrijednosti Tvrdće (H_{IT}) izmjerenih nanoindentacijom (MPa – megapaskal; 1 – NiTi, 2 – NiTi-p, 3 – SS, 4 – SS bez nikla, 5 – CoCr, 6 – TMA).

Slika 27. Trodimenzionalni prikaz površine žice NiTi bez uranjanja u slinu (kontrola), te nakon 28 dana uranjanja u umjetnu slinu pH 5,5 i 6,6.

Slika 28. Trodimenzionalni prikaz površine žice NiTi-p bez uranjanja u slinu (kontrola), te nakon 28 dana uranjanja u umjetnu slinu pH 5,5 i 6,6.

Slika 29. Trodimenzionalni prikaz površine žice SS bez uranjanja u slinu (kontrola), te nakon 28 dana uranjanja u umjetnu slinu pH 5,5 i 6,6.

Slika 30. Trodimenzionalni prikaz površine žice SS bez nikla bez uranjanja u slinu (kontrola), te nakon 28 dana uranjanja u umjetnu slinu pH 5,5 i 6,6.

Slika 31. Trodimenzionalni prikaz površine žice CoCr bez uranjanja u slinu (kontrola), te nakon 28 dana uranjanja u umjetnu slinu pH 5,5 i 6,6.

Slika 32. Trodimenzionalni prikaz površine žice TMA bez uranjanja u slinu (kontrola), te nakon 28 dana uranjanja u umjetnu slinu pH 5,5 i 6,6.

Slika 33. SEM/EDX analiza NiTi žice, kontrolni, netretirani uzorak; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 34. SEM/EDX analiza NiTi žice nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 35. SEM/EDX analiza NiTi žice nakon eluiranja pri pH 6,6; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 36. SEM/EDX analiza NiTi-p žice, kontrolni, netretirani uzorak; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 37. SEM/EDX analiza NiTi-p žice nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 38. SEM/EDX analiza NiTi-p žice nakon eluiranja pri pH 6,6; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 39. SEM/EDX analiza čelične žice, kontrolni, netretirani uzorak; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 40. SEM/EDX analiza čelične žice nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 41. SEM/EDX analiza čelične žice nakon eluiranja pri pH 6,6; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 42. SEM/EDX analiza čelične žice bez nikla, kontrolni, netretirani uzorak; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 43. SEM/EDX analiza čelične žice bez nikla nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 44. SEM/EDX analiza čelične žice bez nikla nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 45. SEM/EDX analiza čelične žice bez nikla nakon eluiranja pri pH 6,6; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 46. SEM/EDX analiza CoCr žice, kontrolni, netretirani uzorak; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 47. SEM/EDX analiza CoCr žice, kontrolni, netretirani uzorak; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 48. SEM/EDX analiza CoCr žice nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 49. SEM/EDX analiza CoCr žice nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 50. SEM/EDX analiza CoCr žice nakon eluiranja pri pH 6,6; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 51. SEM/EDX analiza TMA žice, kontrolni, netretirani uzorak; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 52. SEM/EDX analiza TMA žice nakon eluiranja pri pH 5,5; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Slika 53. SEM/EDX analiza TMA žice nakon eluiranja pri pH 6,6; a) mikroskopska slika s označenim mjestima EDX analize i b) tablični prikaz elementarne analize površine.

Popis tablica

Tablica 1. Primijenjeni qPCR protokol

Tablica 2. Karakteristike korištenih početnica gena oksidativnog stresa (sekvenca, talište, veličina te udjel GC baza)

Tablica 3. Analiza glavnih učinaka korištenjem analize varijance za ponovljena mjerenja s testiranjem učinaka pH, vrste slitine i vremena (mješovita ANOVA), za titanij oslobođen iz NiTi i NiTi-p slitina

Tablica 4. Analiza glavnih efekata za SS i SS bez nikla slitine

Tablica 5. Analiza glavnih efekata za SS i SS bez nikla slitine

Tablica 6. Analiza glavnih učinaka pomoću analize varijance za ponovljena mjerenja za ispitivanje učinaka pH, vrste slitine i vremena (mješovita ANOVA) za oslobođeni molibden iz CoCr i TMA slitina

Tablica 7. Rezultati AFM analize (S_q , R_a i R_q) za NiTi, NiTi-p, čelične, čelične bez nikla, CoCr i TMA žice pri pH 5,5 i 6,6

Popis pokrata

Ni – nikal

Ti – titanij

Co – kobalt

Cr – krom

Mo – molibden

Fe – željezo

NiTi – slitina nikal-titanij

SS – plemeniti čelik (engl. *stainless steel*)

TMA – slitina titanij-molibden (engl. *titanium-molybdenum alloy*)

CoCr – slitina kobalt-krom

pH – potentia Hydrogenii

p – razina statističke značajnosti

ICP – induktivno spregnuta plazma (engl. *inductively coupled plasma*)

AFM – mikroskop atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*)

SEM/EDX – skenirajući elektronski mikroskop / energijska disperzivna rendgenska spektroskopija (engl. *scanning electron microscopy with energy dispersive spectroscopy*)

sur. – suradnici

S. mutans – *Streptococcus mutans*

TiO₂ – titanij dioksid

TiN – titanijev nitrid

RhNiTi – slitina nikal-titanij presvučena rodijem

TiMo – slitina titanij-molibden

EU – Europska unija

IARC – Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

NTP – Nacionalni toksikološki program (engl. *National Toxicology Program*)

FDA – Uprava za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

CMR – kancerogeni mutageni reprotoksični (engl. *cancerogenic, mutagenic, reprotoxic*)

μm – mikrometar

R_a – prosječna visina amplitude

R_y – maksimalna hrapavost od vrha do udoline

P_t – maksimalna visina profila

R_{sk} – zakrivljenost

R_{ku} – kurtosis

W_a – prosjek valovitosti

2D – dvodimenzionalna

3D – trodimenzionalna

RMS – korijen srednje vrijednosti kvadrata

S_q – hrapavost

S_{sk} – zakrivljenost

S_{ku} – kurtosis

S_{dq} – nagib površine

S_{tr} – omjer teksture

$O\bullet$ – singlentni kisik

$O_2\bullet^-$ – superoksidni anion

H_2O_2 – vodikov peroksid

$OH\bullet$ – hidroksilni radikal

ROS – reaktivni kisikovi spojevi, vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*)

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

Nrf2 – nuklearni eritroidni faktor 2

μM – mikromol

Zr – cirkonij

Hf – hafnij

Nb – niobij

Ta – tantal

Ru – rutenij

Si – silicij

V – vanadij

Mn – mangan

Cu – bakar

Zn – cink

Co^{2+} – ioni kobalta

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

ΔSod1 – vrsta mutanta *Saccharomyces cerevisiae*

ΔCtt1 – vrsta mutanta *Saccharomyces cerevisiae*

GSH – glutation (sintetaza)

SOD – superoksid dismutaza

CAT – katalaza

GPx – glutation peroksidaza

SOD1 – superoksid dismutaza 1

SOD2 – superoksid dismutaza 2

Yap1 – vrsta transkripcijskog faktora

Skn7 – vrsta transkripcijskog faktora

HOG – glicerol visoke osmolarnosti

g/l – grama po litri

KCl – kalijev klorid

NaHCO_3 – natrij hidrogen karbonat

KSCN – kalijev tiocijanat

NaOH – natrij hidroksid

$^{\circ}\text{C}$ – celzijev stupanj

mL – mililitar

SAD – Sjedinjene Američke Države
 XTT-test – test s tetrazolium bojom
 GSH + GSSG/GSH *Assay Kit* – glutation + glutation disulfid kit za analizu
 konc. – koncentracija
 st/mL – stanica po mililitru
 okr/min – okretaja u minuti
 GSH1 – glutation sintetaza 1
 CTT1 – katalaza 1
 SGA1 – glikoamilaza specifična za sporulaciju
 RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)
 nm – nanometar
 cDNA – engl. *complementary deoxyribonucleic acid*
 µL – mikrolitar
 µg – mikrogram
 no RT – engl. *no reverse transcriptase*
 NTC – engl. *no template control*
 PCR – engl. *Polymerase Chain Reaction*
 ng/µL – nanograma po mikrolitri
 ddH₂O – dvostruko destilirana voda (engl. *double distilled H₂O*)
 qPCR – engl. *quantitative Polymerase Chain Reaction*
 dsDNA – engl. *double stranded deoxyribonucleic acid*
 Tt – temperatura taljenja
 n – broj ciklusa
 C_T – ciklusni prag
 2^{-ΔΔCT} – relativna kvantifikacijska metoda prema Livaku
 ΔΔCT – referentni (kontrolni) uzorak
 cm – centimetar
 o/min – okretaja u minuti
 ICP-MS – induktivno spregnuta plazma-masena spektrometrija (engl. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)
 HNO₃ – nitratna kiselina
 µg/cm² – mikrogram po centimetru kvadratnom
 mm – milimetar
 H_{IT} – tvrdoća nanoindentiranja

E_{IT} – Youngov modul elastičnosti
 nN – nanonjuti
 ISO – engl. *International Organization for Standardization*
 mN – milinjuti
 s – sekunda
 nm/s – nanometar u sekundi
 R_a – aritmetička srednja hrapavost površine
 R_q – srednja kvadratna hrapavost
 R_z – maksimalna visina neravnina
 Ω – maseni udjel
 Si_3N_4 – silicijev nitrid
 N/m – njuti po metru
 SEM – skenirajući elektronski mikroskop (engl. *scanning electron microscopy*)
 kV – kilovolt
 EDX – energijska disperzivna rendgenska spektroskopija (engl. *energy dispersive spectroscopy*)
 UK – Ujedinjeno Kraljevstvo
 Al_2O_3 – aluminijev oksid
 Ar(V) – argon (plinovit)
 NaCl – natrij klorid
 MgO – magnezijev oksid
 GaP – galijev fosfid
 SiO_2 – silicijev dioksid
 KBr – kalijev bromid
 Rh – rodij
 ANOVA – analiza varijance
 NiTi-p – nikal-titanij s prevlakom
 sl. – slika/e, slikama, slici
 BROJA ST. – broja stanica
 DF_n – Stupnjevi slobode za broj razina
 DF_d – Stupnjevi slobode za broj mjerenja
 ges – generalizirani eta kvadrat
 n.s. – nije značajno (engl. *not significant*)
 $\mu g/cm^2$ – mikrogram po kvadratnom centimetru

Ti/cm² – titanij po kvadratnom centimetru
Fe/cm² – željezo po kvadratnom centimetru
Cr/cm² – krom po kvadratnom centimetru
Mo/cm² – molibden po kvadratnom centimetru
MPa – megapaskal
AS – aritmetička sredina
SO – standardno odstupanje
C – ugljik
Al – aluminij
O – kisik
Sp – Spectrum
S – sumpor
K – kalij
Au – zlato
Pb – olovo
Na – natrij
Cl – klor
Ca – kalcij
P – fosfor
Sb – antimon
F – fluor
W – volfram
Sr – stroncij
Sn – kositar
UL – gornja podnošljiva razina unosa
mg/dan – miligram po danu
DNEL – izvedena razina bez prigovora
μg/kg – mikrograma po kilogramu
tm/dan – tjelesne mase po danu
mg/kg – miligrama po kilogramu
RDA – Preporučeni prehrambeni dodaci (engl. *Recommended Dietary Allowances*)
TiMb – titanij-molibden
XRD – rendgenska difrakcija (engl. *X-ray diffraction*)

Životopis

Zana Jusufi Osmani

Datum rođenja: 05/11/1982

e-mail adresa: zanajusufiosmani@yahoo.com

Radno iskustvo:

19/02/2019 – trenutno: Naslovni asistent, Medicinski fakultet, Studijski program Dentalne medicine, Univerzitet u Tetovu, Tetovo, RSM

27/08/2020 – trenutno: Voditelj Studijskog programa Dentalna medicina, Medicinski fakultet Tetovo, RSM

02/2014 – 12/2018: Osnovna škola “Sali Lisi“, Dobridol, Gostivar, RSM, Nastavnik predmeta: Unapređenje zdravlja

09/2010 – 05/2013; 09/2024 – trenutno: Doktor dentalne medicine, Dentalna klinika i implantologija "DENDIA ESTETICA", Gostivar, RSM

Obrazovanje i osposobljavanje:

01/2021 – trenutno: Doktorska škola iz znanstvenog područja biomedicina i zdravstvo, Dentalna medicina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

2011. – 2015.: Poslijediplomski magistarski studij, Stomatološki fakultet, Univerzitet Sv. Kiril i Metodij, Skopje, RMS, Magistar stomatoloških znanosti

2000. – 2009.: Stomatološki fakultet, Univerzitet Sv. Kiril i Metodij – Skopje, RMS, Doktor stomatologije

Jezične vještine:

Materinski jezik: albanski

Strani jezici: hrvatski, makedonski, engleski

Digitalne vještine:

Rad na računalu; MS Office; Canva za grafički dizajn

Publikacije i kongresna priopćenja:

1. Jusufi Osmani Z, Knežević PT, Vučinić D i sur. Orthodontic Alloy Wires and Their Hypoallergenic Alternatives: Metal Ions Release in pH 6.6 and pH 5.5 Artificial Saliva. *Materials*. 2023;16(5):1904.
2. Jusufi Osmani Z, Poljšak B, Zelenika S i sur. Ion release and surface changes of nickel-titanium archwires induced by changes of the pH value of the saliva – significance for human health risk assessment. *Materials*. 2022;15(6):1994.
3. Jusufi Osmani Z, Popovska M, Radojova-Nikolovska V, Mitic K, Nikolovski B. Helicobacter Pylori vo supragingivalen dentalen plak i plunka: dali e dijagnosticka vrednost za gastricna infekcija. In: International Conference "Dental Science in Everyday Practice". Ohrid, RNM: Chamber of Macedonia; 2015.
4. Popovska M, Jusufi Osmani Z, Radojova-Nikolovska V i sur. The Role of Helicobacter Pylori in Development of Lesion in Oral Cavity. *Balkan J Dent Med (BaSS)* 2020.
5. Alimani-Jakupi J, Nakova M, Haxhirexha F i sur. Clinical and epidemiological characteristic of oral lichen planus (OLP). *Apolonia – Albanian Dent J* 2020;41-42;31-34.
6. Nakova M, Alimani-Jakupi J, Ferati K i sur. Role of occlusal trauma in progression on periodontitis. *Apolonia – Albanian Dent J* 2020;41-42;35-38.
7. Domitrović A, Kodvanj J, Vučinić D i sur. Comparative Analysis Of Mechanical Properties Of Metals For Removable Dentures Bases. 10th International Congress of the School of Dental Medicine University of Zagreb, March 2024, Zagreb, Hrvatska.
8. Jusufi Osmani Z, Alimani Jakupi J, Katic V, Saravanja I, Canadi Juresic G. The Response Of Yeast Cells To The Stress Caused By The Corrosion Of Dental Materials. 6th International Scientific Conference of the Faculty of Medical Science Tetovo, May 2023 Tetovo, North Macedonia.
9. Jusufi Osmani Z, Alimani Jakupi J, Canadi Juresic G, Katic V. Changes In The Surface Of Dental Materials In Simulated Conditions Of The Oral Cavity. 9th Pan Albanian Dental Congress, May 2024 Struga North Macedonia.